

CALIDAD MICROBIOLÓGICA DEL AGUA PARA DOSIS INSEMINANTES, PARA SUINOS

Paredes V.J.J.^{1*}, Dias V.², Silva de Almeida M.C.¹ y Cardoso M.³

¹ Programa de Posgrado en Ciencias Veterinarias (PPGCV) Universidad Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil. *Correo de contacto: joaparvi@hotmail.com

² Laboratorio de Medicina Veterinaria Preventiva, Facultad de Veterinaria, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil.

³ Departamento de Medicina Veterinaria Preventiva, Facultad de Veterinaria, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil.

RESUMEN

Para evaluar la calidad microbiológica del agua utilizada en dosis inseminantes (DIs) para suinos, se muestrearon tres ciclos en seis Centrales de Inseminación Artificial para suinos (CIAs), ubicadas en Rio Grande do Sul, Porto Alegre y Santa Catarina (Brasil). Se cultivaron 18 muestras de agua en Agar Nutritivo para el conteo de Unidades Formadoras de Colonias de Bacterias Mesófilas Aerobias Totales (UFC/ml BMAT); Agar MacConkey para Unidades Formadoras de Colonias de Organismos Coliformes Totales (UFC/ml OCT); y el medio de cultivo Colilert para recuento de *Escherichia coli*. Todas las muestras de agua antes de la purificación presentaron $<1,1$ número más probable/100ml de *Escherichia coli*. Las medias de BMAT variaron de 0,1 log UFC/ml post-purificación en la central E y 3,5 log UFC/ml del agua antes de la purificación en la central F ($p>0,05$). Las medias de OCT variaron de 0,16 log UFC/ml a 2,78 log UFC/ml; las CIAs D y F ($p<0,05$) resultaron ser las más contaminadas. La media de BMAT en muestras de semen suino fue de 1,75 log UFC/ml y 3,79 log UFC/ml; mientras que las DIs mostraron valores de 0,73 log UFC/ml a 2,88 log UFC/ml de BMAT. La Cias F presentó una media más alta de BMAT ($p<0,05$) en relación a otras CIAs. Se concluye que, el agua analizada de las CIAs presenta buena calidad microbiológica y no influye en la media de BMAT ni de OCT de las DIs preparadas. Sin embargo, el incremento de las bacterias encontradas, probablemente se debe a la contaminación del ambiente durante la preparación del diluyente y de las DIs.

Palabras claves: cerdos, semen porcino, bacterias mesófilas aerobias totales.

ABSTRACT

To assess the microbiological quality of water used in insemination doses (DIs) for swines, three cycles were sampled in six Swine Artificial Insemination Centers (CIAs) located in Rio Grande do Sul, Porto Alegre and Santa Catarina (Brazil). Eighteen water samples were evaluated in Nutrient Agar for Colony Forming Units of Total Aerobic Mesophilic Bacteria (CFU/ml BMAT); then MacConkey Agar for Colony Forming Units of Total Coliform Organisms (CFU/ml OCT); and Colilert for *Escherichia coli*. All water samples (before purification) showed <1.1 most probable number/100ml of *Escherichia coli*. The BMAT means ranged from 0.1 log CFU/ml (after purification, central E) to 3.5 log CFU/ml (before purification, central F) ($P>0.05$). The OCT means ranged from 0.16 log CFU/ml to 2.78 log CFU/ml; the CIAs D y F were the most polluted ($P>0.05$). The BMAT mean in swine semen samples ranged from 1.75 log CFU/ml to 3.79 log CFU/ml; whereas, the DIs showed values from 0.73 log CFU/ml and 2.88 log CFU/ml BMAT. The CIAs F showed a higher mean compared with the other ones ($P<0.05$). As a conclusion, the water used in the six CIAs has a good microbiological quality and it does not influence in the BMAT or OCT means of the DIs prepared with this water. Nevertheless, the increasing of the bacteria is probably due to the environment pollution during the diluents or DIs preparation.

Key-words: pigs, swine semen, total aerobic mesophilic bacteria.

