

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DA ÁGUA EMPREGADA NA PRODUÇÃO  
DE DOSES INSEMINANTES EM CENTRAIS DE INSEMINAÇÃO  
ARTIFICIAL DE SUÍNOS NO SUL DO BRASIL**

**JOAQUIN JOSUE PAREDES VILLACORTA**

**PORTO ALEGRE**

**2013**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE VETERINÁRIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DA ÁGUA EMPREGADA NA PRODUÇÃO  
DE DOSES INSEMINANTES EM CENTRAIS DE INSEMINAÇÃO  
ARTIFICIAL DE SUÍNOS NO SUL DO BRASIL**

**Autor: Joaquin Josue Paredes Villacorta**

**Dissertação apresentada como requisito  
parcial para obtenção do grau de Mestre  
em Ciências Veterinárias na área de  
Reprodução Animal.**

**Orientadora: Dra. Marisa Ribeiro de  
Itapema Cardoso**

**PORTO ALEGRE**

**2013**

#### CIP - Catalogação na Publicação

Josue Paredes Villacorta, Joaquin  
Qualidade microbiológica da água empregada para a  
produção de doses inseminantes em centrais de  
inseminação artificial de suínos no sul do Brasil /  
Joaquin Josue Paredes Villacorta. -- 2013.  
58 f.

Orientadora: Marisa Ribeiro de Itapema Cardoso.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária,  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias,  
Porto Alegre, BR-RS, 2013.

1. Mesófilos aeróbios totais. 2. Sêmen suíno. 3.  
Água purificada. 4. Diluente contaminado. 5. Doses  
inseminantes. I. Ribeiro de Itapema Cardoso, Marisa  
, orient. II. Título.

**Joaquin Josue Paredes Villacorta**

**QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DA ÁGUA EMPREGADA NA PRODUÇÃO  
DE DOSES INSEMINANTES EM CENTRAIS DE INSEMINAÇÃO  
ARTIFICIAL DE SUÍNOS NO SUL DO BRASIL**

Aprovada em 26 de abril de 2013.

APROVADO POR:

---

Dra. Marisa Ribeiro de Itapema Cardoso  
Orientadora e Presidente da Comissão

---

Dra. Marisa da Costa  
Membro da Banca de Avaliação

---

Dra. Mari Lourdes Bernardi  
Membro da Banca de Avaliação

---

Dr. Verônica Schmidt  
Membro da Banca de Avaliação

## DEDICATÓRIA

A nosso pai celestial Jeová Deus do universo, quando muitas vezes sinto-me perdido e desacreditado em meus objetivos ou minha pessoa, tenho toda a motivação para fortalecer meus conhecimentos e oportunidades essenciais desta vida, abençoado seja seu santo nome e suas maravilhosas palavras como a água da vida eterna pelos séculos dos séculos, de sua divina eternidade.

Ao senhor Jesus Cristo com seus Anjos Celestiais que sempre permaneceram conosco em uma dimensão desconhecida lutando pela ordem e a paz nos bons e maus momentos da humanidade, nos ensinou com suas valiosas palavras com sacrifício, de aprender a conviver em harmonia com amor e compreensão, que contribuem parte de nossa felicidade na terra.

Dedico meu trabalho à uma grande profissional pesquisadora científica, professora Dra. Marisa Cardoso, de admirável conhecimento especializado em bacteriologia, que aceitou ser minha orientadora e pela incondicional amizade, quem me deu uma oportunidade do conhecimento no Laboratório de Medicina Veterinária Preventiva, formando boas pessoas responsáveis, além de profissionais.

DE TODO CORAÇÃO MUITO OBRIGADO!

*“A água de boa qualidade é exatamente como a saúde ou a liberdade; ela só tem valor quando acaba” do escritor João Guimarães Rosa (1908-1967)*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço humildemente a nosso amoroso pai celestial Jeová Deus e seu amado filho, Jesus Cristo pela oportunidade de conhecer e compreender sua maravilhosa criação da terra como fonte de vida tão complexa.

A meus queridos pais Heriberto Adaboinio Paredes Alberto e Nora Villacorta Tarqui (*in memoriam*) que me trouxeram a este mundo com todo seu amor e sacrifício incondicional, alimentando minha personalidade por um melhor bem-estar desta vida.

Aos meus irmãos Apolinar, Virginia, Griselda, Zuelen, Alcides, Marianela, por suas compreensões e incentivos, e que auxiliaram a continuar estudando cada dia, que tudo é possível se tentar e perseverar.

À Sra. Vanessa Dias pelos conhecimentos e experiência transmitida no Laboratório de Medicina Veterinária Preventiva, por sua personalidade tão calma e serenidade em todos os momentos de ensinamentos, apoio e amizade.

Ao Dr. Fernando Pandolfo Bortolozzo, pela amizade e ensinamentos profissionais transmitidos, durante o auxílio e coordenação experimental das diferentes centrais de inseminação artificial de suínos de Rio Grande do Sul e Santa Catarina.

À colega de pós-graduação Maria Clara Silva de Almeida do setor de suínos pelo companheirismo e seu incansável auxílio em todos os momentos para a realização deste trabalho de pesquisa.

Aos colegas e amigos de setor de suínos pelo apoio troca de conhecimentos e sua admirável amizade.

Ao Dr. José Luis Rodrigues do Laboratório de Biotecnologia da Reprodução, pela amizade e ensinamento profissional.

Ao pessoal da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e ao Programa de Pós- Graduação em Ciências Veterinárias da UFRGS e seu conselho de corpo de docente por sua ampla qualificação profissional, pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior CAPES/Ministério da Educação e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro, durante o período do curso de mestrado.

Aos bolsistas e colegas do Laboratório de Preventiva: Cristiane de Rosa Moraes, Caroline Pissetti, Thais Campos, Vanessa Laviniki, Priscila Guerra e Gabriela Orosco

Werlang, pela amizade e grande auxílio no ensinamento e experiência profissional compartilhada durante esses momentos de convivência na parte inicial do trabalho de pesquisa.

À colega Claudia Navarrete pelo grande companheirismo e amizade, pelo auxílio na preparação dos materiais e apoio na realização do trabalho experimental.

Aos futuros colegas de profissão e amigos (as) Tatiane Regina Vieira, Verônica Machado e Daniel Paim pelos maravilhosos momentos de amizade, confraternidade e troca de conhecimentos.

