

# Universidad Autónoma de Sinaloa

Colegio de Ciencias Agropecuarias

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Maestría en Ciencias Agropecuarias



**“Efecto del extracto de ajo, tiempo de refrigeración y diluyentes comerciales en bacterias aisladas a partir de semen caprino”**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:**

Maestra en Ciencias Agropecuarias

**PRESENTA:**

Daniela Gerardo López

**DIRECTOR DE TESIS:**

Dr. Miguel Ángel Rodríguez Gaxiola

**CO-DIRECTORA DE TESIS:**

Dra. Idalia Enríquez Verdugo

**ASESORES:**

Dra. Soila Maribel Gaxiola Camacho

Dra. Nohelia Castro del campo

Dra. Nohemí Castro del campo

Culiacán de Rosales, Sinaloa a agosto del 2024



Dirección General de Bibliotecas  
Ciudad Universitaria  
Av. de las Américas y Blvd. Universitarios  
C. P. 80010 Culiacán, Sinaloa, México.  
Tel. (667) 713 78 32 y 712 50 57  
dgbuas@uas.edu.mx

## UAS-Dirección General de Bibliotecas

### Repositorio Institucional Buelna

#### Restricciones de uso

Todo el material contenido en la presente tesis está protegido por la Ley Federal de Derechos de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

Queda prohibido la reproducción parcial o total de esta tesis. El uso de imágenes, tablas, gráficas, texto y demás material que sea objeto de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente correctamente mencionando al o los autores del presente estudio empírico. Cualquier uso distinto, como el lucro, reproducción, edición o modificación sin autorización expresa de quienes gozan de la propiedad intelectual, será perseguido y sancionado por el Instituto Nacional de Derechos de Autor.

Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Atribución-No Comercial  
Compartir Igual, 4.0 Internacional



## **AGRADECIMIENTOS**

A mis padres Javier Enrique Gerardo Sánchez y Julissa López González, por el apoyo y amor incondicional, también a mi Esposo Arturo Monje Flores por su confianza, amor y paciencia. A mis suegros Esteban Monje Berástica y Gladys Flores Mayorquín por su apoyo y confianza, son una gran motivación para mí.

A mi hijo Esteban Javier, eres la mayor motivación de mi vida, haz caminado junto conmigo en todo este proceso del posgrado, eres el motor que me impulsa a seguir creciendo y mejorando como persona en el ámbito personal y profesional.

Al Dr. Miguel Ángel Rodríguez Gaxiola, por la confianza, conocimientos y experiencias compartidas las cuales son de gran valor para mi profesión, además de su paciencia.

A la Dra. Idalia Enríquez Verdugo por brindarme su confianza, ayuda y conocimientos en el área de Bacteriología, gracias por su apoyo y paciencia.

A la MC. Gema Zaharina Vidaca Valdez por su amistad y confianza, por ayudarme en momentos difíciles además de brindarme asesorías para muchos de los procesos que lleve a cabo en el laboratorio de Bacteriología.

A la Dra. Nohelia Castro del Campo, gracias por el apoyo y la asesoría durante mi estancia profesional, fue una luz en mi caminar durante la realización de este trabajo.

Al Dr. Jean Pierre por brindarme sus conocimientos y asesoría en el laboratorio de microbiología.

A la Dra. Soila Maribel Gaxiola Camacho por darme la oportunidad de realizar mis estudios, lo cual me deja grandes experiencias y conocimientos.

Al Dr. Jesús José Portillo Loera, por brindarme sus conocimientos en el área de estadística para la realización de este trabajo.

A la MVZ. Citlali Santiago, MVZ. Omar Rosas, MVZ. Nora Valdez, MVZ. Daniela Inzunza, por su amistad incondicional y por su ayuda en muchos de los procesos que lleve a cabo durante la maestría.

# ÍNDICE

INDICE DE TABLAS .....	i
RESUMEN .....	ii
ABSTRACT .....	iii
I. INTRODUCCIÓN .....	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA .....	3
2.1 Inseminación artificial .....	3
2.2 Diluyentes espermáticos .....	3
2.2.1 Leche descremada .....	3
2.2.2 Yema de huevo.....	4
2.2.3 Diluyentes de base vegetal.....	5
2.3 Bacterias del semen.....	6
2.4 Resistencia bacteriana .....	7
2.4.1. Tipos de resistencia .....	8
2.4.2. Mecanismos de resistencia.....	9
2.4.3. Elementos móviles de la resistencia adquirida .....	9
2.4.4. Inactivación del antibiótico .....	9
2.4.5. Alteración del sitio blanco del antibiótico .....	10
2.4.6. Barreras de permeabilidad.....	11
2.5 Criopreservación .....	12
2.6 Extracto de ajo ( <i>Allium sativum</i> ).....	13
2.7 Antecedentes directos.....	15
III. HIPÓTESIS .....	17
IV. OBJETIVOS .....	18
V. MATERIAL Y MÉTODOS .....	19
5.1 Descripción del área de estudio .....	19
5.2 Definición de la población .....	19
5.3 Obtención de las muestras.....	20
5.4 Procesamiento de las muestras .....	21
5.4.1 Conteo de unidades formadoras de colonias (UFC).....	21

5.4.2	Identificación bacteriana .....	22
5.4.3	Pruebas bioquímicas .....	22
5.4.4	Frotis fijo y tinción de Gram .....	24
5.5	Susceptibilidad a antibióticos .....	24
5.6	Preparación de extracto de ajo ( <i>Allium sativum</i> ) .....	25
5.6.1	Susceptibilidad al extracto de ajo .....	25
5.7	Análisis estadístico.....	26
VI.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	27
VII.	CONCLUSIÓN.....	35
VIII.	LITERATURA CITADA .....	36

## ÍNDICE DE CUADROS

Tabla 1. Conteo de UFC/ml de muestras incubadas 24 horas de semen fresco (dilución 1:100).....	27
Tabla 2. Conteo de unidades formadoras de colonia de semen refrigerado 4 horas. ....	28
Tabla 3. Conteo de unidades formadoras de colonia se semen refrigerado 24 horas. ....	29
Tabla 4. Comparación de unidades formadoras de colonia a 4 y 24 horas de refrigeración con diluyente de base animal y base vegetal. ....	30
Tabla 5. Morfología colonial y tinción de Gram. ....	31
Tabla 6. Pruebas bioquímicas .....	32
Tabla 7. Prueba de susceptibilidad al ajo de <i>Bacillus spp.</i> .....	33
Tabla 8. Prueba de susceptibilidad al extracto de ajo de <i>Kocuria spp.</i> .....	33

## RESUMEN

El presente trabajo se realizó con el objetivo de determinar el efecto del tiempo de refrigeración, diluyente y dosis de extracto de ajo (*Allium sativum*) sobre bacterias aisladas de semen fresco y refrigerado de caprinos. Se colectaron 6 sementales caprinos por medio de vagina artificial. Se utilizaron dos diluyentes comerciales Triladyl y Optixcell. De cada eyaculado se prepararon cuatro muestras, a cada muestra se le agregaron 25 µl de semen fresco (60 millones por ml), una muestra se refrigeró durante 4 horas y la otra durante 24 horas. Para el semen fresco se realizaron diluciones seriadas (1:10 y 1:100) con agua peptonada bufferizada. Las muestras se sembraron 500µl en placas de agar base sangre suplementado al 8% con sangre equina con la técnica de extensión en placa. Las placas se dejaron incubar por 48 horas a 37°C. Se realizó el conteo de Unidades formadoras de colonias (UFC/ml) a las 48 horas. De las cepas aisladas se les realizaron pruebas bioquímicas, de las cuales se identificó *Kocuria spp* y *Bacillus spp*. Como resultado obtuvimos conteos mayores de UFC/mL a las 4 horas de refrigeración con las dosis de semen con diluyente de base animal, pero no hubo diferencia estadística entre diluyentes, sin embargo, si hay diferencia entre tiempos de refrigeración, en donde utilizar tiempos de refrigeración de 24 horas disminuyó la carga bacteriana del semen en comparación con 4 horas de refrigeración. En cuanto a las pruebas de susceptibilidad al extracto de ajo no hubo efecto sobre las bacterias. En los antibiogramas la cepa de *Bacillus spp* presentó sensibilidad a eritromicina, gentamicina, sulfametoxazol con trimetoprim y penicilinas. Una resistencia intermedia a tetraciclina y ampicilina. La cepa de *Kocuria spp* presentó sensibilidad a tetraciclinas, ampicilina, gentamicina y penicilina, una resistencia intermedia a la eritromicina y altamente resistente al sulfametoxazol con trimetoprim. En conclusión, si hay presencia de bacterias en el semen fresco de los machos. Sin embargo, al combinar el semen con los diluyentes hay una disminución de la carga bacteriana influenciada por el tiempo de refrigeración, en donde a mayor tiempo de refrigeración menor carga bacteriana. Se necesita realizar más investigaciones sobre las propiedades que tiene el extracto de ajo sobre las bacterias presentes en el semen caprino para prevenir la propagación de la resistencia a los antibióticos entre las cepas patógenas, que es un problema de salud pública creciente.

**Palabras clave:** Bacteria, Semen, Caprino, Ajo, diluyente.

## ABSTRACT

The present work was carried out with the objective of determining the effect of refrigeration time, diluent and dose of garlic extract (*Allium sativum*) on bacteria isolated from fresh and refrigerated semen of goats. Six goat stallions were collected by means of an artificial vagina. Two commercial diluents Triladyl and Optixcell were used. Four samples were prepared from each ejaculate, to each sample 25 µl of fresh semen (60 million per ml) were added, one sample was refrigerated for 4 hours and the other for 24 hours. For fresh semen serial dilutions were made (1:10 and 1:100) with buffered peptone water. The samples were seeded 500 µl on blood base agar plates supplemented at 8% with equine blood using the plate spread technique. The plates were left to incubate for 48 hours at 37°C. Colony forming units (CFU/ml) were counted after 48 hours. Biochemical tests were performed on the isolated strains, from which *Kocuria* spp and *Bacillus* spp were identified. As a result, we obtained higher CFU/mL counts after 4 hours of refrigeration with the doses of semen with animal-based extender, but there was no statistical difference between extenders. However, there is a difference between refrigeration times, where using 24-hour refrigeration times decreased the bacterial load of the semen compared to 4 hours of refrigeration. Regarding the susceptibility tests to garlic extract, there was no effect on the bacteria. In the antibiograms, the *Bacillus* spp strain presented sensitivity to erythromycin, gentamicin, sulfamethoxazole with trimethoprim and penicillins. Intermediate resistance to tetracycline and ampicillin. The *Kocuria* spp strain showed sensitivity to tetracyclines, ampicillin, gentamicin and penicillin, intermediate resistance to erythromycin and highly resistant to sulfamethoxazole with trimethoprim. In conclusion, bacteria are present in fresh semen of males. However, when combining semen with extenders there is a decrease in the bacterial load influenced by the refrigeration time, where the longer the refrigeration time the lower the bacterial load. More research is needed on the properties of garlic extract on the bacteria present in goat semen to prevent the spread of antibiotic resistance among pathogenic strains, which is a growing public health problem.

