

## Aspectos microbiológicos do sêmen de bovinos mantidos em central de reprodução animal

*Andre Belico Vasconcelos<sup>1\*</sup>, Loreнна Francys Santos<sup>1</sup>, Isabella Hercos de Paula<sup>1</sup>, Rodolfo Nunes de Almeida<sup>1</sup>, Jandra Pacheco dos Santos<sup>1</sup>, Amanda Pifano Neto Quintal<sup>2</sup>*

### RESUMO

A produção de sêmen congelado nas centrais de reprodução é uma ferramenta importante para a pecuária brasileira, todavia o processo de coleta do sêmen pode influenciar nas características biológicas do ejaculado. Considerando a coleta para a inseminação artificial um procedimento não estéril, podendo promover vários gêneros de bactérias no ejaculado, o objetivo do trabalho foi avaliar os aspectos microbiológicos de amostras de sêmen bovino, in natura e congelado, assim como os diluidores utilizados na rotina em uma central de produção de sêmen. Para o presente trabalho foram utilizados cinco touros da raça nelore, e, destes, avaliados dois ejaculados de cada animal, sendo coletados no intervalo de duas semanas. As colheitas de sêmen foram realizadas pelo método de vagina artificial. Também foram avaliados dois diluidores, Triladyl® e BotuBov®. Realizou-se o experimento pelo método de semeadura em Ágar TSA por esgotamento, e após 24h, 48h e 72 horas foram realizadas análises para a identificação e contagem de colônias crescidas de UFC/mL. As colônias foram avaliadas por coloração pelo método de Gram e microscopia óptica (100x) e classificadas conforme morfologia. Os dados laboratoriais foram submetidos ao teste de Kolmogorov-Smirnov para a verificação de normalidade ou homocedasticidade. Observou-se o predomínio de Bastonetes Gram Negativos e Gram Positivos ao fim do experimento, bem como a presença de outros microrganismos em menores quantidades, sugerindo contaminação nas amostras. Houve presença de microrganismos tanto no sêmen *in natura* e congelado, quanto nos diluidores comerciais, mesmo seguindo protocolos microbiológicos para garantir a esterilidade das amostras. Os resultados demonstram níveis aceitáveis de microrganismos no sêmen e nos diluidores; entretanto, estabelecer novas diretrizes no controle da qualidade microbiológica tende a ser uma linha de trabalho promissora na área da biotecnologia.

**Palavras-chave:** Diluidores, Colheita de sêmen, Contaminação bacteriana.

<sup>1</sup> Universidade de Uberaba.

<sup>2</sup> Universidade Federal de Minas Gerais

\*corresponding author: [devasconcelos.a.b@gmail.com/andre.vasconcelos@uniube.br](mailto:devasconcelos.a.b@gmail.com/andre.vasconcelos@uniube.br)

Av Nenê Sabino 1801, Bairro Universitário – Uberaba/MG – CEP 38055-500 – Brasil; Tel: 55-xx-34-33198942

## 1. Introdução

A produção de sêmen congelado nas centrais de reprodução é uma ferramenta importante para a pecuária brasileira. Todavia, o processo de coleta do sêmen pode influenciar nas características biológicas do ejaculado, podendo alterar o volume da secreção das glândulas, a resposta fisiológica da membrana plasmática e levar a uma contaminação deste por meio de microrganismos patogênicos (SOUZA, et al., 2006).

Na rotina das centrais de reprodução o método de colheita por vagina artificial é o mais utilizado por simular as condições anatômicas normais da vagina de uma vaca e também por ser o mais simples, uma vez que é composta por um tubo com válvula, uma mucosa de borracha, cone flexível e tubo coletor. Entretanto esse método pode proporcionar maior contaminação quando comparado ao método de massagem das vesículas seminais, como no trabalho realizado por Souza et al. (2006). Por conseguinte, outros fatores inerentes aos métodos também podem propiciar a contaminação, como os equipamentos utilizados na coleta, os funcionários que manejam o animal e o processo de manipulação do sêmen.

Considerando a coleta do sêmen um procedimento não estéril para uma inseminação artificial, ela pode promover vários gêneros de bactérias no ejaculado dependendo da concentração existente de microrganismos patogênicos e das alterações morfológicas e/ou funcionais que podem ocorrer nos espermatozoides (SILVA, et al., 2013).