**MUITO OBRIGADO!**

## RESUMO

**Autor:** Joaquin Josue Paredes Villacorta

**Orientadora:** Marisa Ribeiro de Itapema Cardoso

A água empregada na produção de doses inseminantes (DIs) de suínos pode ser um dos veículos de introdução de bactérias contaminantes, podendo levar à perda de qualidade das mesmas. O objetivo do presente estudo foi avaliar o número de mesófilos aeróbios totais (MAT) na água utilizada em centrais de inseminação de suínos e sua influência nas contagens bacterianas das DIs produzidas. Foram conduzidos três ciclos de amostragem em seis centrais de inseminação (A-F), intencionalmente incluídas no estudo de acordo com os critérios: estar localizada no sul do Brasil; produzir >1.000 DIs mensais; e concordar em participar do estudo. A cada ciclo, eram colhidas amostras de água antes da purificação, água após a passagem pelo sistema de purificação, água após armazenamento, diluente, sêmen in natura de três machos distintos de fertilidade comprovada; e das respectivas doses inseminantes preparadas com sêmen e diluente amostrados. A água colhida antes do sistema de purificação foi avaliada quanto ao número mais provável (NMP) de coliformes totais e *Escherichia coli*, em 100 mL, pela técnica dos tubos múltiplos. Todas as amostras colhidas foram avaliadas quanto ao número de mesófilos aeróbios totais (MAT), por meio da semeadura em profundidade em Ágar para Contagem (PCA). Todas as 18 amostras de água colhidas antes da purificação apresentaram <1,1 NMP.100 mL<sup>-1</sup> de *Escherichia coli*. A média de MAT nas amostras de água variou entre 0,1 log UFC.mL<sup>-1</sup> na água após-purificação da central E e 3,5 log.UFC.mL<sup>-1</sup> na água antes da purificação da central F. Não houve diferença significativa (P>0,05) entre as contagens médias de MAT obtidas em diferentes tipos de amostra de água e entre as centrais de inseminação. A média de MAT nas amostras de diluente variou de 0,16 log UFC. mL<sup>-1</sup> à 2,78 log UFC.mL<sup>-1</sup>. As centrais D e F apresentaram diluentes significativamente (P<0,05) mais contaminados. No sêmen, a média de MAT variou de 1,75 log. UFC.mL<sup>-1</sup> à 3,79 log UFC.mL<sup>-1</sup> e nas DIs entre 0,73 log.UFC.mL<sup>-1</sup> e 2,88 log UFC.mL<sup>-1</sup>. A central de inseminação F apresentou média de MAT significativamente (P<0,05) maior que as demais centrais. Considerando os padrões existentes, conclui-se que a água captada, purificada e armazenada apresentou

boa qualidade microbiológica em todas as centrais de inseminação e não influenciou a média de mesófilos aeróbios totais das DIs preparadas. O incremento de bactérias, quando observado, foi provavelmente resultante da contaminação de origem ambiental durante o preparo do diluente e das doses inseminantes.

**Palavras chaves:** Mesófilos aeróbios totais, água purificada, diluente contaminado, sêmen suíno, doses inseminantes.

## ABSTRACT

**Author:** Joaquin Josue Paredes Villacorta

**Advisor:** Marisa Ribeiro de Itapema Cardoso

*The water employed in the production of insemination doses (IDs) of swine may be one of the vehicles for introduction of contaminant bacteria, and can lead to their quality loss. The objective of this study was to assess the number of total aerobic mesophilic (TAM) in water used in swine artificial insemination centers (SAIC) and its influence in the total bacterial counting of the IDs produced. Three cycles of sampling were conducted in six SAIC (A-F) intentionally included in the study according to the following criteria: to be located in the south of Brazil, to produce > 1.000 (IDs) monthly, and to agree in participating of the study. At each cycle, samples were collected from water before the purification, water after passage through the purification system, water after storage, extenders, fresh semen collected from three different boars and the respective (ID) prepared with the semen and extender sampled. The water collected before the purification system was evaluated for total coliforms and **Escherichia coli** most probable number (NMP) in 100 mL using the multiple tubes technic. All samples collected were evaluated for the number of total aerobic mesophilic (TAM) by the pour plate technic. All the 18 samples of water collected before the purification presented < 1.1 NMP. 100 mL<sup>-1</sup> of **Escherichia coli**. The average of TAM in the water samples varied between 0.1 log.CFU. mL<sup>-1</sup> in the water after purification of the central E and 3.5 log. CFU.mL<sup>-1</sup> in the water before purification of the central F. There was no significant difference (P>0.05) among the average counting of TAM obtained in different water samples types and among SAICs. The average TAM in samples of diluents varied from 0.16 log.CFU.mL<sup>-1</sup> to 2.78 log.CFU.mL<sup>-1</sup>; the SAICs D and F presented diluents significantly (P< 0.05) more contaminated. Among the semen samples, the TAM average varied from 1.75 log.CFU.mL<sup>-1</sup> to 3.79 log CFU.mL<sup>-1</sup> and in the DIs between 0.73 log.CFU.mL<sup>-1</sup> and 2.88 log.CFU.mL<sup>-1</sup>. The SAIC F presented average of TAM significantly (P<0.05) higher than the others SAICs. Considering the available standards, it was concluded that water collected, purified and stored presented a good microbiological quality in all insemination centers and did not influence the number of TAM in the prepared IDs. The increase on bacterial population*

*may have resulted from contamination of environmental origin during the preparation of the extender and insemination doses.*

***Key-words:*** *Total mesophilic aerobic, purified water, diluent contaminated, swine semen, insemination doses*

## SUMÁRIO

	<b>DEDICATÓRIA</b> .....	<b>4</b>
	<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	<b>5</b>
	<b>RESUMO</b> .....	<b>7</b>
	<b>ABSTRACT</b> .....	<b>9</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>12</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>14</b>
<b>2.1</b>	<b>Água na produção animal</b> .....	<b>14</b>
<b>2.2</b>	<b>Parâmetros da qualidade da água</b> .....	<b>15</b>
<b>2.2.1</b>	<b>Variáveis físicas</b> .....	<b>15</b>
2.2.1.1	Cor aparente .....	15
2.2.1.2	Turbidez .....	16
2.2.1.3	Sólidos Totais Dissolvidos.....	16
<b>2.2.2</b>	<b>Variáveis químicas</b> .....	<b>16</b>
2.2.2.1	Potencial hidrogeniônico (pH) .....	16
2.2.2.2	Cloro residual livre .....	17
2.2.2.3	Parâmetros inorgânicos e orgânicos .....	17
2.2.2.4	Condutividade elétrica (CE) .....	18
<b>2.2.3</b>	<b>Variáveis microbiológicas</b> .....	<b>18</b>
2.2.3.1	Coliformes Termotolerantes.....	18
2.2.3.2	Coliformes Totais .....	18
2.2.3.3	Heterotróficos Totais.....	19
2.2.3.4	Cianobactérias .....	19
<b>2.3</b>	<b>Inseminação artificial de suínos no Brasil</b> .....	<b>20</b>
<b>2.4</b>	<b>Etapas da coleta do sêmen</b> .....	<b>20</b>
2.4.1	Coleta do sêmen .....	21
2.4.2	Avaliação do sêmen .....	21
<b>2.5</b>	<b>Cuidados higiênicos durante a coleta e processamento do sêmen para a produção de doses inseminantes</b> .....	<b>22</b>
2.5.1	Finalidade do diluente de sêmen suíno .....	23
2.5.2	Qualidade da água para preparo de diluentes .....	23

<b>2.6</b>	<b>Contaminação bacteriana durante processamento das doses inseminantes .....</b>	<b>26</b>
<b>3</b>	<b>ARTIGO - Qualidade microbiológica da água empregada em centrais de inseminação de suínos para produção de doses inseminantes .....</b>	<b>29</b>
	<b>RESUMO .....</b>	<b>30</b>
	<b>ABSTRACT .....</b>	<b>31</b>
	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>32</b>
	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>33</b>
	<b>RESULTADO E DISCUSSÃO .....</b>	<b>35</b>
	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>41</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>41</b>
<b>4</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>44</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>45</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A água é essencial para a vida no planeta, participando de todos os ciclos biológicos da natureza. Está envolvida em inúmeras reações bioquímicas que abrangem os processos de oxidação e de hidrólise de compostos como hidratos de carbono, ácidos graxos e aminoácidos, sendo impossível conceber uma função direta ou indireta do metabolismo celular sem água (GIRARD, 2012; PATIENCE, 2012).