**Key words:** Bacteria, Semen, Goats, Garlic, extender



## I. INTRODUCCIÓN

A partir de 1899, la práctica de inseminación artificial en bovinos ha ido en aumento, esto deja la duda de si hay un control efectivo de microorganismos en el semen; la identificación y control de agentes bacterianos contaminantes del semen bovino, así como las técnicas de dilución y preservación de este, son objeto de numerosas investigaciones (Santos y Silva, 2020). Los mejores carneros solo pueden explotarse ampliamente mediante el uso de inseminación artificial (IA). Sin embargo, la IA puede propagar infecciones por una inseminación antihigiénica. La recolección de semen no es un procedimiento estéril y no se puede evitar cierta contaminación con bacterias. El semen de carnero puede estar contaminado con bacterias de la superficie del pene y el prepucio, área de recolección, equipos y personas. Como consecuencia, las bacterias pueden contaminar el tracto reproductivo de la hembra. Para minimizar estos efectos, se incluyen antibióticos en los diluyentes de semen de carnero para prevenir el crecimiento bacteriano (Ahmed, *et al.*, 2017). Para la preservación del semen se utilizan diluyentes espermáticos, los cuales están compuestos por sustancias iónicas o no iónicas que mantienen la osmolaridad y proporcionan capacidad de almacenamiento; una fuente de lipoproteína o material de alto peso molecular para prevenir el choque por frío, como yema de huevo, leche o lecitina de soya, glucosa o fructosa como fuente de energía y otros aditivos, como enzimas y antibióticos (Aires, *et al.*, 2003). Los diluyentes a base de yema de huevo representan un riesgo debido a la contaminación bacteriana, también porque varía en la composición de la yema de huevo debido a la diferencia en la raza, el manejo y las prácticas nutricionales, lo cual también afectan la calidad del espermatozoides (Van Wagtendonk *et al.*, 2000).

Según Vidal *et al.* (2013) los diluyentes que contiene lecitina de soya en diferentes concentraciones preservan mejor los parámetros de calidad del espermatozoides de manera similar al diluyente convencional. Así, se asume que un diluyente que contiene lecitina de soya como fuente de lipoproteínas se puede usar para congelar semen de cabra. Otro factor importante a considerar durante la criopreservación de semen caprino es la alteración de las membranas de los espermatozoides lo cual puede

ser prevenido parcialmente mediante el control de la velocidad de congelamiento (Ramos *et al.*, 2017). Existen extractos naturales que pueden adicionarse al semen como el extracto de ajo (*Allium sativum*). Las especies de *Allium* son el género de interés médico más importante de la familia Alliaceae; el género incluye más de 700 especies distribuidas en el mundo, se distinguen por contener como componentes principales, compuestos sulfurados que le otorgan sus características organolépticas y medicinales. Son de fácil desarrollo y tienen larga vida post cosecha, además del consumo por sus características culinarias, es ampliamente utilizado por sus propiedades antimicrobianas, antioxidantes, antifúngicas, anticancerígenas e inmunoestimulantes (Mnayer *et al.*, 2014). En estudios realizados directamente en semen por Gallego *et al.*, (2014) el extracto de *Allium sativum* no presentó efecto espermicida en semen humano, por lo que se consideran este extracto como posible molécula capacitante. Así mismo, Petropoulos *et al.*, (2018) utilizando extracto de ajo demostraron un efecto bactericida sobre algunas bacterias Gram negativas: *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella Typhimurium*, *E. coli* y *Enterobacter cloacae*, y Gram positivas: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* y *Micrococcus flavus*. El objetivo del presente trabajo es determinar el efecto del tiempo de refrigeración, diluyente y dosis de extracto de ajo (*Allium sativum*) sobre bacterias aisladas a partir de semen caprino fresco y refrigerado utilizando dos diluyentes comerciales uno a base de yema de huevo y otro a base de lecitina de soya.

## **II. REVISIÓN DE LITERATURA**

### **2.1 Inseminación artificial**

La inseminación artificial es un proceso de reproducción asistida, el cual consiste en depositar manualmente el semen en el tracto reproductivo de la hembra y representa una gran importancia en el mejoramiento genético, debido al acceso a animales de alta productividad. Es una actividad la cual consiste en depósito de manera artificial de dosis de semen en el tracto reproductivo de la hembra en el momento más adecuado, esto permite una alta probabilidad de gestación. Los procedimientos correctos de inseminación artificial tendrán como resultado una mayor eficiencia reproductiva, lo cual beneficia también los aspectos económicos como la producción (Goshme *et al.*, 2021).

### **2.2 Diluyentes espermáticos**

Los diluyentes espermáticos tienen la capacidad de aumentar el volumen del eyaculado y generar un medio de sobrevivencia, estos protegen a los espermatozoides durante las fases de enfriamiento descongelación y congelación, también proporcionan una especie de tampón que protege a la célula de cambios bruscos de temperatura (Andrade y Palma, 2020).

#### **2.2.1 Leche descremada**

La leche descremada es un diluyente natural, contiene minerales, proteínas, aminoácidos, grasas y azúcar. Se considera de los primeros diluyentes y tiene como principal ventaja la facilidad de conseguir y su costo (Salim *et al.*, 2019). La leche es un medio isotónico que contiene muchos componentes favorables para el mantenimiento de la viabilidad del espermatozoide, y fue utilizada largamente para extender el semen de toro. El semen de carnero también ha sido diluido con leche principalmente para su uso en fresco o almacenamiento líquido. También ha sido adaptada para congelamiento de semen de carnero, mayoritariamente en forma reconstituida combinada con arabinosa, fructosa o yema de huevo (Bonilla, 2000).

Particularmente, la lactosa puede generar aportes energéticos y la caseína aumenta la funcionalidad cinética de los espermatozoides, al igual, ofrece amortiguación de

pH, estabilidad de membrana relativa por los lípidos y viscosidad adecuada (Bandeira et al., 2015). Se pueden atribuir efectos bactericidas relativos, sin embargo, las tasas de contaminación de semen conservado en base a leche son altas. La fertilidad del semen diluido y congelado con base en leche descremada es buena con tasas de preñez de más del 90% en condiciones adecuadas (Salim, et al., 2019). Algunas investigaciones sugieren que la leche descremada es buena para el almacenamiento de semen a 2-5°C, la fertilidad es mejorada cuando se adicionan antibióticos a la leche descremada (Bonilla, 2000).

### **2.2.2 Yema de huevo**

Es uno de los diluyentes más antiguos, con datos reportados desde 1939, favorece la viabilidad espermática como diluyente y tiene efecto crioprotector al favorecer los espermatozoides durante el choque de frío. Los fosfolípidos que componen la yema de huevo y las lipoproteínas de baja densidad confieren resistencia para su almacenamiento al unirse a la membrana espermática gracias a su componente proteico, además, la presencia de proteínas aumenta la acción de los fosfolípidos en la protección espermática durante el almacenamiento en frío (Strzezek *et al.*, 2004).

La yema de huevo (20% v/v) ha sido ampliamente utilizada como un permeable crioprotector para la criopreservación de espermatozoides en diferentes especies. El efecto crioprotector durante la crioconservación son las lipoproteínas de baja densidad (LDL), los fosfolípidos y el colesterol. La LDL de la yema de huevo se compone de lípidos (83%-89%) y proteínas (11%-17%). Los constituyentes lipídicos de (LDL) son 69% de triglicéridos, 26% de fosfolípidos y 5% de colesterol. Los fosfolípidos de la yema de huevo se consideran un elemento crioprotector dinámico que protege a los espermatozoides al unirse a las membranas de forma reversible, iniciando la reorganización de la estructura de la membrana (Naz *et al.*, 2018). Sin embargo, las lipoproteínas de alta densidad (HDL) y las hormonas corticosteroides presentes en la yema de huevo de gallina dificultan los procesos metabólicos y el análisis bioquímico; afectan en última instancia la calidad de los espermatozoides después de la descongelación (Lipar *et al.*, 1999). Además, el riesgo de

contaminación microbiana, varía en la composición de la yema de huevo debido a la diferencia en la raza, el manejo y las prácticas nutricionales, son también las principales causas que afectan la calidad del esperma (van Wagtendonk *et al.*, 2000).

### **2.2.3 Diluyentes de base vegetal**

Los diluyentes a base de glicerol, a los que se les agrega yema de huevo (sola o en combinación con leche), se usan comúnmente para la criopreservación de semen de toro. Sin embargo, en los últimos años ha habido frecuentes argumentos en contra del uso de yema de huevo o leche, uno de ellos es la gran variabilidad de composición que dificulta el análisis de los efectos beneficiosos de un determinado compuesto sobre la criopreservación de semen. Además, la yema de huevo y la leche introducen un riesgo de contaminación microbiana, con la consiguiente producción de endotoxinas capaces de dañar la capacidad fertilizante de los espermatozoides. Como consecuencia directa, la mayoría de los países temen el riesgo de introducir enfermedades exóticas a través del transporte de productos a base de leche o de huevo. Por lo tanto, sería preferible un sustituto bien definido y libre de patógenos de origen no animal para la yema de huevo (Aires *et al.*, 2003).

Los diluyentes que utilizan componentes de origen vegetal se han desarrollado como una alternativa a los de origen animal (base yema de huevo) para la dilución del semen de toro, Murphy *et al.* (2018) evaluó tres diluyentes comerciales, dos de base vegetal (Optixcell y Andrommed) y uno a base animal (BullXcell), encontrando que no había diferencia entre los diluyentes en cuanto al porcentaje de fertilidad tras la inseminación, por lo tanto, Optixcell y AndroMed son medios sin proteínas animales, que pueden ser una alternativa adecuada a BullXcell para el almacenamiento de semen de toro congelado-descongelado. Aires *et al.* (2003) sugieren que, de acuerdo con los estándares de calidad que se deben exigir para los medios crioprotectores y debido a la calidad superior del diluyente sin yema de huevo, un diluyente definido con lecitina de soya podría ser la mejor opción como diluyente de semen en el futuro.

### 2.3 Bacterias del semen

La contaminación bacteriana en el semen es causada por muchos factores. El semen se contamina con bacterias que se pueden encontrar en el aparato reproductor del macho, durante el proceso colección, dilución, enfriamiento y congelación. La contaminación también puede ocurrir a través del aire, los materiales y equipos utilizados en el procesamiento de semen (Sitepu *et al.*, 2018).

Los diluyentes que contienen componentes como la yema de huevo y la leche descremada son difíciles de estandarizar e introducen el riesgo de contaminación microbiana (van Wagendonk *et al.*, 2000). La inseminación antihigiénica puede propagar infecciones ya que la recolección del semen no es un procedimiento, estéril y no se puede evitar cierta contaminación con bacterias. El semen puede estar contaminado con bacterias de la superficie del pene y prepucio, equipos y personas. Como consecuencia, las bacterias podrían contaminar el tracto reproductivo de la hembra (Ahmed *et al.*, 2017). Aunque existe una nueva generación de diluyentes de semen libres de ingredientes animales, los diluyentes que contienen yema de huevo todavía se usan ampliamente para la criopreservación de semen (Aires *et al.*, 2003).

Existen diversos métodos para tratar de contrarrestar el desarrollo de microorganismos patógenos en el semen como el agregar antimicrobianos a los diluyentes seminales, pero este método se ha mostrado ineficaz para erradicar la carga bacteriana ya que diversos autores han reportado la presencia de estos agentes patógenos multirresistentes en el semen post congelación (Santos & Silva, 2020). Los microorganismos causan la aglutinación de los espermatozoides móviles y la reducción en la capacidad de reacción del acrosoma, así como alteraciones en la morfología celular (Azawi y Ismael, 2011).

Ronald y Prabhakar (2001) evaluaron la carga bacteriana en semen puro, semen diluido y semen congelado de bovinos. Aislaron e identificaron diversos organismos hasta el nivel de especie. *Escherichia coli* fue el organismo predominante aislado, también *Brucella abortus*, *Pseudomona spp* y *Staphylococcus spp*. La mayoría de los organismos fueron resistentes a la penicilina y la estreptomycin utilizadas en el

diluyente de semen; Dentro de estos agentes bacterianos presentes en semen se destaca la presencia de *Proteus* spp, grupos de *Pseudomonas* spp, *Bacillus* spp, *Staphylococcus* spp, *Micrococcus* spp, *Escherichia coli*, entre otros coliformes como los tipos predominantes de bacterias en el semen recién colectado (Duracka *et al.*, 2020).