O sêmen é a suspensão celular líquida contendo espermatozoides e secreções das glândulas acessórias do trato genital masculino. A porção fluida dessa suspensão é chamada de plasma seminal (RODRIGUES, 2009), que fornece um meio nutritivo e substâncias que podem atuar como agentes protetores para a fisiologia e a bioquímica dos espermatozoides, principalmente na jornada até o trato reprodutivo da fêmea (COLVILLE; BASSERT, 2010).

Dessa forma, a detecção prévia de microrganismos saprófitos e patogênicos no sêmen de reprodutores podem favorecer um melhor índice reprodutivo de fertilidade no plantel, uma vez que eles podem ser assintomáticos. Assim, é recomendado que, além do exame clínico e andrológico do touro, como motilidade, vigor e integridade física da membrana, sejam realizados exames de análises do líquido seminal, podendo ser uma avaliação da microbiota do sêmen (SOUZA et al, 2006; FERNANDES; SILVEIRA; GUIMARÃES, 2011).

De acordo com Souza et al. (2006), existiam poucos relatos encontrados de microbiota natural do sêmen de bovinos reprodutores, sendo que a literatura não definia quais microrganismos poderiam estar presentes no ejaculado das diferentes espécies de ruminantes. Portanto, não havia na época padrões de organismos patogênicos presentes no sêmen *in natura* de um touro. Já segundo Genovez, Scarcelli e Carvalho (2011), os microrganismos ubiqüitários na cavidade prepucial de touros são: *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus spp.*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacterium spp.*, *Alcaligenes faecalis*, *Pseudomonas pyocynea*, *Proteus vulgaris*, *Micrococcus spp.*, *Acinetobacter spp.*, *Bacillus spp.*, alguns fungos e leveduras. Os contaminantes do sêmen *in natura* permanecem preservados no sêmen industrializado, e podem se tornar oportunistas resultando em diminuição da eficiência reprodutiva.

De acordo com Bassi (2013), é importante descobrir as fases de contaminação do sêmen bovino até o seu processo de industrialização para que sejam estabelecidas medidas de controle para minimizar os prejuízos financeiros e preservar a saúde dos animais.

Assim, o objetivo deste trabalho foi analisar os aspectos microbiológicos presentes nas amostras de sêmen de bovino *in natura* e congelado, contendo dois diluidores (Triladyl® e BotuBov®) que são utilizados na rotina em uma central de reprodução.

## 2. Material e métodos

Para o preparo do meio foram utilizados 60g de Ágar TSA – TrypticSoy Ágar, diluídos em 1,5 litros de água destilada sob aquecimento e fervura durante 1 minuto até completa dissolução do meio de cultivo microbiológico conforme instruções do fabricante. Em seguida, foram autoclavados e plaqueados e todo o material de auxílio previamente esterilizado.

Foram utilizados dois ejaculados de cada um dos cinco touros disponibilizados pela central, da raça Nelore e com peso médio de 450 kg. As coletas foram realizadas em dois períodos, com intervalos de duas semanas entre uma coleta e outra, utilizando vagina artificial, obtendo-se para todo o experimento dez amostras de sêmen *in natura* analisadas separadamente, que apresentavam no mínimo 50% de motilidade total. Os diluidores (Triladyl® e BotuBov®) foram preparados e armazenados em geladeira. Posteriormente, ambos foram descongelados e adicionados às respectivas amostras conforme protocolo da central de produção de sêmen. Dessa forma, as amostras foram caracterizadas em: a) *in natura*; b) sêmen congelado com Triladyl®; c) sêmen congelado BotuBov®; d) diluidor Triladyl®; e) diluidor BotuBov®.

Foi feita a coleta em cinco animais do primeiro período no mesmo dia. Foi então separada uma alíquota *in natura* para avaliação microbiológica e o restante seguiu para o processamento da central, que possui procedimentos operacionais próprios para a fabricação das palhetas. Também foi retirada uma alíquota dos respectivos diluidores (Triladyl® e BotuBov®) para posterior avaliação microbiológica. As palhetas foram marcadas e após o protocolo de criopreservação mantidas em um botijão específico, em nitrogênio líquido a -196°C. Foram estabelecidos dois experimentos microbiológicos, ambos realizados em duplicata. As amostras de diluidores, o

sêmen *in natura* e o sêmen congelado foram enviados para o laboratório de microbiologia da UNIUBE.