A água pura é inodora insípida e incolor. Quando suas propriedades de odor, cor ou turbidez estão alteradas, seu consumo pode implicar em ameaça à saúde humana e animal, já que a água pode ser um veículo de contaminantes químicos e microbiológicos. A qualidade das amostras de água é avaliada por critérios físicos, químicos e microbiológicos (PATIENCE, 2012; MCALLISTER; TOPP, 2012).

As regiões Sul e Sudeste do Brasil caracterizam-se por apresentar elevada disponibilidade de água superficial e subterrânea. Essa riqueza em mananciais hídricos propicia o estabelecimento de populações humanas e torna-se fator importante para o desenvolvimento da produção animal. Porém, o incremento da população humana e animal representa risco aos mananciais aquíferos, pelas atividades produtivas que modificam o ambiente natural e impactam a qualidade física, química e microbiológica da água (GEOBRASIL, 2007). Quando contaminada, a água pode veicular e propagar micro-organismos patogênicos que podem causar doenças na população humana e animal. Como exemplo, é possível citar águas colhidas de poços contaminados por esgoto domiciliar (BRASIL, 2006). Sendo assim, além dos aspectos físicos, o monitoramento da qualidade microbiológica da água torna-se de extrema importância.

Na suinocultura moderna, o manejo reprodutivo, visando o aproveitamento da seleção genética dos reprodutores e a diminuição do custo de produção tem ampliado o uso da técnica de inseminação artificial (IA) (BORTOLOZZO et al., 2005). Em decorrência disto, houve o aumento da manipulação do sêmen suíno que é coletado, processado e armazenado em diluentes, constituindo as chamadas doses inseminantes (DI). Por meio desse processamento, objetiva-se manter viáveis e férteis os espermatozoides, por alguns dias, nas centrais da inseminação artificial (CIAs) ou permitir a distribuição das DI para granjas, onde estão alojadas as matrizes. Entretanto, o processamento e distribuição também aumenta a preocupação com a biossegurança da cadeia produtiva da inseminação artificial (ALTHOUSE et al., 2000).

Durante o processamento da DI são requeridos equipamentos adequados, com baixo nível de contaminação bacteriana e livre de resíduos químicos. Insumos descartáveis ou submetidos à higienização rigorosa são imprescindíveis desde a coleta até a preparação das doses inseminantes. A existência de pessoal técnico treinado e qualificado também contribui para a produção de doses de melhor qualidade (BORTOLOZZO et al., 2002). A qualidade do diluente é importante para garantir a melhor viabilidade dos espermatozoides pelo período requerido para o fornecimento das DIs até as granjas distantes das centrais de inseminação artificial (BORTOLOZZO; WENTZ, 1995).

Além das condições de estocagem, sob temperatura uniforme, a higiene da produção da DI pode influenciar a viabilidade dos espermatozoides (BORTOLOZZO et al., 2002). A fonte primária de contaminação bacteriana pode ser a coleta do macho suíno ou ocorrer durante o processamento das doses inseminantes. Entretanto, a qualidade da água captada, purificada e armazenada também pode atuar como fator deletério para as doses inseminantes (ALTHOUSE; LU, 2005). Esse último aspecto – qualidade microbiológica da água armazenada – muitas vezes é esquecido nas centrais de inseminação, principalmente após a passagem por sistemas de purificação que garantem ser capazes de fornecer água de boa qualidade.

A partir disso, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a qualidade de amostras de água em diferentes etapas (captação, purificação e armazenamento) em centrais de inseminação do sul do Brasil, avaliando sua influência na contagem de heterotróficos totais nas doses inseminantes produzidas.

## **2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Águas na produção animal**

A água é o recurso natural líquido mais abundante do planeta, impossível de ser substituído na existência de plantas, animais e micro-organismos. Do total da água disponível no planeta, 97% é salgada e constitui os mares e oceanos; somente 3% é água doce superficial ou subterrânea. Do total da água doce, 98% estão na camada subterrânea e apenas 2% em rios e lagos (GEOBRASIL, 2007). No âmbito global, aparentemente, há um amplo suprimento de água, entretanto é preciso considerar que há flutuação na quantidade de água disponível, de acordo com os períodos do ano e entre diferentes anos. Além disso, não deve ser esquecido que efluentes de origem doméstica ou industrial podem comprometer a qualidade da água disponível (PATIENCE, 2012).

Estima-se que a demanda de água global aumentará em 50% até 2025, considerando como base o consumo registrado em 1995 (UNEP, 2008). Esse aumento de consumo deverá ocorrer principalmente nos países em desenvolvimento, em decorrência do aumento do poder aquisitivo da população, o que demandará maior produção agropecuária e industrial (DOREAU et al., 2012). Estudos demonstram que há um elevado consumo de água na agricultura e, principalmente, na criação de animais de produção (OECD; FAO, 2012), porém não há evidências de que a exploração pecuária seja causadora, por si só, de escassez de água (DOREAU et al., 2012). Por outro lado, a falta de gestão adequada em regiões de produção animal intensiva pode reduzir a disponibilidade de água e acarretar problemas de poluição (BELLAYER; OLIVEIRA, 2009).