Ahmed *et al.* (2017) encontraron *E. coli*, *Staphylococcus* spp y *Bacillus* spp en semen fresco recolectado, Abro *et al.* (2016) quienes aislaron *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus intermedius* a partir de semen de bovino post congelado en Pakistán, dichos aislados mostraron resistencia a trimetoprim con sulfametoxazol, amoxicilina y cefalexina.

Vidaca *et al.* (2022) realizaron un trabajo con semen bovino encontrando que la cuantificación bacteriana llegó hasta a 3,280 UFC/ml, de estas se aislaron 14 cepas, de las cuales 6 fueron Gram positivas, donde se identificaron a *Enterococcus* spp, *Bacillus* spp, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* spp, *Aerococcus* spp y *Micrococcus* spp y 8 fueron Gram negativas, las cuales se identificaron como *Klebsiella* spp, *Enterobacter* spp, *Pseudomona* spp, *Acinetobacter* spp, *Serratia* spp, *Citrobacter* spp y *Proteus* spp, *Escherichia coli*. La microbiota Gram positiva resultó con multiresistencia antimicrobiana, principalmente a los aminoglucósidos, betalactámicos y cefalosporinas en un 90, 80 y 80% respectivamente, y sensibilidad a las sulfonamidas, así como la microbiota Gram negativa mostró resistencia por lo menos un antimicrobiano de las familias de los aminoglucósidos, anfenicoles, betalactámicos, cefalosporinas y sulfonamidas, las cuales mostraron sensibilidad variada. La presencia de bacterias multirresistentes en semen post congelado puede indicar una contaminación cruzada debido a las bacterias comensales y en algunos casos al mal manejo.

#### **2.4 Resistencia bacteriana**

La resistencia que ejercen las bacterias a los antibióticos, antisépticos y desinfectantes, es un problema de salud pública que se creía superado. Desde el

descubrimiento de los primeros antibióticos, los microorganismos han sido capaces de evadir su acción (Cabrera *et al.*, 2007).

Desde su introducción como drogas hace unos sesenta años, los agentes quimioterapéuticos antimicrobianos, incluyendo antibióticos, algunos naturales y otros semisintéticos, y otros agentes sintéticos como las sulfonamidas y las quinolonas, han jugado un papel esencial, junto con medidas preventivas como la vacunación, en la disminución de la morbilidad y la mortalidad causadas por las enfermedades infecciosas. Sin embargo, el amplio uso, mal uso y abuso de los antibióticos, no solamente en el tratamiento y la prevención de infecciones bacterianas en el ser humano, sino también en medicina veterinaria, como promotores de crecimiento en la producción animal y en agricultura, han ejercido una inmensa presión de selección para el surgimiento y la diseminación de los mecanismos de resistencia entre diversas poblaciones bacterianas (García, 2001).

#### **2.4.1. Tipos de resistencia**

**Natural o intrínseca:** Es una propiedad específica de las bacterias y su aparición es anterior al uso de los antibióticos, como lo demuestra el aislamiento de bacterias resistentes a los antimicrobianos, de una edad estimada de 2000 años encontradas en las profundidades de los glaciares de las regiones árticas de Canadá. Además, los microorganismos que producen antibióticos son por definición resistentes. En el caso de la resistencia natural todas las bacterias de la misma especie son resistentes a algunas familias de antibióticos y eso les permiten tener ventajas competitivas con respecto a otras cepas y pueden sobrevivir en caso que se emplee ese antibiótico (Díaz, 2003).

**Adquirida:** Constituye un problema en la clínica, se detectan pruebas de sensibilidad y se pone de manifiesto en los fracasos terapéuticos en un paciente infectado con cepas de un microorganismo en otros tiempos sensibles. La aparición de la resistencia en una bacteria se produce a través de mutaciones (cambios en la secuencia de bases de cromosoma) y por la transmisión de material genético extracromosómico procedente de otras bacterias (Díaz, 2003).



En el primer caso, la resistencia se trasmite de forma vertical de generación en generación. En el segundo, la transferencia de genes se realiza horizontalmente a través de plásmidos u otro material genético movable como integrones y transposones, esto último no solo permite la transmisión a otras generaciones, sino también a otras especies bacterianas. De esta forma una bacteria puede adquirir la resistencia a uno o varios antibióticos sin necesidad de haber estado en contacto con estos (Díaz, 2003).

#### **2.4.2. Mecanismos de resistencia**

La diseminación de mecanismos de resistencia no conoce barreras geográficas, biológicas ni sociales. Actualmente, la letalidad de muchas infecciones causadas por bacterias multirresistentes es similar a la observada antes de la introducción de los antibióticos como agentes terapéuticos y se ha acuñado, incluso, el concepto de “era post-antibiótica”. Uno de los elementos fundamentales es el desarrollo de una estrategia de vigilancia de los perfiles de resistencia bacteriana y recopilación de información en forma sistemática. Esta información resulta esencial, no solamente para determinar la magnitud del problema, identificar los principales microorganismos responsables de infecciones intrahospitalarias, identificar la utilidad real de los diversos antibióticos de mayor uso en la seguridad social, sino también, para poder definir líneas de acción y estrategias en el uso de antibióticos en un futuro inmediato. El fenómeno de resistencia tiene un sustrato genético intrínseco o adquirido que se expresa fenotípicamente por mecanismos bioquímicos. De esta manera puede observarse la resistencia desde el ambiente biológico y otro el bioquímico (García, 2001).

#### **2.4.3. Elementos móviles de la resistencia adquirida**

El fenómeno biológico de la resistencia depende de la aparición y conservación de los genes de resistencia, como elementos génicos cromosómicos y extra cromosómicos, en pocas palabras es la modificación en el genoma lo cual determina la aparición de dichos genes; estos cambios se clasifican en microevolutivos y macroevolutivos (Oteo y Belén, 2015).

Los primeros son el resultado de mutaciones únicas que comprometen nucleótidos pareados, mientras las macroevolutivas afectan segmentos de ADN. Los plásmidos y transposones son elementos genéticos móviles donde se transportan los genes de resistencia. Los plásmidos son fragmentos de DNA bacteriano con longitud variable, algunos con capacidad para replicarse independiente de la maquinaria genética que dispone la célula, lo que les da el apelativo de conjugativos y no conjugativos según esta capacidad. Por otro lado los transposones son secuencias de DNA (doble cadena) que pueden ser traslocados entre cromosomas o de un cromosoma a un plásmido o entre plásmidos, gracias a un sistema de recombinación propio, esto sumado a la capacidad de los plásmidos de trasladarse de una célula a otra, durante la conjugación, permite la adquisición de genes de resistencia entre bacterias de la misma especie o especies distintas lo que facilita la expansión epidémica de la resistencia. Algunos plásmidos y transposones poseen elementos génicos denominados integrones que les permite capturar varios genes exógenos determinando la aparición de una resistencia a varios antibióticos (resistencia múltiple) (Sussman *et al.*, 2009).

#### **2.4.4. Inactivación del antibiótico**

Un antimicrobiano es una molécula natural (producida por un organismo vivo, hongo o bacteria), sintética o semisintética, capaz de inducir la muerte o la detención del crecimiento de bacterias, virus u hongos. Los antibióticos constituyen un grupo heterogéneo de sustancias con diferente comportamiento farmacocinético y farmacodinámico, ejercen una acción específica sobre alguna estructura o función del microorganismo, tienen elevada potencia biológica actuando a bajas concentraciones y la toxicidad es selectiva, con una mínima toxicidad para las células de nuestro organismo (Seija y Vignoli, 2006).

Las bacterias sintetizan enzimas que hidrolizan al antimicrobiano, destruyendo su acción antibacteriana, sin tener posibilidad de actuar sobre el microorganismo. La producción de betalactamasas es el mecanismo más frecuente de resistencia antibiótica. Existen continuas mutaciones que producen expresión de beta-lactamasas de espectro extendido (BLEE), manifestándose como resistencia a

cefalosporinas de 3<sup>a</sup> generación (ceftriaxona). Para combatir esta resistencia se utiliza un inhibidor enzimático que tiene mayor afinidad a la enzima e impide la destrucción del antimicrobiano y de esta manera permite su acción (clavulanato y sulbactam) (Moreno *et al.*, 2009).

#### **2.4.5. Alteración del sitio blanco del antibiótico**

Otra forma de resistencia se basa en la capacidad de las bacterias para generar sustancias metabólicas que compiten con el sitio activo del fármaco, como sucede con la resistencia a sulfonamidas por *Staphylococcus aureus*, mecanismo conocido como alteración de las vías de metabolitos. Por ejemplo, *S. aureus*, desarrolla resistencia a sulfonamidas por medio de un compuesto similar a PABA (ácido para-amino benzoico). El PABA es un precursor del ácido fólico bacteriano. Las bacterias deben sintetizar su propio ácido fólico, conocido como vitamina B10. Algunos antibacterianos como las sulfonamidas compiten con el PABA por medio de la inhibición de la enzima dihidrofolato reductasa necesaria para el paso de dihidrofolato a tetrahidrofolato, cofactor necesario en la síntesis de DNA y proteínas. La resistencia bacteriana se presenta por mutación espontánea o transferencia de la misma a través de plásmidos, generando mutación de la dihidroteroato sintetasa, creando una vía metabólica alterna para la síntesis del ácido fólico y generando aumento en la capacidad de inactivar o destruir la droga y producción de un antagonista de la droga. Se destaca, igualmente, la alteración enzimática del sitio objetivo del fármaco, reduciendo la afinidad del antibiótico al sitio blanco; estos mecanismos también son regulados por enzimas eritromicina metilasas ribosomales que otorgan resistencia a macrólidos (Troncoso *et al.*, 2017).

#### **2.4.6. Barreras de permeabilidad**

Este mecanismo se debe a los cambios que se dan en los receptores bacterianos específicos para los antimicrobianos o por alteraciones estructurales en los componentes de envoltura de la célula bacteriana (membrana o pared celular) que influyen en la permeabilidad, así como a la pérdida de la capacidad de transporte

activo a través de la membrana celular o la expresión de bombas de eflujo las cuales se activan en el momento en que el antibiótico se introduce a la célula bacteriana.

En la membrana celular se encuentran las llamadas bombas de eflujo que llevan a cabo la internalización y expulsión de los antimicrobianos. Una amplia variedad de bombas de eflujo proveen resistencia antimicrobiana tanto en bacterias Gram positivas como en Gram negativas. El eflujo activo de antibióticos es mediado por proteínas transmembranales. En el caso de las bacterias Gram negativas involucra también componentes en la membrana externa y citoplasma. Estas proteínas forman canales que exportan activamente a un agente antimicrobiano fuera de la célula tan rápido como entra. Este mecanismo confiere resistencia a tetraciclinas, quinolonas, cloranfenicol, beta lactámicos, así como a los antisépticos y desinfectantes de tipo amonio 3,15,18 cuaternario utilizado para la limpieza de superficies (Pérez y Robles, 2013).

## **2.5 Criopreservación**

La criopreservación del semen y la inseminación artificial son técnicas reproductivas utilizadas para conseguir un rápido progreso genético. Sin embargo, la inseminación artificial con semen congelado, aun es insatisfactoria debido a la baja tasa de fertilidad en el ganado ovino, esto podría deberse a varios factores como los daños ocasionados en las membranas de los espermatozoides durante el proceso de criopreservación alterando su función metabólica, esto puede ser prevenido parcialmente mediante el control de la velocidad de congelamiento y uso de un diluyente adecuado (Ramos *et al.*, 2017).