O descongelamento do sêmen foi realizado utilizando banho-maria a 37°C por 30 segundos, em seguida foi cortada uma das pontas da palheta com tesoura, previamente esterilizada na chama do bico de Bunsen, e transferida para um tubo plástico de fundo cônico tipo Eppendorf® para a realização da diluição.

O procedimento de semeadura foi dividido em duas etapas. Na primeira, as alíquotas colhidas na primeira etapa foram diluídas em proporção ½ utilizando 100µl de solução salina a 0,9% (p/v) + 100µl das amostras em tubo Eppendorf® estéril e posteriormente semeadas em duas placas de meio TSA para cada amostra. Na segunda etapa as amostras restantes foram diluídas e semeadas com a mesma técnica da primeira semana do experimento. Nos dois experimentos foram reservadas duas placas de meio TSA sem semeadura para controle negativo, sendo que as demais amostras diluídas foram semeadas pela técnica de esgotamento, utilizando alça de platina calibrada de 10 µL e acondicionadas em jarra de anaerobiose com vela, sendo incubadas a 37°C por até 72 horas (TORTORA, 2012).

As leituras foram realizadas em 24 h, 48 h e 72 h, para a observação de crescimento de colônias e diferenciação destas. Foram confeccionadas lâminas para a identificação das colônias, e estas foram coradas pela coloração de Gram. As observações foram realizadas utilizando microscópio de campo claro em aumento de 100x.

Para a técnica de coloração de Gram, as lâminas foram totalmente cobertas pelo corante Cristal Violeta (coloração roxa) durante um minuto, e posteriormente essas lâminas foram lavadas com água destilada. Cobriram-se todas as lâminas com o corante Lugol (mordente) durante um minuto, lavando-as com água destilada. Após esse procedimento, inclinou-se a lâmina para o breve gotejamento de álcool-cetona para retirar o excesso de corante, sem tempo de espera. Logo depois, a lâmina foi enxaguada em água

destilada e em seguida totalmente coberta pelo corante Safranina (vermelho-rosa), aguardando-se 30 segundos. As lâminas foram secas em temperatura ambiente (TORTORA, 2012).

Os dados laboratoriais foram submetidos ao teste de Kolmogorov-Smirnov para verificação de normalidade ou homocedasticidade. Foi utilizado o software GraphPadInstat 5.0 (San Diego, CA, USA) e os resultados expressos na forma de percentual.

O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Experimentação Animal – Ofício CEEA-045/2017, sendo considerado aprovado.

### 3. Resultados e discussão

Foram obtidos os seguintes resultados após as análises das sementeiras nas amostras com diluidores e sem diluidores. A maior prevalência de bactérias presentes no diluidor BotuBov®, sem a adição do sêmen, como observado na Tabela 1, são os Bastonetes Gram Negativos, totalizando 67% durante todo o experimento, seguidos de 21% de Cocos Gram Positivos e de 12% de Bastonetes Gram Positivos. Leveduras e Cocos Gram Negativos não apresentaram crescimento.

**Tabela 1** – Quantidade de microrganismos encontrados após 72 horas na amostra de diluidor BotuBov®, sem adição de sêmen bovino.

| Bactérias encontradas     | *UFC/mL | Valor Porcentagem (%) |
|---------------------------|---------|-----------------------|
| Cocos Gram Negativos      | 0       | 0                     |
| Bastonetes Gram Negativos | 1220    | 67                    |
| Cocos Gram Positivos      | 390     | 21                    |
| Bastonetes Gram Positivos | 220     | 12                    |
| Leveduras                 | 0       | 0                     |

Fonte: Dados do autor [2015].\*Unidade Formadoras de colônias (UFC).

Nos diluentes comerciais Triladyl® e BotuBov® foi possível observar crescimento de bastonetes Gram Negativos em ambos. Possivelmente esse

resultado pode ser decorrente da presença de gema de ovo, que é utilizada na formulação dos diluidores, como também do processamento e armazenamento dos diluidores.