INTRODUCCIÓN

En la producción suina moderna, el manejo reproductivo tiene como objetivo el aprovechamiento de la selección genética de los reproductores y la disminución de los costos de producción, es así que se amplía el uso de la técnica de inseminación artificial (Bortolozzo *et al.*, 2005). Se incrementa el procesamiento del semen suino que debe ser recolectado, evaluado, diluido y almacenado, estableciendo las llamadas dosis inseminantes (DIs). Esta tecnología ayuda a mantener los espermatozoides viables y fértiles por un tiempo mayor, optimizando su empleo en las Centrales de Inseminación Artificial (CIAs), o permitiendo la distribución de las DIs a las granjas donde son utilizadas. Por otro lado, durante el procesamiento aumenta el riesgo de la introducción y multiplicación de microorganismos contaminantes en las DIs, lo que puede causar la pérdida de la calidad de las mismas (Althouse *et al.*, 2000; Waberski *et al.*, 2008).

La recolección del semen suino no es un proceso aséptico (Althouse y Lu, 2005), sin embargo los procedimientos adoptados durante este paso influenciará directamente en el nivel de contaminación (Dias *et al.*, 2000; Benneman *et al.*, 2000; Waberski *et al.*, 2008). Las etapas subsiguientes, durante la preparación de las DIs, también pueden determinar el aumento de la población bacteriana, debido al contacto del semen con los utensilios y frascos no esterilizados, o la utilización de los diluyentes contaminados (Althouse y Lu, 2005). La contaminación del diluyente, a su vez puede resultar de la falta de higiene durante su preparación o del uso de agua contaminada de mala calidad (Althouse *et al.*, 2000).

De acuerdo con la legislación de Brasil, el agua utilizada en la producción animal debe tener un estándar microbiológico compatible a la clase 3 del Consejo Nacional del Medio Ambiente (CONAMA) para agua dulce, el cual establece que de un mínimo de seis muestras tomadas en un periodo de un año, el 80% debe contener hasta 1000 coliformes termo tolerantes en 100 ml de muestra (CONAMA, 2005). En el caso del uso de

agua subterránea para el riego y consumo animal, la norma establece que el valor máximo permitido es de 200 coliformes termo tolerantes en 100 ml de muestra (CONAMA, 2008). Sin embargo el agua utilizada en la producción de aves y suinos presenta calidades superiores a las normas previstas en la legislación brasilera.

Respecto a la preparación de las DIs, Mellagi (2011) aconseja la utilización de agua reactiva tipo II según la clasificación del National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 1997) y del Instituto Nacional de Metrología (INMETRO, 2001). El agua tipo II puede presentar, máximo 1000 Unidades Formadoras de Colonias (UFC/ml) de bacterias mesófilas aerobias totales (BMAT). A pesar de la recomendación, la mayoría de las CIAs realiza el almacenamiento de agua purificada en barriles, para permitir la preparación inmediata de DIs y así cumplir con la demanda. Por lo tanto, la calidad de agua almacenada, la eficacia del sistema de purificación y además el riesgo de contaminación durante el almacenamiento, pueden influir en el número de bacterias presentes en el agua utilizada para el preparar las DIs. Como el agua representa un componente esencial en la preparación de las DIs, el objetivo de este estudio fue evaluar el número de BMAT en el agua utilizada en las CIAs, y su influencia en los recuentos bacterianos de las DIs producidas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización. Se evaluó el agua proveniente de seis CIAs, intencionalmente incluidas en el estudio y que participaron por acuerdo mutuo. Las centrales están localizadas en las regiones de Rio Grande do Sul, Porto Alegre y Santa Catarina (Brasil), todas tienen una producción mayor a 1.000 DIs mensuales. En la Tabla 1 se observa el origen del agua utilizada, sistema de purificación y además la producción mensual de DIs de cada una de las CIAs estudiadas.