De acuerdo a los resultados obtenidos por Ramos *et al.* (2017), se puede afirmar que la variación se debe a los diferentes tipos de diluyentes utilizados y a las características iniciales de semen fresco colectados, así como también al manejo del eyaculado y las técnicas de análisis que se utilizan para que la muestra presente un mejor comportamiento en la refrigeración de semen o posiblemente por el efecto protector del diluyente, que mejora las características de motilidad individual. Los resultados expresan una disminución gradual en el porcentaje de motilidad espermática a medida que transcurre el tiempo de equilibrio, se encontró en

promedio 68.22% y 63.33% para cuatro y ocho horas de equilibrio. El mejor tiempo de equilibrio es de cuatro horas con el diluyente que mostró mayor porcentaje de motilidad espermática en el semen diluido post-descongelamiento.

Vazquez *et al.* (2010) encontraron que las ovejas que fueron inseminadas empleando dosis seminales según la refrigeración tradicional a 5°C durante 6-8 horas y 24 horas no se obtuvieron diferencias en la fertilidad entre lotes.

## **2.6 Extracto de ajo (*Allium sativum*)**

Las especies de *Allium* son el género de interés médico más importante de la familia Alliaceae; el género incluye más de 700 especies distribuidas en el mundo, se distinguen por contener como componentes principales, compuestos sulfurados que le otorgan sus características organolépticas y medicinales. Son de fácil desarrollo y tienen larga vida post cosecha, además del consumo por sus características culinarias, es ampliamente utilizado por sus propiedades antimicrobianas, antioxidantes, antifúngicas, anticancerígenas e inmunoestimulantes (Mnayer *et al.*, 2014).

El olor característico se debe a dos sustancias que entran en su composición química, que son altamente volátiles: la aliina y la alicina; la primera (aliina) es la que se encuentra en mayor proporción; es un aminoácido que por oxidación enzimática (aliinasa) da origen a la alicina y luego al disulfuro de alilo, considerado como su principio activo. Éstas se disuelven con gran facilidad en los líquidos y en los gases. También se encuentran presentes en la planta diversos fermentos, vitamina A y vitaminas del grupo B. Presenta dos principios activos con propiedades antimicrobianas: alistatina I y II. Se ha identificado en el aceite esencial un compuesto denominado metil alil trisulfuro, con acción antiagregante plaquetario. Se ha informado un compuesto relativamente nuevo, probablemente una lactona, denominado como garlicina, a la cual se le atribuyen importantes propiedades antimicrobianas (Trujillo *et al.*, 2004). La alicina representa aproximadamente el 70% del total de tiosulfatos (compuestos sulfurados) presentes en los extractos de ajo extraídos mediante maceración mecánica. La alicina es un compuesto inestable y según las condiciones de almacenamiento se puede degradar

rápidamente a diallyl disulfuro, diallyl trisulfuro, S-allyl cisteína, S-allylmercaptocisteína, vinyl ditines y ajoene. Valores de pH muy bajos aceleran la degradación de este compuesto, el cual es el principal componente antibacterial del ajo fresco (Cárdenas, 2018).

Estudios *in vitro* realizados por Petropoulos *et al.* (2018) utilizando extracto de ajo demostraron un efecto bactericida sobre algunas bacterias Gram negativas: *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella Typhimurium*, *E. coli* y *Enterobacter cloacae*, y Gram positivas: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* y *Micrococcus flavus*.

Además, se observaron diferencias significativas entre los genotipos de ajo probados con respecto a las propiedades antimicrobianas, mientras que los extractos de ajo fueron más efectivos que los controles positivos contra *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina, *Escherichia coli* y *Proteus mirabilis*.

El mecanismo de acción de los componentes del ajo se basan en la inhibición de la síntesis de ARN bacteriano, generando una disminución en la síntesis de proteínas y enzimas, inhibiendo la replicación del ADN lo que reduce la capacidad del patógeno de producir enfermedad, además, estimulan al sistema inmune activando macrófagos y linfocitos T protegiendo la mucosa intestinal de la colonización del patógeno, también promoviendo el crecimiento de la flora bacteriana benéfica, el efecto probiótico se debe al mejorar la disponibilidad de energía por presencia de oligofruktosa, mientras que microorganismos patógenos como *Salmonella spp*, no puede metabolizar éste carbohidrato (Cárdenas, 2018).

Sin embargo, la mayoría de los estudios previos sólo se han centrado en las actividades antimicrobianas del ajo y los compuestos de azufre orgánico derivados del ajo o la diferencia entre el ajo y los antibióticos estándar, mientras que se sabe poco sobre el potencial del extracto de ajo fresco para mejorar la susceptibilidad de las cepas resistentes a múltiples fármacos y a los antibióticos convencionales (Guoliang, et al., 2015). En estudios realizados por Cun *et al.* (2018) la extracción con agua produjo la mejor actividad antimicrobiana, en comparación con el metanol y el etanol.

## 2.7 Antecedentes directos

Estudios realizados por Mocé *et al.* (2023) han demostrado que los eyaculados conservados durante 24 horas a 4 °C mostraron un aumento en las trayectorias no lineales e irregulares. Sin embargo, la composición bacteriana del semen cambió posteriormente a la preparación de las dosis y su posterior almacenamiento. La preparación de dosis de semen condujo a un cambio importante en la estructura de la comunidad bacteriana del eyaculado inicial, esto se refleja en las diferencias entre los eyaculados. Estos cambios se deben principalmente a la adición de leche desnatada como diluyente porque la leche tiene su propia microbiota. En total, 199 géneros bacterianos que no estaban presentes en los eyaculados se encontraron en el semen refrigerado y almacenado durante 24 horas. Debido a la amplia variabilidad en la composición bacteriana entre los lotes de leche es muy difícil de controlar al preparar el semen. De hecho, algunos autores observaron grandes variaciones en la microbiota de la leche cruda a través ubicaciones geográficas. En cuanto al efecto que las bacterias no viables presentes en la leche contienen lipopolisacáridos en sus paredes celulares, que son liberados cuando mueren y podrían dañar los espermatozoides. Sin embargo, es importante resaltar que al igual que hay bacterias patógenas, algunos grupos bacterianos mejoran calidad del semen, y cada vez hay más pruebas de que la microbiota del semen también puede influir en la fertilidad femenina al interactuar con el microbioma uterino.

Otros estudios realizados por Ganwar *et al.* (2021) mostraron que en la motilidad, viabilidad, integridad de la membrana plasmática e integridad acrosomal fueron influenciados negativamente por el aumento de la contaminación bacteriana del semen de machos cabríos. Mocé *et al.* (2022) encontraron que la microbiota del semen de los machos cabríos varía entre las temporadas reproductivas y no reproductivas. Además, los géneros *Sphingomonas* y *Faecalibacterium* podrían ser posibles biomarcadores de la calidad del semen en machos caprinos.

En estudios realizados por Entesar *et al.* (2022) la adición de extracto de ajo a un diluyente de semen restauró la mayoría de los efectos nocivos del estrés oxidativo sobre las propiedades del semen. El ajo tiene cualidades antioxidantes, como lo

demuestran los niveles más bajos de malondialdehído y aumento de las actividades de superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa y puede considerarse uno de los agentes antioxidantes más efectivos, protegiendo la célula del daño destructivo de los radicales libres (ROS). El diluyente que contiene extracto de ajo puede proteger a los espermatozoides de los efectos perjudiciales de ROS, mejorar la calidad del esperma y la fuente de energía durante el almacenamiento del semen, puede ser eficaz para mejorar la calidad del semen y las tasas de fertilidad.



### **III. HIPOTESIS**

El extracto de ajo, diluyente de base vegetal, 24 horas de refrigeración inhiben bacterias resistentes aisladas a partir de semen caprino fresco y refrigerado.

#### **IV. OBJETIVOS**

##### **Objetivo General**

Determinar el efecto del tiempo de refrigeración, diluyente y dosis de extracto de ajo (*Allium sativum*) sobre bacterias resistentes aisladas de semen fresco y refrigerado de caprinos.

##### **Objetivos específicos:**

- Determinar el efecto del tiempo de refrigeración sobre las UFC/ml del semen caprino
- Comparar las UFC/ml semen caprino con diluyentes de base vegetal y de base animal
- Cuantificar las bacterias(UFC/ml) presentes en el semen caprino fresco y refrigerado
- Aislar e identificar los agentes bacterianos presentes en semen caprino fresco y refrigerado.
- Evaluar si el extracto de ajo inhibe bacterias aisladas del semen caprino
- Realizar antibiogramas para evaluar la resistencia de las bacterias aisladas.

## **V. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **5.1 Descripción del área de estudio**

El estado de Sinaloa se ubica en el noroeste del país, entre las coordenadas 22°31' y 26°56' de Latitud norte y los 105° 24' y 109° 27' de longitud oeste. El estado cuenta con una superficie total de 58,200 km<sup>2</sup> de los cuales corresponden a su superficie continental y a su superficie insular. El estado de Sinaloa representa 2.9% de la superficie del país. Su clima es variado y presenta un relieve muy accidentado en el oriente, por la Sierra Madre Occidental, una cadena montañosa que va desde el norte de la entidad hasta el sur, y suroriente, donde se presentan cañones y lomeríos. La sierra es inclinada con caídos los cuales bajan hasta los 1000 metros y presenta montañas con altura superior a 2500 msnm. Las formaciones de un considerable número de serranías desligadas del maciso montañoso que afloran en su topografía, crean los extensos valles y la planicie costera del estado. Una de las regiones más montañosas de la entidad se localiza en el municipio de Badiraguato al que pertenecen las sierras de Surutato, Baragua, Cuervo de ciervo, Santiago de los Caballeros, Capirato y otras. Las temperaturas mínimas promedio son alrededor de 10.5°C en el mes de enero y las máximas promedio suelen ser mayores a 36°C durante los meses de mayo a julio. Las lluvias se presentan en el verano durante los meses de julio a septiembre, la precipitación anual promedio es de 790mm. El sector pecuario en Sinaloa tiene una población de caprinos de 190,045 cabezas (SIAP, 2021).

### **5.2 Definición de la población**

Se utilizaron 6 sementales caprinos de edades entre 1.5 y 4 años de edad, de las razas Nubia y Alpina francesa utilizados como reproductores en la unidad de ovinos y caprinos de la facultad de medicina veterinaria y zootecnia. Los machos cabríos fueron alimentados dos veces al día (8:00am y 4:00 pm) con concentrado lechero (16% PC) alfalfa, rastrojo de maíz y agua a libre acceso, se les dió un periodo de entrenamiento de 3 semanas previas al periodo de estudio.

### 5.3 Obtención de las muestras

Se realizaron colectas de semen caprino con 6 diferentes sementales por medio de vagina artificial después de estimular con una hembra en celo. Los sementales fueron expuestos a las hembras por un período de 5 min. La libido se midió en una escala de 0-3, siendo 0 la ausencia total de deseo sexual y 3 siendo el nivel más alto de deseo sexual (Qureshi *et al*, 2013). Después de la recolección, el semen se colocó en un baño maría a 37°C posteriormente se llevó al laboratorio para su evaluación. Los eyaculados fueron evaluados por volumen (ml), movimiento de masa (0-5), motilidad de los espermatozoides (%), anormalidad de los espermatozoides (%) y viabilidad de los espermatozoides (%) usando tinción de eosina-nigrosina y concentración espermática por hemocitómetro. Sólo eyaculados de entre 1,0 y 2,0 ml de volumen con una concentración de más de 2,500 millones por ml. Se seleccionaron con >75 % espermatozoides de espermatozoides móviles y >85 % de espermatozoides normales (Salmani *et al.*, 2014).

Se utilizaron dos diluyentes comerciales diferentes a base animal (yema de huevo) de nombre comercial Triladyl y a base vegetal (lecitina de soya) de nombre comercial Optixcell. Para preparar diluyente triladyl para semen caprino se requiere una cantidad de yema de huevo menor en comparación del semen de bovino y ovino. Proporcionalmente hablando, la yema de huevo para este caso representa el 5% de la mezcla, el agua el 75% y el 20% el concentrado de triladyl, el componente final contiene glicerol, ácido cítrico, fructosa, tampones y antibióticos(tilosina, gentamicina, espectinomicina y lincomicina)( Muñoz, 2018).