A qualidade de água é um problema crítico nos recursos hídricos, podendo ser afetada direta ou indiretamente pela poluição do esgoto urbano ou de dejetos das áreas rurais (GEOBRASIL, 2007). A contaminação microbiana da água fornecida aos humanos e animais pode ocorrer por infiltração direta a partir dos sistemas de produção intensiva de animais, por dejetos humanos, águas residuais urbanas, ou por águas superficiais que contaminam poços, principalmente durante a época de chuvas intensas (DAVIES-COLLEY et al., 2004). As bactérias, por seu tamanho reduzido, hidrofobicidade e carga eletrostática, são capazes da migração descendente através dos poros do solo, podendo alcançar as águas subterrâneas. O crescimento e sobrevivência

das bactérias nas águas subterrâneas dependem da existência de nutrientes, concentração de oxigênio, temperatura, salinidade e pH (MCLLISTER; TOPP, 2012). Em áreas de produção intensiva de suínos, os dejetos produzidos podem ter influência negativa nos corpos hídricos, pois, além de introduzirem bactérias no ambiente, providenciam alto teor de matéria orgânica que causará a poluição, selecionando as bactérias heterotróficas de crescimento rápido e consumidoras de oxigênio (SILVA; BASSI, 2012)

## **2.2 Parâmetros de qualidade da água**

A qualidade da água pode ser monitorada por suas características físicas, químicas e biológicas. A interpretação das análises laboratoriais pode variar, de acordo com o tipo de água dos sistemas de abastecimento, reservatórios, mananciais, ou corpos receptores. Os parâmetros de potabilidade da água para consumo humano são estabelecidos pela Portaria 2.914 do Ministério da Saúde (BRASIL, 2011). A água de consumo natural para animais pertence à categoria de água doce classe três, regulamentada pela Resolução do CONAMA nº. 357 (CONAMA, 2005). Em ambos os casos, há limites máximos estabelecidos para variáveis inorgânicas (minerais) e orgânicas, sólidos suspensos, cor, micro-organismos, turbidez e pH.

### **2.2.1 Variáveis físicas**

#### **2.2.1.1 Cor aparente**

É caracterizada pela presença de coloração, associada à redução da luz que atravessa a amostra. Sua origem é a presença de matéria orgânica e inorgânica em estado coloidal, como ácido húmico, ácido fúlvico, óxido de ferro e manganês. Seu efeito é estético, pois causa repulsa ao consumidor (CETESB, 2009). O padrão aceitável de potabilidade da água para consumo humano (BRASIL, 2011) é de 15 uH (Unidades Hazen; equivalente à cor produzida por 1mg de Platina por litro de água, na forma de hexacloroplanitato).

### 2.2.1.2 Turbidez

A turbidez da água é a ausência de limpidez, resultante da atenuação que um feixe de luz sofre ao atravessá-la. A presença de materiais particulados sólidos em suspensão, tais como matéria orgânica e inorgânica particulada, algas, bactérias, plâncton, lodo, areia, ferro, zinco, entre outros, causa a turbidez da água (FUNASA, 2006). A água com turbidez elevada pode ocorrer nas estações chuvosas e pela contaminação por esgotos domésticos ou efluentes industriais. A determinação da turbidez é um indicador sanitário muito importante para identificar a potabilidade da água, aceitável para o consumo humano e abastecimento público (CETESB, 2009; PARRON et al., 2011). Em águas de classe três, o máximo permitido é 100 UNT (Unidade de Turbidez Nefelométrica); já a água potável tem como valor máximo permitido 0,5 uT (equivalente a 5 UNT) em 95% das amostras colhidas após o tratamento (BRASIL, 2011).

### 2.2.1.3 Sólidos totais dissolvidos

Os sólidos totais (dissolvidos em suspensão) expressam a concentração de todas as impurezas dissolvidas na água (PARRON et al., 2011). Os sólidos dissolvidos são aqueles que permanecem na água após a passagem por membrana filtrante com poro de 1,2  $\mu\text{m}$ . Os sais são os principais componentes dos sólidos dissolvidos e, quando estão presentes em excesso, provocam alteração do gosto da água e corrosão. A Portaria 2.914 prevê valores máximos permitidos de 1.000 mg/L para água potável (BRASIL, 2011), enquanto que em águas de classe 3 o valor máximo previsto é de 500 mg/L (BRASIL, 2005).

## 2.2.2 Variáveis químicas

### 2.2.2.1 Potencial hidrogeniônico (pH)

Expressa o equilíbrio entre os íons ( $\text{H}^+$ ) e ( $\text{OH}^-$ ) na água. Quando o valor de pH é menor que 7,0 indica água ácida, e pH maior que 7,0 indica alcalinidade. É um parâmetro muito importante na análise de água. A influência do pH se dá diretamente sobre a viabilidade dos organismos que compõem esse ecossistema (PARRON et al., 2011; FUNASA, 2006). O pH da água para consumo humano, após tratamento, deve

estar entre 6,0 e 9,5 de acordo com a Portaria nº. 2914 do Ministério da Saúde (BRASIL, 2011). Água de consumo para animais deve apresentar pH entre 6,0 e 9,0 (BRASIL, 2005).

#### 2.2.2.2 Cloro residual livre

Esse é um parâmetro previsto apenas para água após o tratamento e indica a eficiência da desinfecção. O cloro (Cl) é um elemento químico que apresenta alta solubilidade na água. O ácido hipocloroso (HOCl) formado pela adição do cloro à água dissocia-se rapidamente em H<sup>+</sup> e íon hipoclorito (ClO<sup>-</sup>). O cloro existente na água, sob forma de ácido hipocloroso e o íon hipoclorito, é denominado de cloro residual livre (PARRON et al., 2011)

O ácido hipocloroso (HOCl) acrescentado na água apresenta ação bactericida e viricida mais elevada que o íon hipoclorito, porém não tem a mesma eficácia na destruição de cistos, oocistos de protozoários e ovos de helmintos, porque esses são altamente resistentes à cloração (BRASIL, 2006).

A desvantagem do uso do cloro é o risco de corrosão das canalizações e válvulas de equipamentos metálicos, a baixa ação em presença de matéria orgânica e a formação de substâncias tóxicas como os tri-halometanos. Elevada concentrações de cloro podem ocasionar alterações indesejáveis no sabor e odor da água (BRASIL, 2006; FUNASA 2006). A portaria no. 2.914 do Ministério da Saúde especifica a obrigatoriedade da presença de cloro residual livre de 0,5 mg/L na água, com uma conservação mínima de 0,2 mg/L nos diferentes pontos da redes de distribuição pública (BRASIL, 2011).

#### 2.2.2.3 Parâmetros inorgânicos e orgânicos

O risco à saúde devido às substâncias químicas tóxicas, na água para consumo humano ou animal, originam-se primariamente da sua habilidade em causar danos à saúde, após prolongado período de exposição. Há poucos contaminantes químicos da água que podem levar á problemas de saúde após uma única exposição, exceto em casos de contaminação acidental massiva. Valores máximos permitidos estão previstos para diversas substâncias orgânicas (agrotóxicos, benzeno, acrilamida, etc.) e inorgânicos

(ferro, nitrato, chumbo, mercúrio, etc.) na legislação brasileira para água potável e de classe 3, conforme consta no Anexo 1 (CONAMA, 2008)

#### 2.2.2.4 Condutividade elétrica (CE)

A condutividade elétrica é a medida da capacidade da água de conduzir a corrente elétrica. Quanto mais pura a água, menor é a sua condutividade (PARRON et al., 2011). É utilizada para estimar a quantidade total de sólidos dissolvidos na água (BLAINE, 2011).

A unidade de medição da condutividade é comumente o microsiemens/cm ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ ). A água potável a  $25^\circ\text{C}$  apresenta valores de 50-1500  $\mu\text{S}/\text{cm}$ ; a água destilada de 0,5-2  $\mu\text{S}/\text{cm}$ ; e a água ultra-pura apenas 0,005  $\mu\text{S}/\text{cm}$  (BRASIL, 2006).