Toma de muestras. La toma de muestras en cada una de las seis CIAs, se realizó mensualmente, de julio a noviembre de 2012. Para evaluar el agua en todos los pasos del proceso, se recolectaron seis muestras de cada central que consistían en: 120 ml

agua antes de la purificación (pozos artesanales); 10 ml de agua después de la purificación; 10 ml de agua durante el almacenamiento; 10 ml de diluyente (producto comercial nutritivo en polvo + agua purificada) directamente del recipiente donde había sido preparado; 10 ml del semen in natura de tres machos, recolectados el mismo día; y 10 ml de dosis inseminante (semen + diluyente) preparadas con el semen y el diluyente muestreados. Se realizaron tres repeticiones, para

un total de 18 muestras mensuales provenientes de cada una de las CIAs. Cada muestra fue tomada asépticamente y de la misma forma como se realizaba la recolección de rutina para su uso en el laboratorio (NCCLS, 1997). Todas las muestras fueron recogidas en frascos plásticos estériles y remitidos al laboratorio en cajas isotérmicas con hielo reciclable. El procesamiento de las muestras transcurrió en un plazo máximo de 24 horas.

Tabla 1. Caracterización de seis Centrales de Inseminación Artificial de suinos (CIAs), según el origen del agua utilizada, el sistema de purificación y la media de dosis inseminantes (DIs) producidas por mes. Rio Grande do Sul, Porto Alegre y Santa Catarina (Brasil), 2012.

CIAs	Origen del agua	Sistema de purificación	Media de DIs por mes
A	Pozo artesanal	Osmosis reversa y luz ultravioleta	16.000
B	Pozo artesanal	Osmosis reversa y luz ultravioleta	6.000
C	Pozo artesanal	Osmosis reversa y luz ultravioleta	18.000
D	Pozo artesanal	Osmosis reversa	18.000
E	Pozo artesanal	Osmosis reversa y luz ultravioleta	8.000
F	Pozo artesanal	Osmosis reversa y luz ultravioleta	3.000

Recuento bacteriano. El agua muestreada antes del sistema de purificación fue evaluada en cuanto al Número Más Probable (NMP) de Organismos Coliformes Totales (OCT) y *Escherichia coli*, mediante la técnica de los tubos múltiples, utilizando el método COLILERT® (Idexx Laboratories), según las recomendaciones del fabricante; los resultados obtenidos fueron expresados en NMP en 100 ml de muestra (NMP/100 ml). Igualmente, se determinó el número de bacterias mesófilas aerobias totales (BMAT) mediante el cultivo en profundidad (*pour plate*) en Agar Nutriente para Recuento (PCA, Himedia), descrito por Silva *et al.* (2010). Todos los resultados fueron expresados en Unidades Formadoras de Colonias (UFC/ml).

Análisis estadístico. El recuento de BMAT realizado en cada tipo de muestra proveniente de cada central de inseminación, se transformó en logaritmo de base 10 (log) y luego los datos se analizaron mediante ANOVA. Las medias obtenidas fueron comparadas mediante la prueba de Tukey-Kramer (múltiples medias), con nivel de confianza de 95%. Para el análisis se utilizó el programa estadístico SPSS versión 1.8.

RESULTADOS Y DISCUSION

Todas las 18 muestras de agua recogidas antes de la purificación presentaron <1,1 NMP/100 ml de *Escherichia coli*. El número de coliformes totales en 100 ml de las muestras varió de <1,1 NMP a >23 NMP; en el 44,5% de las muestras fue inferior a <1,1 NMP/100ml. Esos parámetros demostraron la buena calidad del agua evaluada, ya que están por debajo de los valores máximos permitidos para agua potable para consumo humano (Brasil, 2011). Ese resultado tal vez se explica por la utilización del agua subterránea captada por los pozos artesanales en todas las centrales de inseminación estudiadas, ya que según Rheinheimer y otros (2010), los acuíferos subterráneos generalmente vierten sus aguas por nacientes incrustadas en morros con amplia cobertura vegetal y presentan buenos patrones de potabilidad.

Sin embargo, las actividades antropogénicas en áreas rurales, como el depósito de estiércol animal no tratado en el suelo, contribuye a la contaminación de las aguas subterráneas

(Colvara *et al.*, 2009). Las zonas con una intensa explotación animal, han sido identificadas como de mayor riesgo debido a la pérdida de calidad del agua (Rheinheimer *et al.*, 2003). De todos modos, los resultados del presente estudio no mostraron el deterioro de las aguas subterráneas en las regiones donde las CIAs se encuentran localizadas. Esto en concordancia con Nanni y otros (2012) quienes afirmaron que la utilización de aguas subterráneas en las áreas de explotación de cerdos, en la región Noroeste de Río Grande do Sul, están de acuerdo con los parámetros de la legislación brasilera, por lo que no habría ningún efecto perjudicial sobre el abastecimiento de agua a la comunidad, debido a la explotación de granjas de cerdos en la región.