El diluyente de base vegetal optixcell se preparó de acuerdo a las instrucciones del fabricante (imv technologies) añadiendo 33% de concentrado del diluyente y 67% de agua inyectable.

Se prepararon 12 ml de diluyente a base animal y 12 ml de diluyente de base vegetal.

De cada eyaculado se prepararon cuatro muestras con diluyentes espermáticos de 1ml de volumen, dos muestras se prepararon con diluyente de base vegetal y dos de base animal, en donde a cada muestra se le agregaron 25 µl de semen fresco

(60 millones por ml), una muestra se refrigeró durante 4 horas y la otra durante 24 horas, para posteriormente ser llevadas al laboratorio de bacteriología y micología FMVZ-UAS para continuar con su procesamiento.

#### **5.4 Procesamiento de las muestras**

El procesamiento de las muestras se llevó a cabo en el Laboratorio de Bacteriología y Micología, ubicado en las instalaciones de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Sinaloa.

Para el semen fresco se utilizaron 540  $\mu$ l de agua peptonada bufferizada (PBS) y se le agregaron 60  $\mu$ l (1:10) de semen fresco los cuales se homogeneizaron a través de un mezclador (marca SCIOLOGEX modelo MX-S), posteriormente de la primera dilución se toman 60  $\mu$ l y se agregan a 540  $\mu$ l de PBS (dilución 1:100). Las muestras se sembraron 500  $\mu$ l en placas de agar base sangre suplementado al 8% con sangre equina con la técnica de extensión en placa.

Para las muestras con diluyentes se sembraron 500  $\mu$ l de semen con diluyente mediante la técnica de extensión en placa en placas con agar sangre.

Las placas se dejaron incubar por 48 horas a 37°C. Se realizó el conteo de Unidades formadoras de colonias (UFC/ml) a las 24 horas y a las 48 horas.

##### **5.4.1 Conteo de unidades formadoras de colonias (UFC)**

El conteo de las unidades formadoras de colonias (UFC/mL) trascurrido el tiempo de incubación fueron objeto de observación y conteo para su reporte mediante el uso de un cuenta colonias, y para calcular el número de UFC/ml en cada una de las muestras se tomó el número de colonias de la dilución contable, asumiendo una colonia es igual a una UFC/ml, se multiplicó dicha cantidad por el factor de dilución y esa fue la cantidad de UFC/ml de muestra (Vidaca *et al.*,2022).

### 5.4.2 Identificación bacteriana

Las colonias macroscópicamente diferentes entre sí se resembraron con un asa microbiológica debidamente esterilizada en agar sangre, estas colonias se tomaron directamente de las placas. Las placas fueron incubadas 24 horas a 37 °C.

Transcurrido el tiempo de incubación se tomó lectura del crecimiento bacteriano en las placas. Para la identificación presuntiva de las bacterias se tomó en cuenta la atmósfera de crecimiento, el medio de cultivo, tamaño, textura, borde y color de la colonia (Bou *et al.*, 2011).

### 5.4.3 Pruebas bioquímicas

Se realizaron pruebas bioquímicas para observar el metabolismo bacteriano y confirmar la identificación. Estas fueron: catalasa, fermentación de manitol, maltosa, sorbitol, gelatina nutritiva, citrato de Simmons, agar de hierro y triple azúcar (TSI), agar de hierro y lisina (LIA), medio de sulfuro indol motilidad (SIM), agar bilis esculina (BE), ureasa y oxidasa.

Catalasa: prueba primaria para evidenciar la presencia de la enzima catalasa o peroxidasa por parte de las bacterias al exponerlas a una solución de peróxido de hidrógeno (Figuroa *et al.*, 2014).

Fermentación de manitol: se trata de un medio (manitol salado) altamente selectivo por alta concentración salina y diferencial, debido a la capacidad de fermentación del manitol (carbohidrato) por los estafilococos. Los estafilococos que fermentan manitol producen ácidos con los que se modifica el pH del medio y vira el indicador de color rojo a amarillo (Kaiser, 2017).

Fermentación de carbohidratos (maltosa y sorbitol): se fundamenta en la capacidad de la bacteria de fermentar u oxidar ciertos carbohidratos (maltosa, sorbitol), los cuales son incorporados a una base que contiene rojo de fenol como indicador de pH (Figuroa *et al.*, 2014).

Gelatina nutritiva: La gelatina nutritiva se utiliza para la diferenciación de microorganismos sobre la base de la producción de gelatinasa en un entorno de laboratorio (Kaiser, 2017).

Citrato de Simmons: determinar si un microorganismo es metabólicamente capaz de utilizar citrato como única fuente de carbono, lo que produce alcalinización del medio (Figueroa *et al.*, 2014).

Agar de hierro triple azúcar: determina si los microorganismos fermentan carbohidratos. Si el microorganismo fermenta únicamente glucosa el medio cambiará a amarillo en el fondo, si fermenta lactosa o sacarosa cambiará a amarillo en la superficie. En caso de producir una reacción alcalina el medio se torna rojo. La producción de gas se observa como burbujas en el agar. La producción de ácido sulfhídrico se observa un precipitado de un color negro en el agar (Figueroa *et al.*, 2014).

Agar hierro lisina: Prueba empleada para diferencias especialmente *Salmonella* spp, basado en la descarboxilación y desaminación de la lisina y en la producción de ácido sulfhídrico. Los microorganismos fermentadores de glucosa acidifican el medio y provocan el viraje de color púrpura al amarillo. El ambiente ácido favorece la actividad enzimática descarboxilasa y se metaboliza la lisina a cadaverina elevando el pH del medio y cambiándolo a color púrpura. Los microorganismos fermentadores de glucosa que no tienen actividad lisina descarboxilasa producen el viraje de la totalidad del medio a color amarillo. A las 24 horas de incubación se observa el fondo del tubo de color amarillo y la superficie color violeta debido al consumo de peptonas donde producen alcalinidad, la generación de sulfuro de hidrógeno se visualiza por la coloración negra del medio. Las cepas de los géneros: *Proteus* spp, *Providencia* spp, *Morganella* spp, desaminan la lisina. Estos producen ácido alfa ceto carbónico, junto con la sal de hierro y con oxígeno forma un color rojizo en la superficie del medio (Kaiser, 2017).

Medio de sulfuro indol motilidad: en esta prueba se consideran tres lecturas, producción de sulfuro de hidrógeno, producción de indol y motilidad. En la primera el sulfato ferroso y el citrato amónico reaccionan con el sulfuro de hidrógeno que se produce a partir del tiosulfato de sodio, provee los átomos de azufre requeridos por las bacterias, se produce un precipitado negro insoluble de sulfuro ferroso. En la segunda se basa en la degradación del triptófano (tripteína) al suceder la

degradación del medio por medio de la enzima triptofanasa, la cual es producida por algunas bacterias. El indol desdoblado de la molécula de triptófano puede ser detectado cuando se combina con el aldehído del reactivo de Kovac y da un color rojo en la superficie del medio. La motilidad determina si una bacteria es móvil en un medio semisólido, lo cual se observa como turbidez (Figuroa *et al.*, 2014).

Agar bilis esculina: Basada en la hidrólisis de la esculina, la cual con iones de hierro forma un complejo fenólico oscuro o negro (Figuroa *et al.*, 2014).

Ureasa: Tiene como finalidad evidenciar la capacidad de la bacteria de sintetizar enzima ureasa, la cual puede descomponer compuestos de carbamidas (urea), dando como resultado dos moléculas de amoníaco que alcalinizan el medio (Figuroa *et al.*, 2014).

Oxidasa: prueba para determinar la presencia de la enzima citocromo oxidasa, que es un aceptador fijo de electrones durante el proceso de óxido-reducción (Figuroa *et al.*, 2014).

#### **5.4.4 Frotis fijo y tinción de Gram**

Para la fijación de los frotis, se colocó una gota de agua destilada en un portaobjetos y se homogenizó una asada de la colonia a identificar de acuerdo con la técnica utilizada por Goularte *et al.* (2020). Posteriormente, se fijó al fuego y se procedió a teñir con la técnica de Gram siguiendo las instrucciones del fabricante HYCEL reactivos químicos. Las bacterias Gram positivas se diferenciaron tomando color azul, violáceo o morado, mientras que las Gram negativas aparecen de color rojo, rosa o rosáceo.

#### **5.5 Susceptibilidad a antibióticos**

Para la resistencia en bacterias Gram positivas y Gram negativas, se realizaron pruebas de inhibición *in vitro* utilizando el método de Kirby-Bauer de difusión en disco (EUCAST, 2022; CLSI, 2021). Como control se utilizó la cepa ATCC 25923 *S. aureus* de acuerdo al CLSI M100 y M45. Una vez identificadas las bacterias se realizaron antibiogramas para comprobar la resistencia bacteriana, para esto se sembró un inóculo (2 o 3 colonias) en solución salina 0.9%, hasta alcanzar una escala visual de  $6 \times 10^8$  bacterias. Una vez alcanzado, se tomó un hisopo estéril, se



sumergió en la solución para impregnarlo con el cultivo, retirando el exceso de éste al presionar el hisopo contra las paredes del tubo. Luego, con el hisopo se realizó un estriado continuo cruzado en las cajas de petri en agar Müeller-Hinton y agar sangre, se dejaron reposar las placas 5 min para la absorción del inóculo (Vidaca *et al.*, 2022). Después, se colocaron los discos con antibióticos (tetraciclina, eritromicina, ampicilina, gentamicina, sulfametoxazol con trimetoprim y penicilina) del multidisco (multibac ID PT-36) para Gram positivos y por último se incubaron por 24 y 48 horas. Esto se realizó por triplicado. Los halos de inhibición se midieron con un verniel. Para determinar la resistencia se toma en cuenta lo siguiente: halo de inhibición  $\geq 20$  mm es susceptible, de 15-19 mm resistencia intermedia y  $\leq 14$  resistente (CLSI M100, 2020).

### **5.6 Preparación de extracto de ajo (*Allium sativum*)**

Los bulbos de ajo fueron adquiridos en un supermercado local, a cada bulbo se le retiró la hoja para obtener la parte comestible, se lavó con agua destilada e hipoclorito de sodio (200 ppm) respectivamente, y posteriormente se enjuagó con agua destilada estéril para retirar los residuos de hipoclorito. Posteriormente se maceró en un mortero estéril y con ayuda de una gasa estéril se filtró el macerado para obtener el extracto al 100% (Cárdenas, 2018). Las concentraciones que se utilizaron fueron: 0.05%, 0.01% y 0%. El extracto se diluyó con agua estéril para obtener las concentraciones deseadas.

En total se probaron 9 tratamientos: 1- control (Agua inyectable estéril), 2- Extracto de ajo al 0.001%, 3- Extracto de ajo al 0.05%, 4- Triladyl, 5- Optixcell, 6- Triladyl con ajo al 0.001%, 7- Triladyl con ajo al 0.05%, 8- Optixcell con ajo al 0.001% y 9- Optixcell con ajo al 0.05%.

#### **5.6.1 Susceptibilidad al extracto de ajo**

Para medir la susceptibilidad al extracto de ajo se utilizó una metodología similar a la de Guoliang *et al.* (2015) en agar Muller-Hinton se impregnaron discos de papel filtro Whatman N° 2 (6 mm de diámetro), un disco por cada tratamiento, se pipetearon 10  $\mu$ l por disco de cada solución.

Las placas se dejaron en una mesa plana durante una hora hasta que el disco de papel absorbió la solución. Las placas inoculadas se incubaron a 37°C durante 24 y 48 horas. Luego se evaluó la actividad midiendo el diámetro de las zonas de inhibición utilizando un verniel.