Na Tabela 2 foi possível observar o crescimento somente de Bastonete Gram Negativo, totalizando 100% de todas as amostras analisadas.

**Tabela 2** – Quantidades de microrganismos encontrados após 72 horas na amostra de diluidor Triladyl®, sem adição de sêmen bovino.

| <b>Bactérias encontradas</b> | <b>*UFC/mL</b> | <b>Valor Porcentagem (%)</b> |
|------------------------------|----------------|------------------------------|
| Cocos Gram Negativos         | 0              | 0                            |
| Bastonetes Gram Negativos    | 425            | 100                          |
| Cocos Gram Positivos         | 0              | 0                            |
| Bastonetes Gram Positivos    | 0              | 0                            |
| Leveduras                    | 0              | 0                            |

Fonte: Dados do autor [2015]. \*Unidade Formadora de colônias (UFC).

Foi possível observar na Tabela 3 que o sêmen bovino *in natura* apresentou 510 UFC/mL de Bastonetes Gram Positivos, bem semelhante à amostra de sêmen com Triladyl® (590 UFC/ml), sendo um pouco maior na amostra de sêmen com o diluidor BotuBov®, com 780 UFC/mL.

**Tabela 3** – Quantidade de microrganismos encontrados após 72 horas em amostras de sêmen bovino *in natura*, diluída com Triladyl® e diluída com BotuBov®

| <b>BACTÉRIAS ENCONTRADAS</b> | <b>IN NATURA *UFC/mL</b> | <b>SÊMEN BOTU-BOV® *UFC/mL</b> | <b>SÊMEN TRILADYL® *UFC/MI</b> |
|------------------------------|--------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| Cocos Gram Negativos         | 0                        | 280                            | 0                              |
| Bastonetes Gram Negativos    | 20                       | 3.620                          | 405                            |
| Cocos Gram Positivos         | 270                      | 120                            | 40                             |
| Bastonetes Gram Positivos    | 510                      | 780                            | 590                            |
| Leveduras                    | 70                       | 0                              | 0                              |

Fonte: Dados do autor...[2015].\*Unidade Formadoras de colônias (UFC)

Observa-se nesses resultados que o número de bactérias Gram Negativas na amostra de sêmen com diluidor BotuBov® foi de 3.620 UFC/mL, muito superior ao encontrado na amostra com sêmen mais diluidor Triladyl® (405 UFC/mL) e sêmen *in natura* (20 UFC/mL).

De acordo com Melo e Colaboradores (2013), os Bastonetes Gram Negativos são comumente indicativos de Bactérias aeróbicas (enterobactérias) e anaeróbicas (*Bacteroides sp.* e *Fusobacterium sp.*), e os Bastonetes Gram Positivos geralmente são bactérias anaeróbicas ou aeróbicas facultativos (exemplos mais comuns são *Corynebacterium sp.*, *Bifidobacterium sp.*, *Eubacterium sp.*, *Propionibacterium sp.*, *Clostridium sp.*, *Lactobacillus sp.* e *Bacillus sp.*). Já os Cocos Gram Negativos podem ser sugestivos de *Veillonella sp.*, e os Cocos Gram Positivos indicativos de bactérias aeróbicas (*Staphylococcus sp.* e *Streptococcus sp.*) e anaeróbicas (*Peptococcus sp.* e *Peptostreptococcus sp.*).

Mesmo sob as melhores e mais adequadas condições de colheita, o sêmen *in natura* apresenta certa contaminação microbiana, geralmente entre 150.000 a 650.000 UFC/mL. Até o ano de 2005, a Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) preconizava que a contagem bacteriana do sêmen industrializado fornecia a indicação dos procedimentos higiênicos da central produtora, e não deveria ultrapassar  $5 \times 10^3$  bactérias por mL de sêmen. Entretanto a indefinição do papel das bactérias ubiqualitárias da microbiota do prepúcio sobre a capacidade fecundante do sêmen, e ainda a possibilidade de causar infecção em fêmeas bovinas, alteraram as recomendações atuais da OIE sobre a colheita, higiene e manipulação do sêmen *in natura* e industrializado, não sendo mais definida a quantidade limite de microrganismos por mL de sêmen aceitável para uso em inseminação artificial (CARVALHO et al., 2012).