La media de BMAT en las muestras de agua (Tabla 2) varió entre 0,1 log UFC/ml en el agua después de la purificación de la central E, hasta 3,5 log UFC/ml en el agua antes de la purificación de la central F. No hubo diferencia significativa ($P>0,05$) entre los valores medios obtenidos en los diferentes tipos de muestras y entre las CIAs. Esto indica que en todas las CIAs no hubo diferencia significativa de la calidad microbiológica del agua, independientemente del tipo de sistema de purificación o almacenamiento empleado. Un aspecto importante es que, en las muestras de agua, no se observó contaminación de origen fecal, confirmado por la ausencia de *E. coli* en todas las muestras.

El conteo medio de BMAT mostró un rango de 1,6 log UFC/ml a 3,5 log UFC/ml. Resultados

similares se encontraron en muestras de aguas subterráneas, en la región del río Lajeado Suruvi en Santa Catarina (Brasil), donde se encontraron $4,0 \times 10^1$ y $1,3 \times 10^4$ UFC/ml BMAT, equivalente a 1,6 log UFC/ml y 4,1 log UFC/ml (Schneider *et al.*, 2008). Al respecto, la legislación que reglamenta el control de las aguas subterráneas de Brasil no proporciona los valores máximos permitidos para BMAT (Brasil, 2008). Sin embargo, la ley que reglamenta el estándar de potabilidad del agua (Brasil, 2011) establece que el agua tratada no puede exceder de 500 UFC/ml BMAT. Teniendo en cuenta estos parámetros, es posible afirmar que el agua captada en las CIAs presentó buena calidad desde el punto de vista microbiológico.

Si bien el agua captada en pozos artesanales o agua proveniente de sistemas de tratamiento urbano presenta estándares de potabilidad, todavía puede contener cantidades variables de microorganismos, materiales orgánicos e inorgánicos, no siendo adecuada para su uso en laboratorio. Son impurezas que pueden alterar el pH y la conductividad del agua, ejerciendo algún efecto en las células o alterando reacciones químicas. En Brasil, está determinado que (INMETRO, 2001), para la preparación de soluciones y ensayos en laboratorios clínicos humanos, debe ser empleada el agua como reactivo (AR) Tipo II (NCCLS, 1997). Para los laboratorios veterinarios no hay especificación, pero el uso de AR tipo II fue recomendado en la preparación de diluyentes para las DIs en las CIAs (Mellagi, 2011).

Tabla 2. Media de bacterias mesófilas aerobias totales (BMAT) en muestras de agua de seis centrales de inseminación de suinos (CIAs), recolectadas antes y después del sistema de purificación, y durante el almacenamiento. Rio Grande do Sul, Porto Alegre y Santa Catarina (Brasil), 2012.

CIAs	Media de BMAT (UFC/ml) (mínimo y máximo)		
	Antes de la purificación	Después de la purificación	Almacenamiento
A	1,6 (0 - 2,6)	1,7 (0,3 - 3,3)	2,3 (0 - 4,8)
B	2,8 (1,9 - 3,8)	1,9 (0 - 3,9)	1,6 (0,7 - 2,2)
C	2,7 (2,0 - 3,24)	1,9 (1,0 - 3,0)	1,8 (1,0 - 3,1)
D	1,9 (1,1 - 2,5)	2,1 (1,2 - 2,9)	1,7 (0,6 - 2,6)
E	1,6 (1,0 - 2,5)	0,1 (0 - 0,5)	1,3 (0 - 2,2)
F	3,5 (2,7 - 4,9)	3,0 (2,6 - 3,7)	1,7 (1,3 - 2,0)

UFC: unidades formadoras de colonias

En la Tabla 2 también se observa que algunas muestras después del sistema de purificación, en tres centrales (A, B, F) estaban por encima del valor máximo previsto (3 log UFC/ml de BMAT), aunque luego la media indicó que se encontraban dentro del límite establecido. Estos datos demuestran que en ocasiones se prepararon DIs con agua que no fue purificada adecuadamente. Este error puede ser causado por el agotamiento en el sistema de intercambio iónico producto de la acumulación de contaminantes en el sistema de ósmosis inversa o por el rompimiento de filtros (NCCLS, 1997). Es así que, el control, la limpieza y sustitución de los componentes del sistema de purificación del agua debe ser parte de la rutina de los laboratorios donde se preparan las DIs.