### 2.2.3 Variáveis microbiológicas

#### 2.2.3.1 Coliformes termotolerantes

Os coliformes termotolerantes são caracterizados como o grupo de coliformes capazes de multiplicação em temperatura de  $45^\circ\text{C}$ . Entre as espécies que compreendem esse grupo, a *Escherichia coli* apresenta forte associação com a contaminação fecal. Porém, bactérias de origem não fecal como *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae* e *Citrobacter freundii* também fazem parte deste grupo (SILVA et al., 2010).

Na legislação brasileira, os coliformes termotolerantes são utilizados como padrão de análise microbiológica de águas superficiais, de abastecimento, recreação, irrigação agrícola e piscicultura (CETESB, 2009). Na água potável devem estar ausentes em 100 mL de amostra analisada (BRASIL, 2011). Para dessedentação de animais criados confinados não deverá ser excedido o limite de 1.000 coliformes termotolerantes por 100 mililitros, em 80% ou mais de pelo menos seis amostras coletadas durante o período de um ano. (BRASIL, 2005)

#### 2.2.3.2 Coliformes totais

É um subgrupo da família *Enterobacteriaceae*, definidos como bacilos Gram-negativos, aeróbios e anaeróbios facultativos, não formadores de esporos, oxidase negativos, capazes de se desenvolver na presença de sais biliares ou agentes tenso-ativos e crescem em uma temperatura de  $35^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$  (BRASIL, 2011; FUNASA, 2006).

A presença de coliformes totais na saída do sistema de tratamento indica falhas no tratamento da água. Portanto, segundo a legislação brasileira, esse indicador deve estar ausente em amostra de 100 mL de água colhida na saída do sistema de tratamento. No sistema de distribuição também devem estar ausentes em 95% das amostras examinadas mensalmente (BRASIL, 2011).

#### 2.2.3.3 Heterotróficos totais

São definidos como bactérias capazes de produzir unidades formadoras de colônia (UFC) na presença de compostos orgânicos contidos em meios de cultura apropriados, sob condição de incubação á  $35,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ , após 48 horas. Indicador de população bacteriana geral de água e alimentos, não diferencia os tipos de bactérias presentes. Na análise de água, esse indicador ajuda na avaliação da eficiência do tratamento e, no sistema de distribuição, auxilia na verificação da integridade do sistema e/ou na existência de pontos de estagnação (HELLER; PÁDUA, 2006). Em planos de amostragem de águas de distribuição, devem ser pesquisados em pelo menos 20% das amostras colhidas, não podendo exceder 500 UFC/mL (BRASIL, 2011).

#### 2.2.3.4 Cianobactérias

São micro-organismos procarióticos, aeróbicos e foto-autotróficos. Os ambientes de água doce são os mais favoráveis ao seu crescimento, principalmente quando há alta concentração de nitrogênio e fósforo. A crescente eutrofização dos ambientes aquáticos tem causado o enriquecimento artificial, favorecendo a multiplicação de cianobactérias, entre outros efeitos (FUNASA, 2006). Vários gêneros de cianobactérias produzem toxinas, denominadas de cianotoxinas. As duas principais classes de cianotoxinas são as neurotoxinas e as hepatotoxinas. Entre as neurotoxinas, as saxitoxinas representam um grupo dos chamados venenos paralisantes de mariscos, que agem inibindo a condução nervosa por bloqueamento dos canais de sódio. Entre as hepatotoxinas, há as

microcistinas, que são promotores de câncer hepático e a cilindrospermopsina, alcalóide hepatotóxico, cujo mecanismo de ação se dá por inibição da síntese proteica, causando danos potencialmente severos nas células renais, pulmonares e cardíacas (FUNASA, 2003).

Na Portaria 2.914 do Ministério da Saúde está prevista a pesquisa mensal de cianobactérias no manancial de abastecimento de água e, quando sua população excede 10.000 células/mL, esse monitoramento deve ser semanal. Em populações superiores a 20.000 células/mL a cianotoxinas devem ser monitoradas, semanalmente, no ponto de captação. O valor máximo de cianotoxinas na água tratada é de 1µg/L para microcistina e 3µg equivalente STX/L para saxitoxina (BRASIL, 2011). Para águas de classe 3 usadas para dessedentação de animais, o máximo de cianobactérias permitido é de 50.000 células/mL (BRASIL, 2005).

### **2.3 Inseminação artificial de suínos no Brasil**

As primeiras instalações produtivas da suinocultura tecnificada no Brasil datam do início da década de 50. Melhorando os manejos sanitários das raças produtoras de carne, os suinocultores organizaram as Associações Brasileiras com suas diferentes filiais estaduais. De fato, na década de 1975 foram abertas as duas primeiras centrais de inseminação artificial suína no município de Estrela (RS) e Concórdia (SC) (EMBRAPA, 1999; BORTOLOZZO; WENTZ, 1997).

Durante os programas de inseminação artificial o sêmen diluído é armazenado e conservado em refrigeração em temperatura entre 15°C a 18°C. Durante seu período de viabilidade, por três dias após a coleta, deve ser transportado com estritas condições sanitárias e em refrigeração. Associado ao adequado treinamento de pessoal, fiscalização periódica da técnica e diagnóstico apropriado do estro, a inseminação artificial é uma técnica vantajosa. A qualidade da dose inseminante é essencial para obter bons resultados produtivo. A desvantagem é o custo econômico e o risco sanitário de transmissão de doenças nos plantéis usuários da inseminação artificial aberta (BORTOLOZZO et al., 2005). Os programas fechados, internos, tem mais vantagem, pois as doses inseminante são coletadas, diluídas, processadas e conservadas na granja. Entretanto, essa necessita ter infraestrutura laboratorial mínima e pessoal técnico capacitado (BORTOLOZZO; WENTZ, 1998).

## **2.4 Etapas da coleta do sêmen**

Em uma central de inseminação artificial, o processamento do sêmen passa por diferentes etapas para obter ejaculados de qualidade e quantidade que permitam resultados economicamente viáveis.

### **2.4.1 Coleta do sêmen**

A habilidade prática e o treinamento técnico do coletador, assim como a seleção dos animais doadores de sêmen são essenciais para o sucesso. Pelas características fisiológicas dos reprodutores suínos, os cachos jovens, de até 12 meses de idade, são submetidos a uma coleta por semana. Nos machos adultos, o sêmen é coletado duas vezes/semana. Utiliza-se a técnica da mão enluvada, após cuidados higiênicos para não haver contaminação na coleta do ejaculado total. O copo coletor de 500 mL e todos os materiais devem ser estéreis e ficar à temperatura de 35 a 37°C, evitando o choque térmico do espermatozoide. O coletador deverá utilizar luvas de borracha e sobreluvas para higienização da região prepucial (EMBRAPA, 1999).