De acordo com o OIE (2010), o código sanitário preconiza que animais mantidos em centrais devem ser limpos e escovados, principalmente antes da coleta, e o orifício prepucial limpo cuidadosamente para a redução do número de microrganismos. Por mais que seja feita adequadamente a limpeza prepucial, a mucosa não é uma superfície estéril, portanto há de haver o mínimo de microrganismos encontrados mesmo se essa limpeza for feita.

De acordo com Chacur (2012), um meio diluente eficaz tem como finalidade proteger a célula espermática durante as alterações térmicas no congelamento e descongelamento e contém antibióticos para que seja fornecida nutrição e proteção evitando alterações de pH e inibição do crescimento bacteriano.

Já Segundo Genovez, Scarcelli e Carvalho (2011), os crioprotetores permitem que os agentes infecciosos sejam preservados e sobrevivam ao congelamento e descongelamento do sêmen bovino.

Durante todo o experimento o touro um, o dois e o quatro apresentaram crescimento predominante de Bastonetes Gram Negativos, enquanto o touro três apresentou crescimento de Bastonetes Gram Positivos. Nas amostras *in natura* houve maior prevalência de Cocos Gram Positivos e Bastonetes Gram Positivos.

Pode-se observar na Figura 1 que em todas as amostras que contêm a presença de sêmen não ocorreu o aparecimento de leveduras. As amostras com diluidores apresentaram grande crescimento de bactérias Bastonetes Gram (39% e 75%) para os diluidores Triladyl® e BotuBov®, respectivamente, enquanto no sêmen *in natura* houve um crescimento de apenas 2%.

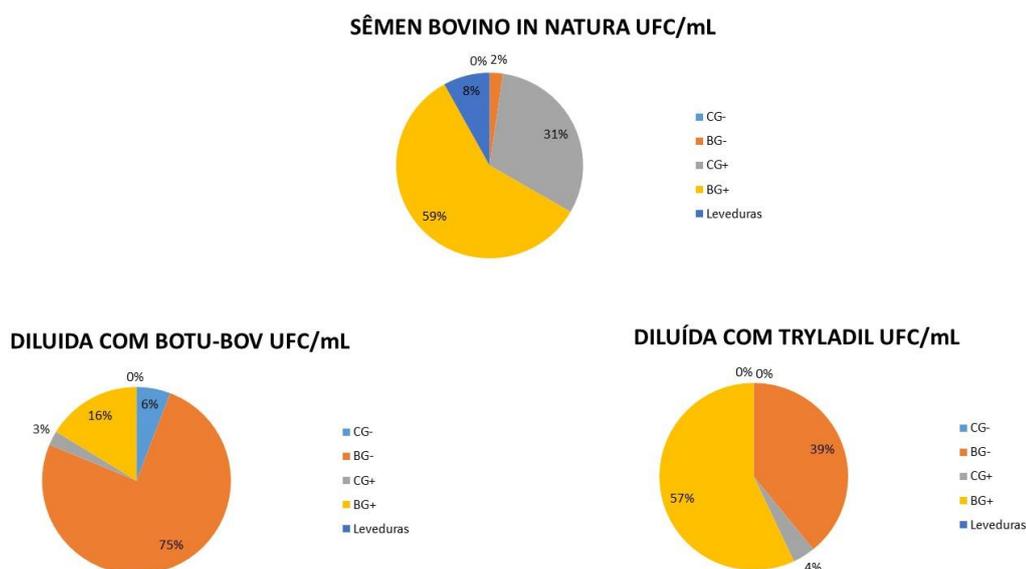


Figura 1 – Caracterização percentual de bactérias por diferença de amostra. Cocos Gram Negativos (CG-); Bastonetes Gram Negativos (BG-); Cocos Gram Positivos (CG+); Bastonetes Gram Positivos (BG+); Levedura; Unidade Formadora de colônias (UFC).

Fonte: Dados do autor[2015].

Na colheita de sêmen com vagina artificial, também pode haver contaminação com bactérias do exterior da genitália (CARVALHO, et al., 2012), bem como no processamento e armazenagem do sêmen, pelo uso de fômites e equipamentos mal esterilizados, nitrogênio líquido contaminado, diluente contaminado por agentes ambientais ou mesmo oriundo da gema de ovo que compõe sua fórmula ou do próprio manipulador (SOUZA, et al., 2006), que deve ter experiência na colheita e tratamento do ejaculado para que não ocorra contaminação cruzada (CARVALHO, et al., 2012).