Durante el almacenamiento, la calidad microbiológica del agua permaneció inalterada, ya que no hubo diferencia estadística significativa entre las medias de BMAT en muestras colectadas antes o después de esa etapa (Tabla 2). Este fue un aspecto positivo observado en las CIAs, ya que sugiere que se toman las medidas correctas de control. Waberski y otros (2008) afirman que la limpieza de los barriles de almacenamiento de agua puede ser un punto crítico en los laboratorios que preparan las DIs, la falta de limpieza podría llevar a la formación de biofilmes bacterianos que constituyen fuente permanente de contaminación.

El éxito de la inseminación artificial depende, entre otros factores, a mantener la capacidad fertilizante de las células espermáticas, siendo

esa la principal función de los diluyentes utilizados en la producción de las DIs (Bortolozzo *et al.*, 2005). Por otra parte, la preparación del diluyente puede ser uno de los pasos que contribuye a la introducción de bacterias en las DIs, ya sea por el uso de agua de menor calidad para disolver los productos comerciales en polvo, como por el contacto con envases en ambientes contaminados. (Althouse, 2000; Waberski *et al.*, 2008). En la Tabla 3 se observa que en las centrales estudiadas, la media de BMAT del diluyente varió de 0,16 log UFC/ml (central E) a 2,78 log UFC/ml (central F). Las centrales D y F presentaron diluyentes más contaminados que del resto de las centrales ($p < 0,05$). Como no hubo diferencia significativa entre las centrales, en relación al número de BMAT del agua utilizada para preparar el diluyente, esto indica que los procedimientos de preparación pueden ser la causa de la contaminación observada.

Además, los recuentos iniciales inferiores a 2 log UFC/ml, a su vez, originaban DIs con baja contaminación bacteriana (< 1 log UFC/ml) después de 48 horas de almacenamiento. En el estudio, solo la central F presentó un promedio menor de 2 log UFC/ml de BMAT, lo que demuestra que aún hay aspectos de la recolección del semen que se pueden mejorar en las CIAs.

La Tabla 3 también indica que las DIs preparadas a partir del semen y del diluyente muestreados, presentaron medias entre 0,73 log UFC/ml de BMAT (Central B) y 2,88 log UFC/ml (Central F).

Tabla 3. Media de bacterias mesófilas aerobias totales (BMAT) en muestras de diluyente, semen y dosis inseminantes, proveniente de seis centrales de inseminación de suinos (CIAs). Rio Grande do Sul, Porto Alegre y Santa Catarina (Brasil), 2012.

CIAs	Media de BMAT*(Log UFC/ml) (DS)		
	Diluyente	Semen	Dosis inseminante
A	0,77 ^{ab} (0,79)	2,38 ^{ab} (0,97)	1,62 ^{ab} (0,34)
B	0,50 ^{ab} (0,80)	2,91 ^{bc} (0,74)	0,73 ^{ab} (1,00)
C	1,11 ^b (1,39)	2,34 ^{ab} (0,85)	1,46 ^b (1,34)
D	2,18 ^c (0,65)	3,79 ^c (0,66)	2,09 ^c (1,41)
E	0,16 ^a (0,27)	2,74 ^{abc} (1,10)	1,36 ^a (1,53)
F	2,78 ^c (0,86)	1,75 ^a (0,43)	2,88 ^c (0,98)

UFC: unidades formadoras de colonias. DS: desviación estándar.

*Letras distintas indican diferencia significativa entre las medias ($p < 0,05$).

La central D y F presentaron medias de BMAT significativamente mayor que las otras CIAs, coincidiendo con los resultados obtenidos del análisis de los diluyentes. En el caso de la central F, a pesar de haber sido la única con un promedio menor de 2 log UFC/ml BMAT en el semen, presentó un aumento significativo en el número de bacterias en las DIs.