Depois da monta do cachaço no manequim, o pênis é exposto, fixado pelo coletador em sua extremidade, exercendo uma flexão de um ângulo 90°C e efetuando uma pressão rítmica sobre o pênis do reprodutor até que o cachaço retraia o pênis e desça do manequim. A glândula de reprodutor suíno deve ficar livre, evitando o contato do sêmen com a luva do coletador (TONIOLLI, 2010).

### **2.4.2 Avaliação do sêmen**

Existem diferentes parâmetros para avaliar a qualidade do sêmen suíno: aspecto, concentração, motilidade, morfologia, integridade do acrossoma, volume do ejaculado, número total de espermatozoides viáveis (TONIOLLI, 2002).

A avaliação da qualidade da dose inseminante fornecida pelo reprodutor suíno é essencial para o programa de inseminação artificial, embora seja também importante a técnica de processamento do ejaculado e as atividades efetuadas durante a produção e armazenamento das doses (TONIOLLI, 2002).

Quando se faz a avaliação no laboratório, a porcentagem de células espermáticas móveis (motilidade) está altamente correlacionada com a quantidade de espermatozoides vivos ou viáveis (viabilidade) (BORTOLOZZO et al., 2008).

O número das doses de sêmen e o grau de diluição apropriada são variáveis que dependem da concentração e do volume no ejaculado coletado do cachão. O cálculo é realizado para obter doses com um total aproximado de  $3 \times 10^9$  espermatozoides em 100 mL. Durante o processo de diluição, o diluente deve ser adicionado de forma gradual ao sêmen e não vice-versa, evitando o choque térmico. Após serem envasadas em recipientes adequados estéreis, as doses são conservadas entre 15 e 17°C (TONIOLLI, 2010).

## **2.5 Cuidados higiênicos durante a coleta e processamento do sêmen para a produção de doses inseminantes**

O aparelho reprodutor do macho suíno mantém a termorregulação dos testículos em temperatura entre 2,5 e 4°C menor que a temperatura corporal, permitindo a produção de espermatozoides em condições estéreis. (FLOWERS, 2008) (WILLIAMS, 2009 *apud* GARNER ; HAFEZ, 1993). (ALTHOUSE; LU, 2005)

Durante o manuseio do divertículo prepucial do cachão é essencial a higiene, evitando a coleta das frações gelatinosas pré-espermáticas das glândulas bulbouretrais (porção geralmente sem espermatozoides) a fim de diminuir a contaminação bacteriana (SONE, 1990).

A contaminação bacteriana pode ser originada das mãos do coletador, contaminando o ejaculado antes do processamento e disseminando as bactérias nos materiais de processamento do sêmen. Por causa disso, devem ser implantados protocolos técnicos de mínima contaminação bacteriana, com higiene individual. Esses devem ser aplicados durante a preparação do macho, durante a coleta e processamento do sêmen e higiene laboratorial em geral (ALTHOUSE et al., 2000).

No estudo de Goldberg (2009) foi confirmado que, para reduzir significativamente a contaminação bacteriana, deve-se realizar limpeza e desinfecção rotineira das instalações, das baias e locais de coleta. Da mesma forma, higiene e limpeza do macho e do prepúcio antes da coleta, descarte dos primeiros jatos do ejaculado, correta fixação do pênis, utilização de sobre-luvas descartáveis para

diferentes coletas, e uso de filtros descartáveis na separação da porção gelatinosa do ejaculado suíno são medidas que permitem a redução da contaminação. Porém, é quase impossível coletar ejaculados de sêmen suíno livre de contaminantes (SONE et al., 1992).

### **2.5.1 Finalidade do diluente de sêmen suíno**

O diluente é uma solução aquosa utilizada para aumentar o volume do ejaculado coletado, constituindo a dose inseminante. A função do diluidor é preservar todas as características metabólicas funcionais das células espermáticas, protegê-las para adaptarem-se à refrigeração, pois o sêmen suíno é extremamente sensível ao choque do frio. Com relação ao conteúdo de lipídios da membrana celular do espermatozoide, propiciam a viabilidade dos espermatozoides durante alguns dias após a colheita (GADEA, 2003). Os diluentes comercialmente disponíveis têm um pH (6,8 a 7,3), isotônico próximo do neutro. De forma similar aos meios de cultura celular contém substratos energéticos, tampões biológicos e diferentes eletrólitos para manter um balanço osmótico (ALTHOUSE et al., 2000).

A pressão osmótica do espermatozoide suíno *in natura* é 290-300 mOsm (LEVIS, 2008). Pressões abaixo de 200 mOsm diminuem notavelmente a motilidade das células espermáticas. Assim, as soluções hipotônicas e hipertônicas produzem um desequilíbrio na pressão osmótica com perda ou aumento de água, levando à lesão e alteração da membrana celular do espermatozoide (GADEA, 2003).

As células espermáticas e bactérias, durante a armazenagem da dose inseminante, produzem produtos metabólicos, como o ácido láctico. À medida que aumenta sua concentração, o pH intracelular do espermatozoide é alterado para condições desfavoráveis à motilidade. Assim, os tampões, como citrato de sódio, são utilizados para proteger os espermatozoides das alterações extremas do pH produzido pelos resíduos metabólicos (HANCKOC, 1959; LEVIS, 2008).

### **2.5.2 Qualidade da água para preparo de diluentes**

A quantidade de doses inseminante preparadas está relacionada à concentração de sêmen *in natura*. O cálculo é feito de forma a obter doses inseminantes com  $3 \times 10^9$

espermatozoides em 100 mL de volume. Usualmente, o diluente é preparado a partir da suspensão de produto comercial em pó em água purificada de boa qualidade (TONIOLLI, 2002).

As atividades de um laboratório requerem água de qualidade. A água purificada, na qualidade desejada, resulta das diferentes combinações de processos de tratamento. Não existe um método que isoladamente elimina ou remove todos os contaminantes orgânicos e inorgânicos (TAVARES et al., 2004; SILVA et al., 2006).

Para eliminar as impurezas que são fontes de contaminação bacteriana da água usada no laboratório, existem diversos processos de pré-tratamento. Esses removem partículas grosseiras em suspensão na água de alimentação, garantindo, assim, a vida útil dos equipamentos de destilação, filtração, ultrafiltração, adsorção em carvão ativado, deionização, radiação ultravioleta e osmose reversa (SILVA et al., 2006; MEDINA et al., 2010).

A destilação é um processo antigo, constituído pela ebulição, evaporação e condensação da água. A ebulição inativa bactérias e vírus, removendo muitos compostos orgânicos como os sais minerais, embora não possa remover substâncias inorgânicas dissolvidas. Economicamente não é viável pela alta quantidade de água consumida, na relação de 15 L para cada litro de água destilada produzida, e gasto de energia elétrica (0,7Kw/L) (TAVARES et al., 2004; MEDINA et al., 2010).