Ao se deitar, o animal frequentemente expõe a mucosa peniana adquirindo micro-organismos originários das fezes e do solo que podem interferir na microbiota natural da cavidade prepucial e uretra, atingindo o sêmen no momento da colheita do ejaculado. Por via ascendente, os agentes patogênicos podem alcançar a cavidade prepucial e o sêmen nas doenças sexualmente transmitidas causadas por *Mycoplasma spp.*, *Ureaplasma diversum*, *Campylobacter fetus subsp. venerealis* e *Campylobacter fetus subsp. fetus*, *Trichomonas foetus*, *Histophilus somni* e os vírus da IBR e BVD (GENOVEZ; SCARCELLI; CARVALHO, 2011).

Os Cocos Gram Negativos não foram observados nas avaliações de diluidores e sêmen *in natura*, apenas nas amostras congeladas. Talvez esse resultado seja decorrente do processo de semeadura ou da manipulação ou de demais fatores relacionados ao processo de manipulação do sêmen, desde o processo de coleta ao processo de semeadura. A presença de Cocos Gram Positivos em algumas amostras sugere possível presença decorrente do animal. Todavia, em análise do sêmen congelado observa-se que não há uma replicabilidade nas amostras.

#### 4. Conclusão

Houve presença de microrganismos tanto no sêmen *in natura* e congelado, quanto nos diluidores comerciais, mesmo seguindo protocolos microbiológicos para garantir a esterilidade das amostras. Os resultados demonstram níveis aceitáveis de microrganismos no sêmen e nos diluidores; entretanto, estabelecer novas diretrizes no controle da qualidade microbiológica tende a ser uma linha de trabalho promissora na área da biotecnologia.

\*\*\*

#### **Microbiological aspects of sperm bovine maintained in the central specialized in animal reproduction**

##### **ABSTRACT**

The production of frozen semen in the central specialized in animal reproduction is an important tool for the Brazilian livestock. However the semen collection process can influence the biological characteristics of the ejaculated. Considering the collection for artificial insemination as non-sterile procedure, it can promote several types of bacteria in the ejaculated semen. In this context, the aim of this study was to evaluate the microbiological aspects of bovine semen samples, fresh, frozen and thinners used in routine in a insemination center. For this study, it was used five bulls of the Nelore breed, and evaluated two ejaculated semen from each animal, being collected at two weeks interval. Semen samples were collected by the method of artificial vagina. There were also evaluated two thinners, Triladyl® and BotuBov®. Furthermore, the experiment was conducted by seeding method Agar TSA by exhaustion, and after 24 hours; 48h; and 72 hours analysis was performed for identification and counting of colonies grown in CFU / ml. The colonies were assessed by staining by the Gram method and optical microscopy (100x) and classified as its morphology. The laboratory data were submitted to the Kolmogorov-Smirnov test for normality or check homoscedasticity. There was a predominance of Rods Gram Negative and Gram Positive at the end of the experiment, as well as presence of other microorganisms in smaller amounts, suggesting contamination in the samples. There were microorganisms present in both fresh and frozen semen, and in commercial thinners, even following microbiological protocols to ensure sample sterility. The results demonstrate acceptable microorganisms levels in semen and thinners; however, establishing new

guidelines for microbiological quality control tends to be a promising biotechnology area.

**Keyword:** Thinners, Semen collection, Contamination.

## 6. Agradecimentos

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais - FAPEMIG; Programa de Iniciação científica e ao Programa de Pós-Graduação em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos, da Universidade de Uberaba.

## 5. Referências

BASSI, P.B.; BRASÃO, S.C.; SANTOS, J.P.; BITTAR, E.R.; FERREIRA JÚNIOR, A.; BITTAR, J.F.F. Perfil microbiológico de sêmens comerciais de touros da região de Uberaba-MG. *Ars Veterinária*, v.29, n.4, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.15361/2175-0106.2013v29n4p31> . Acesso em: 27 de Jul. 2017.