En todas las centrales excepto F, las DIs presentaron medias de BMAT menor a las del semen, resultado esperado debido a la dilución que se produce durante la preparación de las DIs. En la central F, además del diluyente que presentó niveles más altos de contaminación, probablemente se produjo un aumento del número de BMAT durante la preparación de las DIs. Un estudio en centrales de inseminación Europea (Schulze *et al.* 2012) mostró que las medias de BMAT mayores que 100 UFC/ml (2 log UFC/ml) se encontraban en la superficie de incubadoras (46%), lavabos (42%), utensilios del sistema de transferencia de eyaculado (29%), teclados de equipamiento del laboratorio (29%), parte interior de las tapas del tanque de dilución (17%) y superficies de mesas (13%); y que solo el 8% de los diluyentes muestreados presentaban > 100 UFC/ml, lo que indica que el medio ambiente y las superficies en contacto con las DIs durante la preparación, son el origen del aumento BMAT.

En la mayoría de las centrales, se añaden antibióticos a las DIs para mantener la población bacteriana estable durante el almacenamiento a 17°C, por un periodo igual o superior a tres días (Bortolozzo *et al.*, 2005). A esa temperatura la multiplicación de bacterias mesófilas aumenta. Este incremento en las poblaciones bacterianas puede tener un efecto perjudicial sobre las DIs, como la aglutinación de los espermatozoides, lesiones del acrosoma, acidificación y pérdida de la motilidad (Althouse, 2000; Althouse y Lu, 2005; Althouse, 2008).

Debe tenerse en cuenta que el uso de antibióticos en la DIs disminuye el número de bacterias, pero no elimina por completo la contaminación (Bennemann, 2008). Esto se explica por el hecho de que muchas bacterias contaminantes

son resistentes a los antibióticos utilizados en las DIs (Schulze *et al.*, 2012). Por lo tanto, el uso de antimicrobianos no reemplaza ni invierte desviaciones en las buenas prácticas de preparación de las DIs. Estas buenas prácticas deben incluir al menos una higiene estricta durante la recolección del eyaculado, la inspección y limpieza de tuberías en contacto con el agua, diluyentes o DIs, y la limpieza de las superficies del laboratorio. Además, es importante el monitoreo periódico de la calidad del agua y de la eficacia del sistema de purificación como parte de la rutina del laboratorio.

CONCLUSIONES

El agua captada, purificada y almacenada presentó una calidad microbiológica satisfactoria en todas las centrales de inseminación artificial de suinos. En las condiciones del estudio, la calidad del agua no influyó en los promedios de mesófilos aerobios totales de las dosis inseminantes preparadas. El incremento de mesófilos aerobios totales, según lo observado, se debió probablemente al resultado de la contaminación de origen ambiental durante la preparación del diluyente y de las dosis inseminantes.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Althouse G.C., Kuster C.E.; Clark S.G. & Weisiger R.M., 2000. Field investigations of bacterial contaminants and their effects on extended porcine semen. *Theriogenology*, V. 53, P.1167-1176.
- Althouse G.C. & Lu K.G., 2005. Bacteriospermia In Extended Porcine Semen. *Theriogenology*, V.63, P. 573-584.
- Althouse G.C., 2008. Sanitary Procedures For The Production Of Extended Semen. *Reproduction In Domestic Animals*. 43, Pp.374-378.
- Bennemann P.E., 1998. Avaliação de doses inseminantes produzidas em centrais de inseminação artificial de suínos no sul do Brasil e o efeito da contaminação bacteriana sobre a qualidade espermática. 1998. Disertación (Maestría en Ciencias Veterinarias), Faculdade de

Veterinária, UFRGS, Porto Alegre, Brasil.

Bennemann P.E., Bortolozzo F.P., Wentz I. & Cardoso M.R.I., 2000. Motilidade espermática e integridade acrossomal em doses de sêmen suínos refrigeradas e inoculadas com *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. *Ciência Rural* 30, Pp.313-318.

Brasil Ministério de Saúde, 2011. Portaria N. 2.914, De 12/12/11. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância de qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Brasília-Df 26 P.