A deionização, ou desmineralização, é produzida por deionizadores de água que incorporam um cartucho descartável de polímeros orgânicos. Sua função é absorver nas resinas trocadoras de íons de hidrogênio ( $H^+$ ) os contaminantes catiônicos (cálcio, magnésio, ferro, sódio e outros metais e cátions). As resinas aniônicas trocam seus íons hidroxila ( $H^-$ ) por contaminantes aniônicos (sulfatos, cloratos, nitratos, fosfatos e outros ânions, além da sílica). A deionização usada isoladamente na purificação da água tem suas desvantagens, porque há fuga de partículas fragmentadas de resina dissolvida na água passante durante a troca de íons. É necessário um conjunto de filtros para obter água livre de partículas, uma vez que o processo não remove toda a matéria orgânica da água de alimentação, permitindo que as bactérias cresçam com rapidez na água estagnada dos cartuchos. Deve-se combinar a deionização com outros processos de purificação de melhor desempenho (BREDA, 2001; SILVA et al., 2006; MENDES et al., 2011).

A osmose reversa é constituída pela alta pressão hidráulica aplicada no processo de passagem da água por uma membrana semipermeável longitudinal, onde são separadas as partículas e impurezas, passando pelas paredes porosas das membranas a água purificada. Os equipamentos de osmose reversa apresentam menor desperdício da água (3L por litro de água purificada) e menor consumo de energia elétrica (BREDA, 2001; TAVARES et al., 2004; SILVA et al., 2006). A osmose reversa remove 99% das partículas orgânicas e 95% dos íons inorgânicos. Tem alta eficiência na purificação e remoção de bactérias e pirógenos. Pode ser combinada com a deionização para diminuir a frequência de regeneração das resinas de troca iônica e conseguir maior pureza da água (BREDA, 2001).

Com a utilização dos diferentes processos -destilação, osmose reversa ou deionização - é possível obter água tipo II, livre de impurezas orgânicas para a preparação de meios de cultura e aplicações analíticas no laboratório de microbiologia. A água tipo I e II deve ser utilizada logo após a purificação; não é possível armazená-la pelo risco de recontaminação a partir do ambiente durante seu armazenamento. (MEDINA et al., 2010; BREDA, 2001).

A radiação ultravioleta (UV) é um processo físico utilizado nos sistemas de desinfecção e purificação da água. Empregam-se lâmpadas com vapor de mercúrio, que emitem ondas de luz UV-C (185 nm a 254 nm). Para tratamento da água, as lâmpadas ficam em contato com o fluxo de água. Deve ser utilizada no estágio final de purificação para diminuir as impurezas orgânicas através da fotoxidação e melhorar a ação germicida (AGUIAR et al., 2002; BRASIL, 2010).

A radiação ultravioleta de 254 nm interfere na biossíntese bacteriana causando danos na estrutura do DNA, além de comprometer a síntese proteica das bactérias nos processos de transcrição e tradução do RNA (WRIGHT; CAIRNS, 1998; AGUIAR, 2000). A presença de matéria orgânica ou outras partículas em suspensão protegem as bactérias, depositando-se na superfície da lâmpada que diminui a profundidade de penetração da radiação UV, limitando e prejudicando a eficiência do método. A turbidez e baixas dosagens de radiação podem não inativar efetivamente as bactérias. No laboratório, é indispensável a aferição da qualidade da radiação UV no fluxo da água, a velocidade e tempo de utilização da fonte de radiação durante o processo de purificação (BRASIL, 2010).

Durante a rotina laboratorial é importante fazer a revisão e limpeza dos dispositivos e aparelhos de purificação, realizar a manutenção e examinar a qualidade da água purificada (WRIGHT; CAIRNS, 1998).

## **2.6 Contaminação bacteriana durante o processamento das doses inseminantes**

Althouse et al. (2005) demonstraram que o aumento da contaminação bacteriana resultava na aglutinação de espermatozoides, com diminuição da longevidade das doses inseminantes.

Já foram identificados em amostras de sêmen e dose inseminante de suíno, ao menos 25 gêneros de bactérias contaminantes, sendo as mais frequentes: *Escherichia coli*, *Pseudomonas sp.*, *Staphylococcus sp.*, *Proteus sp.*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter sp.* e *Klebsiella sp.* (ALTHOUSE et al., 2008; MAROTO et al., 2010).

Existe a possibilidade de contaminação do trato urogenital e do sistema reprodutor suíno por bactérias patogênicas que se originam da microbiota intestinal (MAES et al., 2008; MAROTO et al., 2010; BUSSALLEU et al., 2011). Entretanto a maioria das bactérias contaminantes do sêmen não é patogênica; porém, quando alcançam alto número na dose inseminante podem ter um efeito espermicida, alterando a qualidade e longevidade do espermatozoide (ALTHOUSE et al., 2000; ALTHOUSE; LU, 2005).

Os antimicrobianos impedem o crescimento e proliferação das bactérias, mas sua total eliminação não é garantida devido à resistência bacteriana. Além disso, condições ambientais (por exemplo temperatura de refrigeração) podem prejudicar a atividade dos antimicrobianos (SONE, 1990; MAES et al., 2008). As bactérias podem apresentar resistência à gentamicina, aminoglicosídeos, B-lactâmicos, lincosamidas e outros antimicrobianos utilizados em diluentes de sêmen suínos comercializados (ALTHOUSE et al., 2000; ALTHOUSE; LU, 2005).

As bactérias alteram a morfologia do espermatozoide afetando o funcionamento da motilidade flagelar ou causando prematura reação acrossômica (MAROTO et al., 2010). Induzem, ainda, uma alta incidência de aglutinação dos espermatozoides, lesão de acrossomas, motilidade deficiente e diminuição do período de viabilidade dos espermatozoides pela acidificação do meio, independentemente do diluente utilizado (ALTHOUSE et al., 2000; BIANCHI et al., 2006). A contaminação por bactérias

diminui a qualidade do sêmen ou causa infecção no sistema reprodutor das fêmeas suínas, como a endometrite (MAES et al., 2008). O aumento no retorno do estro, de 17 a 25 dias após inseminação artificial, pode variar de 17 a 100% em granjas suínas que aplicam doses inseminante contaminadas (ALTHOUSE et al., 2000; BIANCHI et al., 2006). A presença de populações elevadas de bactérias na dose inseminante afetaria sua capacidade de fertilização nas fêmeas suínas (MAROTO et al., 2010). Uma das bactérias mais pesquisadas é a *Escherichia coli* que pode estar presente no sêmen em quantidade variável. Adere-se à superfície do espermatozoide pela ligação manose-dependente produzindo lesões ultraestruturais na membrana celular, diminuindo a motilidade e aumentando a prevalência de aglutinação (DIEMER et al., 1996; ALTHOUSE et al., 2000; DIEMER et al., 2000).

Segundo Maroto et al. (2010), o sêmen suíno contaminado com *Escherichia coli* em contagens maiores que  $3,5 \times 10^3$  UFC/mL<sup>-1</sup> durante a refrigeração á 15°C apresenta alteração na fertilização e no tamanho de leitegada. Além disso, tem efeito prejudicial na qualidade do sêmen utilizado para inseminação artificial.