CARVALHO, A.F.; SARAGÓ, A.; AZEVEDO, S.S.; BATISTA, C.S.A.; SCARCELLI, E.; GENOVEZ, M .E. Validação de nova proposta de espermocultura quantitativa aplicada a sêmen industrializado de touros. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* [online]. v.64, n.1, p.83-90, 2012. ISSN . Disponível em: 1678-162. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-09352012000100013> . Acesso em: 03 de Ago. 2017.

CHACUR, M.G.M.; SANCHES DIAS, H.; PAPA, F.O.; LOUVISON, B.A.; CALESCO, M.M.; PAPA, P.M. Efeito de meios diluentes na viabilidade de sêmen congelado bovino. *Vet. e Zootec.* v.19, n.1,p. 346-355, 2012. ISSN Impresso 0102 -5716 ISSN Eletrônico 2178-3764. Disponível em: < <http://www.fmvz.unesp.br/rvz/index.php/rvz/article/view/474/365> . Acesso em: 15 de Ago. 2017.

COLVILLE, T.; BASSERT, J. M. **Anatomia e Fisiologia Clínica para Medicina Veterinária**. 2.ed. São Paulo: Elsevier Editora, 2010, 543 p.

FERNANDES, L.S.; SILVEIRA, C.O.; GUIMARÃES, J.D. Contaminantes do sêmen: uma análise microbiológica. In: SIMPÓSIO DE PRODUÇÃO ACADÊMICA. **Anais III SIMPAC** – v. 3, n.1, p. 181-186. - Viçosa-MG - jan. - dez. - 2011 - Disponível em: < <https://academico.univicoso.com.br/revista/index.php/RevistaSimpac/article/view/350> . Acesso em: 26 de jul. 2017.

GENOVEZ, M.E.; SCARCELLI, E.; CARVALHO, A.F. Agentes microbianos associados ao trato genital de touros. **Biológico**, São Paulo, v.73, n.1, p.1-3, 2011. Disponível em: <http://studylibpt.com/doc/5653160/divulga%C3%A7%C3%A3o-t%C3%A9cnica-agentes-microbianos>. Acesso em: 27 de Jul. 2017.

MELO, R.P. B.; MORAES, E.P.B.X.; ALMEIDA, V.M.; SILVA, E.C.B.; SILVA, L.B.G.; JUNIOR, W.P.; MOTA, R.P. Avaliação microbiológica do sêmen fresco de reprodutores ovinos e caprinos do estado de Pernambuco. XIII JORNADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO – **JEPEX 2013** – UFRPE: Recife, 09 a 13 de dezembro. Disponível em: <http://www.eventosufrpe.com.br/2013/cd/resumos/R0552-1.pdf>. Acesso em: 01 de Ago. 2017.

OIE. **World organization for animal health**. Terrestrial Animal Health Code .13 Ed. Paris: OIE. 2010. Disponível em: <http://www.oie.int> . Acesso em Outubro de 2015. Acesso em: 01 de Ago. 2017.

RODRIGUES, M.P. **Perfil oxidativo e avaliação funcional de sêmen criopreservado de touros (*Bostaurus taurus* e *Bostaurus indicus*) criados em clima tropical**. 2009. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

SILVA, L.A.; SILVEIRA, R.O.; CARDOSO, A.B.; SANTOS, G.M.; CUNHA, A.F. Análise microbiológica de sêmen caprino pós-descongelamento. in: **Simpósio de Produção Acadêmica. Anais V SIMPAC**, v.5, n.1, p.187-192. 2013. - jan. - dez. Viçosa-MG. Disponível em <https://academico.univicoso.com.br/revista/index.php/RevistaSimpac/article/view/101/337> Acesso em: 01 de Ago. 2017.

*SOUZA, A.F.; GUERRA, M.M.P.; COLETO,Z.F.; MOTA,R.A.; SILVA, L.B.G.; LEÃO, A.E.D.S.; SOBRINHO, E.S.N.* Avaliação microbiológica do sêmen fresco e congelado de reprodutores caprinos. **Braz. J. vet. Res. anim. Sci.**, São Paulo, v. 43, n. 3, p. 329-336, 2006. DOI: <http://dx.doi.org/10.11606/issn.1678-4456.bjvras.2006.26480> . Acesso em: 15 de Ago. 2017.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10<sup>o</sup> ed. Porto Alegre: ArtMed, 2012.