Bortolozzo F.P., Wentz I., 2005. Suinocultura em Ação, 2. Inseminação Artificial na Suinocultura Tecnificada. Porto Alegre Pallotti. 183p.

Colvara J.G., Lima A.S., Silva W.P., 2009. Avaliação da contaminação da água subterrânea em poços artesanais no sul de Rio Grande do Sul. *Brazil Journal Of Food Tehnology*. Rs-Brasil P. 01-14.

CONAMA,(Conselho Nacional Do Meio Ambiente), 2005. Resolução N.357 de 17 De Março de 2005. Publicada no Diário Oficial da União N.053, Pp.58-63.

Conama, Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução N.396 De 3 De Abril De 2008. Publicada No Diário Oficial Da União N.066, Pp. 64-68.

Dias C.P., Castagna C.D., Reis G.R., Simonetti R., Bortolozzo F.P., Wentz I., Cardoso M., 2000. Grau de contaminação bacteriana no ejaculado de suínos submetidos a dois métodos de higienização e coleta. Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS 28, Pp.32-40.

Goldberg A.M.G., 2009. Fatores de risco para a contaminação bacteriana durante a coleta do ejaculado suíno e suas consequências sobre a qualidade das doses inseminantes. (Maestría en Ciencias Veterinarias), Faculdade de Veterinária, UFRGS, Porto Alegre, Disponible en: <http://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/16234/000698777.pdf?sequence=1>

INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia), 2001. Conselho Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (Conmetro) Critérios Gerais Para a Competência de Laboratórios Clínicos. Norma Nit-Dicla-083 Rio Janeiro. 34 P. Disponible en:http://www.anvisa.gov.br/reblas/cursos/qualidade2/dicla_083.pdf.

Mellagi A.P.G., 2011. Fatores de risco para contaminação das doses de sêmen: como otimizar a higiene na coleta e processamento do ejaculado. Anais do vi sinsui, 10-13 De Maio 2011, Porto Alegre, P.6-16.

Nanni A.S., Binotto R.B., Freitas M.A., Rodrigues A.L.M., 2012. Avaliação da influência das atividades antrópicas na qualidade das águas subterrâneas no Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul. *Revista Brasileira de Recursos Hídricos* V.17, N.2, P.43-51.

NCCLS (National Committee For Clinical Laboratory Standards), 1997. Preparation and testing of reagent water in the clinical laboratory. Wayne, Pennsylvania, USA. Third Edition. V.17. N.18. 64 P.

Rheinheimer D.S., Gonçalves C.S., Bortoluzzi E.C., Pellegrini J.B.R., Silva J.L.S., Petry C., 2010. Qualidade de águas subterrâneas captadas em fontes em função da presença de proteção física e de sua posição na paisagem. *Engenharia agrícola,Jaboticabal*, V.30, N.5, P.948-957.

Rheinheimer D.S., Gonçalves C.S., Pellegrini J.B.R., 2003. Impacto das Atividades Agropecuárias na Qualidade da Água. *Ciência & Ambiente*, Santa Maria, V.27, N.2, P.85-96.

Silva N., Junqueira V.C.A., Silveira N.F.A., Taniwaki M.H., Dos Santos R.F.S., Gomes R.A.R., 2010. Contagem total de microorganismos aeróbios mesófilos, e psicotróficos em placas. En: *Manual de Métodos de Análises Microbiológica de Alimentos e Água*. 4ta. Edição São Paulo. Valera. Cap 6, P.95-105.

Schneider R.N., Nadvorny A., Santos M.A.A., Schmidt V., 2008. Caracterização da microbiota

- mesófila aeróbia de águas superficiais e subterrâneas da microbacia do Lajeado Suruvi. *Acta Scientiae Veterinariae* 36, Pp.7-12.
- Sinsui, 15-18 De Maio, 2012, Porto Alegre, Pp.1-15.
- Schulze M., Ruediger K., Grobbel M., Jung M., 2012. Benchmarking, Standards and Production Procedures in European Boar Studs. *Anais Do Vii.*
- Waberski D., Petrunkina A.M., Töpfer-Petersen E., 2008. Can External Quality Improve Pig AI Efficiency? *Theriogenology* 70, Pp.1346-1351.