### **5.7 Análisis estadístico**

Para el análisis de los datos se realizaron pruebas de normalidad (Anderson Darling) análisis de la varianza de un solo factor y comparaciones de medias por el método de Tukey con un valor de alfa de 0.05. Se utilizó el paquete estadístico Minitab 18 y SAS "Statistical Analysis System".

## VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La invasión del tracto urogenital masculino por microorganismos y sus efectos posteriores sobre la capacidad de fertilización de los espermatozoides no se ha discutido bien en los machos cabríos (Ganwar *et al.*, 2021) Los resultados de nuestra investigación nos muestra presencia de bacterias en el semen fresco de los sementales lo que coincide con Mocé *et al.* (2023) los eyaculados presentan su propia microbiota por lo cual existe un vínculo entre la microbiota de los eyaculados y la calidad del esperma.

Cuadro 1. Conteo de UFC/ml de muestras incubadas 24 horas de semen fresco (dilución 1:100).

Semental	UFC/ml
1	1000
2	18600
3	13000
4	127800
5	15000
6	600

\*Los resultados obtenidos del conteo de colonias se multiplico por dos y por el factor de dilución.

Para obtener los máximos beneficios de la inseminación artificial, es necesario diluir y prolongar la vida útil de los espermatozoides una vez recolectados. Esto es logrado por medio de extensores y mediante la reducción del metabolismo de los espermatozoides. Con esperma de macho cabrío, las dosis refrigeradas son normalmente almacenadas a 4°C y los diluyentes a base de leche desnatada o yema de huevo son de uso común, a pesar de que existen otros diluyentes comerciales que sustituyen el ingrediente de origen animal por la lecitina de soya (Mocé *et al.*, 2023).

El uso de semen refrigerado es relativamente común en cabras. Hay una serie de ventajas de las dosis de semen refrigerado, que incluyen un manejo más fácil de las dosis de inseminación artificial (IA), transporte, más dosis de IA por eyaculado y tasas de fertilidad más altas en comparación con las dosis de IA congeladas

(Sadeghi, et al., 2020). La preparación de dosis de semen condujo a un cambio importante en la estructura de la comunidad bacteriana del eyaculado inicial (Mocé, et al., 2023).

Cuadro 2. Conteo de unidades formadoras de colonia de semen refrigerado 4 horas.

Tiempo de refrigeración 4 horas		
	diluyente base animal	diluyente base vegetal
Semental	UFC/ml	UFC/ml
1	56	0
2	42	10
3	54	6
4	40	92
5	48	10
6	30	2

\*Los resultados del conteo de colonias se multiplicó por dos para obtener el conteo por 1mL.

Los eyaculados se prepararon con diluyentes de base animal y de base vegetal en donde se encontró crecimiento bacteriano a las 48 horas de incubación ya que a las 24 horas no hubo crecimiento bacteriano. En estudios realizados por Mocé *et al.*, (2023) encontraron que la preparación de dosis seminales, el diluyente y su posterior conservación provoca un cambio significativo en la estructura de la comunidad bacteriana del eyaculado.

Cuadro 3. Conteo de unidades formadoras de colonia se semen refrigerado 24 horas.

Tiempo de refrigeración 24 horas		
Semental	diluyente base animal	diluyente base vegetal
	UFC/ml	UFC/ml
1	4	0
2	6	8
3	2	2
4	6	28
5	2	2
6	0	2

\*Los resultados del conteo de colonias se multiplicó por dos para obtener el conteo por 1 mL.

En nuestro estudio obtuvimos conteos mayores de UFC/ml a las 4 horas de refrigeración con las dosis de semen con diluyente de base animal como se observa en el cuadro 2 y 3.

En el cuadro 4 se observa que no hubo diferencia estadística entre diluyentes, sin embargo, si hay diferencia entre tiempos de refrigeración, en donde utilizar tiempos de refrigeración de 24 horas disminuyó la carga bacteriana del semen en comparación con 4 horas de refrigeración. Rosas *et al.* (2023) encontró que la técnica de 24 horas de estabilización resultó ser la mejor para la criopreservación del semen caprino, en donde no se vio afectada la motilidad total y progresiva, así como la integridad de la membrana plasmática durante la criopreservación.

Cuadro 4. Comparación de unidades formadoras de colonia a 4 y 24 horas de refrigeración con diluyente de base animal y base vegetal.

Diluyente	n	Media± DE	Agrupación	valor P
Triladyl 4 horas	6	45 ± 9.69	A	0.049
Optixcell 4 horas	6	20.33 ± 35.29	A B	
Optixcell 24 horas	6	7 ± 10.63	B	
Triladyl 24 horas	6	3.33 ± 2.42	B	

Comparaciones utilizando el método de Tukey con un nivel de confianza del 95%; DE= Desviación estándar.

Los antibióticos incluidos en el diluyente de base vegetal optixcell (500 UI de estreptomina por ml 500 UI de penicilina por ml 150 mg de lincomicina por ml 300 mg de espectinomicina por ml) están en mayores cantidades por mL en comparación con el diluyente de base animal Triladyl (Tilosina 5.7 mg, gentamicina 28.6 mg, espectinomicina 34.3 mg y lincomicina 17.2 mg por cada 100 mL). En el cuadro 3 el animal número 4 con el diluyente de base vegetal se comportó diferente a los otros posiblemente porque alguna de las bacterias presentes en esa muestra es resistente a los antibióticos que contiene el diluyente. los antibióticos se clasifican en dependientes de tiempo y dependientes de concentración. Los primeros (betalactámicos, glucopéptidos) pueden requerir ajustes en el tiempo de infusión y los dependientes de concentración (aminoglucósidos, fluoroquinolonas) se basan en la concentración Máxima y concentración mínima inhibitoria (C<sub>máx</sub>/MIC) (Carrillo *et al.*, 2013). Por lo anterior se explica qué hay diferencia entre diluyentes a las 4 horas de refrigeración, pero habiendo resistencia de alguna de las bacterias esto se ve reflejado en las UFC/ml a las 24 horas.

Sin embargo, según Mocé *et al.* (2023) no se puede descartar que las bacterias ambientales contaminan las dosis durante el procesado, por lo que pueden ser las responsables de las diferencias detectadas en la diversidad entre el semen refrigerado durante 0 horas y el de 24 horas.

Ya que la colecta de semen no es un proceso estéril el hecho de haber obtenido una baja cantidad de colonias en comparación con los conteos de semen fresco, puede sugerir que la mayoría de las bacterias encontradas en el semen fresco son

sensibles a los antibióticos de los diluyentes sin embargo las colonias encontradas en las dosis con diluyentes pueden ser resistentes a los antibióticos que éstos contienen.

En el cuadro 5 se muestra la morfología macroscópica y microscópica de las cepas aisladas, éstas fueron Gram positivas.

Cuadro 5. Morfología colonial y tinción de Gram.

Cepa	Características macroscópicas	Gram	microscópicamente
1	mediana borde irregular, transparente sin brillo no pigmentada, rugosa plana suave.	+	Bacilos
2	pequeña borde circular entero con brillo pigmentada (rosado) convexa mucoide	+	Cocos

\* Características macroscópica, microscópica y reacción a la tinción Gram de las cepas aisladas.

De las cepas aisladas se les realizaron pruebas bioquímicas, de las cuales se ha identificado *Kocuria spp* y *Bacillus spp*, lo que concuerda con los resultados de Duracka *et al* (2021), las muestras de semen distribuidas en el grupo de calidad excelente contenían especies que representaban los géneros *Kocuria* y *Bacillus* en eyaculados bovinos. Igualmente Xinyue *et al.* (2024) aislaron *Kocuria spp*, en muestras seminales de patos. Además Pereira *et al.* (2022) aislaron *Kocuria spp* de muestras de leche de vacas con mastitis.

*Kocuria spp* coloniza sitios como mucosas, orofaringe y piel de mamíferos. Estos organismos oportunistas han sido aislados de casos de meningitis, sepsis y neumonía en humanos (Bhaiyat *et al.*,2013). Bassan *et al.* (2022) reportaron este patógeno como causante de endometritis supurativa crónica, por lo que debe considerarse en el diagnóstico diferencial de las infecciones del tracto reproductivo en las hembras de los petauros del azúcar.

El aislamiento y la importancia clínica de esta bacteria a partir de muestras justifica mucha precaución ya que no necesariamente confirma la infección debido a su presencia ubicua, y como algo normal del microbioma de la piel y mucosas en

humanos y animales, sino que es importante que los microbiólogos clínicos identifiquen y enumeren la virulencia y patrones de susceptibilidad a los antibióticos de dicha bacteria (Kandi *et al.*, 2016).

Cuadro 6. Pruebas bioquímicas

Prueba bioquímica	<i>Kocuria spp</i>	<i>Bacillus spp</i>
gelatina nutritiva	-	+
bilis esculina	-	+
agar triple azúcar	K/N	K/N
hierro lisina	N/N	N/N
citrato de Simmons	-	-
Sulfuro	-	-
Indol	-	-
Motilidad	-	-
voges proskauer	-	-
Ureasa	-	-
Manitol	-	+
Sorbitol	-	-
Catalasa	+	+
Oxidasa	-	-
Coagulasa	-	-

Ngo *et al.* (2023) encontraron de 3 a 10 tipos de bacterias (*Estafilococos spp*, *Proteus spp*, *Micrococcus spp*, *Bacillus megaterium*) en eyaculados de cerdos.

Boonthai *et al.* (2016) encontraron diez especies bacterianas en semen recolectado de peces púa plateada (*Barbodes gonionotus*) las cuales fueron: *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus cohnii subsp. cohnii*, *Kocuria varians*, *Bacillus megaterium*, *Sphingomonas paucimobilis*, *Flavobacterium aquatile*, *Aeromonas punctata subsp. caviae*, *Bacillus safensis*, *Brevibacillus laterosporus* y *Comamonas testosteroni*.

Ballas *et al.* (2021) Realizaron cultivos endometriales en vacas previos a la inseminación artificial, sin embargo encontraron que las vacas con endometritis leve en el momento de la IA no albergaban *Bacillus licheniformis* ni *Bacillus subtilis*. Lo anterior sugiere que posiblemente las bacterias pudieron llegar a través del semen, equipos o personas.



Cuadro 7. Prueba de susceptibilidad al ajo de *Bacillus spp.*

<i>Bacillus spp</i>				
Tratamiento	N	Media	Agrupación	Valor p
6	3	19.873	A	>0.05
4	3	19.697	A	
5	3	19.387	A	
9	3	18.11	A	
8	3	17.947	A	
7	3	17.647	A	
EEM		0.541		

Comparaciones utilizando el método de Tukey con un nivel de confianza del 95% \* los tratamientos 1, 2 y 3 fueron omitidos del análisis ya que no hubo efecto. 4- Triladyl, 5- Optixcell, 6- Triladyl con ajo al 0.001%, 7- Triladyl con ajo al 0.05%, 8- Optixcell con ajo al 0.001% y 9- Optixcell con ajo al 0.05%.

De acuerdo al cuadro 7 en las pruebas de susceptibilidad al extracto de ajo no hubo efecto sobre las bacterias, posiblemente si se aumenta el número de n podríamos ver reflejada alguna diferencia por lo menos entre diluyentes, sin embargo según Guoliang *et al.* (2015) la mayoría de los estudios previos sólo se han centrado en las actividades antimicrobianas del ajo y los compuestos de azufre orgánico derivados del ajo o la diferencia entre el ajo y los antibióticos estándar, mientras que se sabe poco sobre el potencial del extracto de ajo fresco para mejorar la susceptibilidad de las cepas resistentes a los antibióticos convencionales.

Cuadro 8. Prueba de susceptibilidad al extracto de ajo de *Kocuria spp.*

<i>Kocuria spp</i>				
Tratamiento	n	Media	Agrupación	Valor p
7	3	12.917	A	0.002
4	3	12.863	A	
6	3	12.15	A B	
8	3	11.337	A B	
9	3	11.243	B	
5	3	10.753	B	
EEM		0.336		

Comparaciones utilizando el método de Tukey con un nivel de confianza del 95% \* los tratamientos 1, 2 y 3 fueron omitidos del análisis ya que no hubo efecto. 4- Triladyl, 5- Optixcell, 6- Triladyl con ajo al 0.001%, 7- Triladyl con ajo al 0.05%, 8- Optixcell con ajo al 0.001% y 9- Optixcell con ajo al 0.05%.

En el cuadro 8, los resultados de *Kocuria spp* mostraron diferencias de susceptibilidad entre diluyentes en donde el diluyente de base animal Triladyl obtuvo el mayor efecto de inhibición en comparación con el diluyente de base vegetal Optixcell, lo que significa que la cepa posiblemente sea resistente a por lo menos uno de los antibióticos que el diluyente contiene.

En las pruebas de susceptibilidad a los antibióticos la cepa de *Bacillus spp* presentó sensibilidad a eritromicina, gentamicina, sulfametoxazol con trimetoprim y penicilinas. Una resistencia intermedia a tetraciclina y ampicilina. Adamski *et al.* (2023) identificaron noventa cepas de *Bacillus spp*. De muestras de leche, en donde todos los aislados fueron susceptibles al cloranfenicol y al meropenem. Los perfiles de resistencia a los antibióticos de los grupos analizados de *Bacillus spp*. diferían entre sí, lo que es especialmente preocupante en relación con los representantes multirresistentes del grupo *B. cereus* resistentes a cefotaxima (94,29%), ampicilina (88,57%), rifampicina (80%) y norfloxacin (65,71%). Así mismo, Chad *et al.* (2022) identificaron microorganismos pertenecientes a *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Proteus spp*, *Klebsiella spp*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Actinomyces spp*, *E. coli*, *Rhodococcus spp*, *Neisseria spp* y *Micrococcus spp* de semen fresco y congelado de toros cruzados Frieswal. Las pruebas de sensibilidad a los antibióticos de los aislados bacterianos revelaron que la bencilpenicilina resultó ser la menos eficaz contra los organismos aislados, mientras que la gentamicina y la espectinomicina resultaron ser las más eficaces entre los antibióticos utilizados. La lincomicina, la tilosina y la estreptomina mostraron una eficacia moderada contra los aislados bacterianos.

La cepa de *Kocuria spp* presentó sensibilidad a tetraciclinas, ampicilina, gentamicina y penicilina, una resistencia intermedia a la eritromicina y altamente resistente al sulfametoxazol con trimetoprim. Ziogou *et al.* (2023) basados en una búsqueda en las bases de datos Pubmed y Scopus, revisaron todos los casos publicados de infecciones por *Kocuria spp* en humanos. La especie aislada con mayor frecuencia fue *K. kristinae* (46,1%), y la resistencia antimicrobiana fue menor para vancomicina (7%) y tetraciclinas (6,7%).

De los antibióticos probados la penicilina está presente en el diluyente de base vegetal y la gentamicina está presente en el diluyente de base animal. *Bacillus spp* fue aislada del semen fresco de los sementales, que al combinar con los diluyentes ya no se hizo presente. En el caso de *Kocuria spp* fue aislada de muestras con diluyente optixcell refrigerado 4 horas, sin embargo, a las 24 horas de refrigeración ésta bacteria ya no se presentó, posiblemente por la sensibilidad que tiene a la penicilina que es un antibiótico no solo dependiente de la concentración, sino que también es dependiente del tiempo.

## **VII. CONCLUSIÓN**

En conclusión, los resultados de esta investigación nos muestran hay presencia de bacterias en el semen fresco de los caprinos. Sin embargo, al combinar el semen con los diluyentes disminuye la carga bacteriana que se vio muy influenciada por el tiempo de refrigeración, en donde a mayor tiempo de refrigeración menor carga bacteriana, sin embargo, a pesar de esto, se siguen encontrando colonias bacterianas, aunque en menor proporción que en el semen fresco debido a que los diluyentes contienen antibióticos, lo que significa que hay resistencia a los antibióticos que contienen los diluyentes. Estos resultados confirman la necesidad de realizar más investigaciones sobre las propiedades que tiene el extracto de ajo sobre las bacterias presentes en el semen caprino para prevenir la propagación de la resistencia a los antibióticos entre las cepas patógenas, que es un problema de salud pública creciente.

## VIII. LITERATURA CITADA

Abro, S. H., 2016. Antibiograma de *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus intermedius* aislado del semen congelado bovino. *Abro, S. H. (2016). Antibiograma de Micrococcus luteus, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus epidermidis Biología Pura y Aplicada*, pp. 204-212.

Adamski, P. y otros, 2023. Prevalence and antibiotic resistance of *Bacillus* sp. Isolated from raw milk. *Microorganisms*, 11(4), p. 1065.

Ahmed, E. y otros, 2017. Bacterial contamination of ram semen used for artificial insemination in indigenous ewes. *The Bangladesh Veterinarian*, Volumen 34, pp. 20-26.

Aires, V., Hinsch, K., Mueller, F. & Bogner, K., 2003. In vitro and in vivo comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of bovine semen. *Theriogenology*, Volumen 60, pp. 269-279.

Al Naib, A. y otros, 2011. Effect of duration of storage at ambient temperature on fertilizing ability and mucus penetration ability of fresh bovine sperm. Volumen 76, pp. 1070-1075.

Andrade, G. A. & Palma, R. C., 2020. *Efecto de dos diluyentes y tiempo de permanencia sobre la viabilidad del semen de bovinos mestizos lecheros*. s.l.:Calceta: ESPAM MFL.

Azawi, O. I. & Ismaeel, M. A., 2011. Efectos de las estaciones en algunos parámetros del semen y la contaminación bacteriana del semen de Awassi ram. *Reproducción en animales domésticos*, Volumen 47, pp. 403-406.

Ballas, P. y otros, 2021. Characterization of intrauterine cultivable aerobic microbiota at the time of insemination in dairy cows with and without mild endometritis. *Theriogenology*, Volumen 159, pp. 28-34.

Bandeira, T. y otros, 2015. The use of skimmed dried milk as an alternative diluent for the cooling step during the boar semen freezing procedure. *Ciencias Agrarias*, Volumen 36, pp. 2023-2030.

Bassan, T. y otros, 2022. Reproductive tract infection caused by *Kocuria Kristinae* in an entire female sugar glider (*Petaurus breviceps*). *Vet Rec Case Rep*, Volumen 10, p. 507.

Bhaiyat, M. y otros, 2013. Isolation of coagulase-negative *Staphylococcus* spp. and *Kocuria Varians* in pure culture from tissues of cases of mortalities in parrots in Grenada West Indies.. *Internationa Journal of Veterinary medicine*.

Bittencourt, R. F., Ribeiro, F., Chalhoub, M. & Alves, S., 2008. Efeito de um quelante de cálcio, um detergente e da lecitina de soja sobre a qualidade do semen caprino congelado-descongelado. *Braz J. Vet. Res. Anim. Sci.*, Volumen 45, pp. 305-312.

Bonilla, C. S., 2000. *Efecto de la refrigeracion de semen de carnero durante 24 horas sobre el transporte espermático*. Montevideo, Uruguay: Universidad de la Republica.

Boonthai, T. y otros, 2016. Semen collection methods affect the bacterial composition of post-thawed semen of silver barb (*Barbodes gonionotus*). *Animal Reproduction Science*, Volumen 166, pp. 90-98.

Bou, G., Fernández, A., Sáez, J. A. & Valdezate, S., 2011. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enferm Infec Microbiol Clin*, pp. 601-608.

Burroughs, C., Graham, J., Lenz, R. & Seidel, G., 2013. Efectos del plasma seminal sobre los espermatozoides bovinos de clasificación sexual. *Teriogenología*, 79(3), pp. 551-557.

Bustani, G. S. & Baiee, F. H., 2021. Semen extenders: An evaluative overview of preservative mechanisms of semen and semen extenders. *Veterinary World*, Volumen 14, pp. 1220-1233.

Cabrera, C., Gomez, R. & Zúñiga, A., 2007. La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación. *Colombia Médica*, 38(2), pp. 149-158.

Cárdenas, M., 2018. *Actividad inhibitoria del extracto de ajo (Allium sativum) contra Salmonella spp aislada de heces de gallinas en producción de huevo*. Culiacán, Sinaloa: s.n.

Carrillo, E., Zavaleta, B. & Alvarez, A., 2013. La importancia de los parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos en la prescripción de antibióticos. *FAC MED*, Volumen 563.

Cavestany, D., 1994. Procesamiento y congelación de semen de toro. *Montevideo, Santa Catalina*, p. 23.

Centrón, D., 2012. *Antibióticos*. Buenos Aires, Argentina, IMPAM UBA/CONICET.

Chad, N., Pande, M., Thiagy, S. & Sirohi, A., 2022. Antibioqram of microorganisms isolated from fresh and frozen semen of crossbred frieswal bulls. *Cryoletters*, 43(6), pp. 322-327.

Chaudhari, D. V., Dharni, A. J., Hadiya, K. K. & Patel, J. A., 2015. Relative efficacy of egg yolk and soya milk-based extenders for cryopreservation (-196°C) of buffalo semen. *Veterinary World*, Volumen 8, pp. 2231-0916.

Cun, C. y otros, 2018. Broad-spectrum antimicrobial activity, chemical composition and mechanism of action of garlic (*Allium sativum*) extracts. *Food Control*, Volumen 86, pp. 117-125.

Díaz, L., 2003. Resistencia bacteriana. *Rev Cub Med Mil*, 8(1).

Duracka, M. y otros, 2021. Bacterial communities in bovine ejaculates and their impact on the semen quality. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 67(6), pp. 438-449.

Duracka, M. y otros, 2020. Las bacterias pueden deteriorar la motilidad progresiva de los espermatozoides bovinos y los parámetros bioquímicos del plasma seminal. *Revista de microbiología, biotecnología y ciencias de los alimentos*, pp. 844-847.

Entesar, Z., Basant, M., Yasser, S. & Abdelwahab, A., 2022. Vital Role of Garlic Extract Additive in Cryopreservation and Freezing of Buffalo Bulls Sperm. *Advances in Animal and Veterinary Sciences*.

Fernandez, A. y otros, 2021. Effects of Extender Type, Storage Time, and Temperature on Bull Semen Parameters. Volumen 10, p. 630.

Fernández, D., Quiróz, M. & Cuevas, O., 2021. *Los Antibióticos y su Impacto en la Sociedad*. s.l., Medisur.

Figeroa, I., Mena, R. & Mojica, M., 2014. Géneros Bacterianos: Pseudomonas. En: *Atlas fotografico de laboratorio de bacteriología y micología veterinarias*. s.l.:UNAM, p. 80.

Figueroa, I., Mena, R., Mojica, M. & Aguilar, F., 2014. *Atlas fotografico de laboratorio de bacteriología y micología veterinaria*. México: UNAM.

Gallego, V., Arango, S. & Ospina, L., 2014. Actividad espermicida de saponinas esteroidales y triterpénicas extraídas de diferentes plantas. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, Volumen 19, pp. 76-84.

Gamero, M., García, A., Rodríguez, F. & Ibarra, A., 2007. Sensibilidad y resistencia de *Pseudomonas aeruginosa*. *Prous Science*.

Gangwar, C., Dinkar, S., Kumar, A. & Saraswat, S., 2020. Effect of diluent sugars on capacitation status and acrosome reaction of spermatozoa in buck semen at refrigerated temperature. *Tropical Animal Health and Production*, p. 3409–3415.

Ganwar, C., Kumar, A., Gururaj, K. & Kumar, A., 2021. Semen quality and total microbial load: An association study in important Indian Goat breeds during different seasons. *Andrologia*.

García, F., 2001. Resistencia bacteriana a antibióticos. *Acta méd. costarric*, 43(3).

Goshme, S., Asfaw, T., Demiss, C. & Besufekad, S., 2021. Evaluación de la motilidad y morfología del semen de toro congelado bajo diferentes métodos de

descongelación utilizados para la inseminación artificial en la zona de Shewa del Norte, Etiopía. *Heliyon*, 7(10).

Goularte, K. L. y otros, 2020. Antibiotic resistance in microorganisms isolated in a bull semen stud. *Reproduction in Domestic Animals*, Volumen 55, p. 318.

Guoliang, L. y otros, 2015. Fresh garlic extract enhances the antimicrobial activities of antibiotics on resistant strains in vitro. *Jundishapur J Microbiol*, 8(5).

Hafez, E., 1996. *Reproducción e inseminación artificial en rumiantes*. 6 ta edición ed. s.l.:McGraw-Hill.

Hazim, J., 2013. Effect of diluent supplementation with garlic extract on semen quality of cocks during liquid storage. *Theriogenology Insight*, 3(1), pp. 25-34.

Hernández, L., Rubio, J. & Quintero, A., 2020. Efecto de la criopreservación sobre la morfometría de la cabeza espermática en semen de caprinos. *Universidad de Zulia Revista Científica*, pp. 27-33.

INEGI, 2009. *Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos, Culiacán, Sinaloa*. Instituto Nacional de Estadística Geográfica e Informática. Gobierno del estado. [En línea] Available at: <http://www3.inegi.org.mx/sistemas/mexicocifras/>

Institute, C. a. L. S., 2020. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Volumen 28.

Jareño, N., 2017. [www.interempresas.net](http://www.interempresas.net). [En línea] [Último acceso: 21 03 2023].

Kaiser, G. E., 2017. *Manual de Laboratorio de Microbiología*. El Colegio Comunitario del Condado de Baltimore, Campus de Catonsville. UK: s.n.

Kandi, V. y otros, 2016. Emerging Bacterial Infection: Identification and Clinical Significance of *Kocuria* Species. *Cureus*.

Ledezma, R. A. y otros, 2014. Effect of cooling on sperm motility before and after frozen-thawed stallion semen. *African journal of biotechnology*, 13(12), pp. 1439-1443.

Lipar, J. L., Ketterson, E. D., Nolan, V. & Casto, J. M., 1999. Egg Yolk Layers Vary in the Concentration of Steroid Hormones in Two Avian Species. *General and Comparative Endocrinology*, Volumen 115, pp. 220-227.

Lonergan, P., 2018. Historical and futuristic developments in bovine semen technology. *Animal*, Volumen 12, pp. 4-18.

Maxwell, W. M. & Stojanov, T., 1996. Liquid storage of ram semen in the absence or presence of some antioxidants. *Reprod. Fertil. Dev.*, pp. 1013-1020.

Mnayer, D. A. y otros, 2014. Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of six essential oils from the Alliaceae family. *Molecules*, 19(12), pp. 20034-20053.

Mocé, M., Esteve, I., Gómez, E. & Pérez, S., 2023. Microbial composition of goat buck's ejaculates is modified by the process of preparing and storing refrigerated semen doses. *Theriogenology*, Volumen 209, pp. 202-212.

Mocé, M. L. y otros, 2022. Microbiota in goat buck ejaculates differs between breeding and non-breeding seasons. *Sec. Animal Reproduction - Theriogenology*, Volumen 9.

Moreno, C., Gonzalez, R. & Beltrán, C., 2009. Mecanismos de resistencia antimicrobiana en patógenos respiratorios. *Rev Otorrinolaringol*, Volumen 69, pp. 185-192.

Moussa, M. y otros, 2002. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. *Theriogenology*.

Muñoz, A. K., 2018. *Estudio comparativo de tres diluyentes (Andromed, Triladyl y citrato de sodio con yema de huevo) en la preservación de semen caprino*. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México: s.n.

Murphy, E. M. y otros, 2018. Comparison of plant- and egg yolk-based semen diluents on in vitro sperm kinematics and in vivo fertility of frozen-thawed bull semen. *Animal Reproduction Science*, Volumen 191, pp. 70-75.

Naz, S., Umair, M. & Iqbal, S., 2018. Comparison of Tris egg yolk-based, Triladyl® and Optixell® extender on post-thaw quality, Kinematics and in vivo fertility of Nili Ravi Buffalo (*Bubalus bubalis*) bull spermatozoa. *Wiley Andrologia*.

Ngo, C. y otros, 2023. Bacteriospermia and its antimicrobial resistance in relation to boar sperm quality during short-term storage with or without antibiotics in a tropical environment. *Porcine Health Management*, 9(21).

Obando, P., Suárez, C. & Esparza, J., 2020. Descripción general de los principales grupos de fármacos antimicrobianos. Antibióticos.. En: *Infecciones en Pediatría*. s.l.:s.n.

Oteo, J. & Belén, M., 2015. Caracterización de mecanismos de resistencia por biología molecular: *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina, beta-lactamasas de espectro extendido y carbapenemasas. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, Volumen 33, pp. 27-33.

Paredes, F. & Roca, J., 2003. Acción de los antibióticos. *OFFARM*, 23(3).

Partyka, A., Niaski, W. & Ochot, M., 2012. Methods of assessment of cryopreserved semen. *Current Frontiers in Cryobiology*, Volumen 1, pp. 565-574.



Pereira, R. y otros, 2022. Bovine mastitis in northeastern Brazil: Occurrence of emergent bacteria and their phenotypic and genotypic profile of antimicrobial resistance. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, Volumen 85.

Pérez, C. & Robles, C., 2013. Aspectos básicos de los mecanismos de resistencia bacteriana. *Revista Médica MD*, Volumen 4, pp. 186-191.

Petropoulos, S. y otros, 2018. Antimicrobial and antioxidant properties of various Greek garlic genotypes. *Food Chemistry*, Volumen 245, pp. 7-12.

Qreshi, Khan, Mushtaq & Afridi, 2013. Effect of extenders, postdilution intervals, and seasons on semen quality in dairy goats. *Turkish Journal of veterinary and animal sciences*, 37(2).

Quereshi, M., Khan, D., Mushtaq, A. & Afridi, S., 2013. Effect of extenders, postdilution intervals, and seasons on semen quality in dairy goats. *Turkish journal of veterinary and animal sciences*, 37(2).

Quereshi, M., Khan, D., Mushtaq, A. & Afridi, S., 2013. Effect of extenders, postdilution intervals, and seasons on semen quality in dairy goats. *Turkish journal of veterinary and animal sciences*, 37(2).

Ramos, L., Rojas, A. & Martínez, Z., 2017. Effect of dilutors and times of equilibrium in the criopreservation of ovino semen (*Ovis aries*). *Revista de Investigación e Innovación Agropecuaria y de Recursos Naturales, La Paz*, Volumen 4, pp. 63-71.

Rojas, M., Pérez, S., De la Peña, G. & Vaquera, D., 2021. Bacteriemia por *Pseudomonas aeruginosa* en niños: perfil de resistencia antimicrobiana. *Rev Latin Infect Pediatría*, p. 34.

Ronald, B. & Prabhakar, T., 2001. Bacterial analysis of semen an their antibiogram. *Indian journal of animal science*, 71(9), pp. 829-831.

Rosas, O. y otros, 2023. Estudio comparativo de tres protocolos de congelación de semen caprino (tiempo de estabilización 2hrs, 4hrs y 24 hrs).

Sadeghi, S., Gallego, R., García, B. & Gomez, E., 2020. Effect of Sperm Concentration and Storage Temperature on Goat Spermatozoa during Liquid Storage. *Biology*, Volumen 9.

Salim, N., Salim, A. & Adballah, S., 2019. The use of skimmed dried milk as an alternative diluent for the cooling step during the boar sêmen freezing procedure. *Journal of Agriculture and Veterinary Science*, Volumen 12, pp. 62-66.

Salmani, H. y otros, 2014. In vitro assessment of soybean lecithin and egg yolk based diluents for cryopreservation of a goat semen. *Cryobiology*, 68(2), pp. 276-280.

Santos, C. S. & Silva, A. R., 2020. Current and alternative trends in antibacterial agents used in mammalian semen technology. *Animal Reproduction*, Volumen 17.

Seija, V. & Vignoli, R., 2006. Principales grupos de antibióticos. *Temas de bacteriología y virología médica*, 2(631-633).

Shugang, Q. y otros, 2022. Pseudomonas aeruginosa: pathogenesis, virulence factors, antibiotic resistance, interaction with host, technology advances and emerging therapeutics. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, Issue 7, p. 199.

SIAP, 2021. *Inventario caprino 2021*, s.l.: Gobierno de México.

Sitepu, S., Zaituni, U., Jaswandi & Hendri, 2018. Improved quality of frozen boer goat semen with the addition of sweet orange essential oil on tris yolk and gentamicin extender. : *Earth and Environmental Science*, Volumen 122.

Strzezek, J. y otros, 2004. Aplicaciones bioquímicas y prácticas de un diluyente para la conservación líquida de semen de verraco a 5° y a 16°C. *Dialnet Avances en tecnología porcina*, pp. 51-66.

Sussman, O., Mattos, L. & Restrepo, A., 2009. Resistencia Bacteriana.

Swami, D. S. y otros, 2017. The cryoprotective effect of iodixanol in buffalo semen cryopreservation. *Anim Reprod Sci*, Volumen 179, pp. 20-26.

Troncoso, C. y otros, 2017. Implicancias estructurales y fisiológicas de la célula bacteriana en los mecanismos de resistencia antibiótica. *International Journal of Morphology*, 35(4).

Trujillo, H., Rodríguez, R. & Hernández, A., 2004. Ajo: consideraciones sobre sus propiedades farmacológicas y terapéuticas. *Medicentro*.

van Wagtendonk, A. M., Haring, R. M., Kaal-Lansbergen, L. M. & Den Daas, J. H., 2000. Fertility results using bovine semen cryopreserved with extenders based on egg yolk and soy bean extract. *Theriogenology*, Volumen 54, pp. 57-67.

Vazquez, J. M. y otros, 2010. Fertilidad del semen ovino conservado a +5°C durante 24 horas. *XXXV Congreso de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia (SEOC)*, pp. 146-149.

Vidaca, G. y otros, 2022. Identificación de Bacterias Encontradas en Semen Post congelación en el Ganado Bovino en los Estados de Sinaloa y Durango. *Academia Journals*, Volumen 14, pp. 1105-1109.

Vidal, A. H., Batista, A. M., Bento, E. C. & Gomes, W., 2013. Soybean lecithin-based extender as an alternative for goat sperm cryopreservation. *Small Ruminant Research*, pp. 47-51.

Viotti, G., 2011. Procesamiento de semen bovino para inseminación artificial. *Universodad de la República*.

Xinyue, H. y otros, 2024. Genomesequencingofdrake semenmicrobiome withcorrelation with their compositions, sources and potential mechanisms affecting semen quality. *Poultry Science*.

Zakosek, M. y otros, 2021. Macro y microelementos en suero y plasma seminal como biomarcadores para la criotolerancia del esperma de toro. *Acta de veterinaria Scandinavica*, 63(1).

Ziogou, A. y otros, 2023. Kocuria species infections in humans- a narrative review. *Microorganisms*, 11(9).

Zoca, G. y otros, 2021. Influencia del plasma semnal durante las diferentes etapas de la criopreservación de espermatozoides bovinos. *Reproducción en animales domésticos*, 56(6), pp. 872-883.