As cepas enterotoxigênicas e verotoxinogênicas da *Escherichia coli* podem sobreviver no sêmen, alterando a qualidade das doses inseminante, causando grandes perdas econômicas na indústria suína (BUSSALLEU et al., 2011). Doses inseminantes com elevada contaminação por *Escherichia coli* podem apresentar aglutinação, que tem um efeito negativo na motilidade dos espermatozoides. Os diluentes são meios muito ricos em nutrientes, suficiente para permitir o crescimento populacional de bactérias que podem aderir aos espermatozoides, tornando-os não funcionais durante a fertilização (MAROTO, 2010 *apud* BOLLWEIN et al., 2004).

As fontes de contaminações de origem animal provêm da coleta dos ejaculados e inclui, entre outras, a contaminação por fezes suínas, fluidos da cavidade prepucial, secreções respiratórias, pele e pelos (ALTHOUSE; LU, 2005). As fontes de contaminação, de origem não animal, podem ser provenientes da água contaminada na sua origem, ou nos barriletes de armazenamento da água purificada pelo sistema de osmose reversa. Além disso, sistema de ventilação deficiente no laboratório, vidraria não esterilizada, equipamentos com condições higiênicas inadequadas e a partir do manipulador podem contribuir para a contaminação (ALTHOUSE et al., 2000).

### 3 ARTIGO

ARTIGO A SER APRESENTADO Á COMISSÃO EDITORIAL DA REVISTA  
“PESQUISA VETERINÁRIA BRASILEIRA”

---

\*A formatação do artigo segue as normas da revista Pesquisa Veterinária Brasileira

**Qualidade microbiológica da água empregada em centrais de inseminação de suínos para  
produção de doses inseminantes**

*Microbiological quality of water used for the production of sperm doses in boar studs from  
southern Brazil*

Joaquin Paredes<sup>I</sup>; Vanessa Dias<sup>II</sup>; Maria Clara Silva de Almeida<sup>III</sup>; Marisa Cardoso<sup>IV</sup>

---

<sup>I</sup>Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV) Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil. E-mail [joaparvi@hotmail.com](mailto:joaparvi@hotmail.com)

<sup>II</sup>Técnica Laboratório de Medicina Veterinária Preventiva, Faculdade de Veterinária, UFRGS Porto Alegre, RS.

<sup>III</sup>Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV) Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil. Bolsista do Setor de Suínos-UFRGS.

<sup>IV</sup>Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Faculdade de Veterinária, UFRGS Porto Alegre, RS.

## RESUMO

A água empregada na produção de doses inseminantes (DIs) de suínos é um dos veículos de introdução de bactérias contaminantes, podendo levar à perda de qualidade das DIs. O objetivo do presente estudo foi avaliar o número de mesófilos aeróbios totais na água utilizada em centrais de inseminação de suínos e sua influência nas contagens bacterianas das DIs produzidas. Foram conduzidos três ciclos de amostragem em seis centrais de inseminação (A-F), intencionalmente incluídas no estudo de acordo com os critérios: estar localizada no sul do Brasil; produzir >1.000 DIs mensais e concordar em participar do estudo. A cada ciclo, foram colhidas amostras de água antes da purificação, água após a passagem pelo sistema de purificação, água após armazenamento, diluente, sêmen in natura de três machos distintos de fertilidade comprovada, e das respectivas doses inseminantes preparadas com sêmen e diluente amostrados. A água colhida antes do sistema de purificação foi avaliada quanto ao número mais provável (NMP) de coliformes totais e *Escherichia coli* em 100 mL, pela técnica dos tubos múltiplos. Todas as amostras colhidas foram avaliadas quanto ao número de mesófilos aeróbios totais (MAT), por meio da semeadura em profundidade em Ágar para Contagem (PCA). Todas as 18 amostras de água colhidas antes da purificação apresentaram <1,1 NMP.100 mL<sup>-1</sup> de *Escherichia coli*. A média de MAT nas amostras de água variou entre 0,1 log UFC.mL<sup>-1</sup> na água após-purificação da central E e 3,5 logUFC.mL<sup>-1</sup> na água antes da purificação da central F. Não houve diferença significativa (P>0,05) entre as contagens médias de MAT obtidas em diferentes tipos de amostra de água e entre as centrais de inseminação. A média de MAT nas amostras de diluente variou de 0,16 log UFC. mL<sup>-1</sup> a 2,78 logUFC.mL<sup>-1</sup>. As centrais D e F apresentaram diluentes significativamente (P<0,05) mais contaminados. No sêmen, a média de MAT variou de 1,75 log UFC.mL<sup>-1</sup> a 3,79 log UFC.mL<sup>-1</sup> e nas DIs entre 0,73 logUFC.mL<sup>-1</sup> e 2,88 logUFC.mL<sup>-1</sup>. A central de inseminação F apresentou média de MAT significativamente (P<0,05) maior que as demais centrais. Considerando os padrões existentes, conclui-se que a água captada, purificada e armazenada apresentou boa qualidade microbiológica em todas as centrais de inseminação e não influenciou a média de mesófilos aeróbios totais das DIs preparadas. O incremento de bactérias, quando observado, foi provavelmente resultante da contaminação de origem ambiental durante o preparo do diluente e das doses inseminantes.

**Palavras chaves:** Mesófilos aeróbios totais, água purificada, diluente contaminado, sêmen suíno, doses inseminantes.

**ABSTRACT**

*The water employed in the production of insemination doses (IDs) of swine may be one of the vehicles for introduction of contaminant bacteria, and can lead to their quality loss. The objective of this study was to assess the number of total aerobic mesophilic in water used in swine artificial insemination centers and its influence in the total bacterial counting of the IDs produced. Three cycles of sampling were conducted in six artificial insemination centers (A-F) intentionally included in the study according to the criteria: to be located in the south of Brazil, to produce > 1.000 (IDs) monthly, and to agree in participating of the study. At each cycle, samples were collected from water before of the purification, water after passage through the purification system, water after storage, extender, fresh semen from three different boars and the respective (ID) prepared with the semen and extender sampled. The water collected before the purification system was evaluated for the most probable number (NMP) of total coliforms and *Escherichia coli* in 100 mL using the multiple tubes technic. All samples collected were evaluated for the number of total aerobic mesophilic (TAM) by the pour plate technic. All the 18 samples of water collected before the purification presented < 1.1 NMP. 100 mL<sup>-1</sup> of *Escherichia coli*. The average TAM in the water samples varied between 0.1 log.CFU. mL<sup>-1</sup> in the water after purification of the central E and 3.5 log. CFU.mL<sup>-1</sup> in the water before purification of the central F. There was no significant difference (P>0.05) among the average counting of TAM obtained in different water samples types and among SAICs. The average MAT samples of diluents varied from 0.16 log.CFU.mL<sup>-1</sup> to 2.78 log.CFU.mL<sup>-1</sup>; the central D and F presented diluents significantly (P< 0.05) more contaminated. In the semen samples, the average MAT varied from 1.75 log.CFU.mL<sup>-1</sup> to 3.79 log CFU.mL<sup>-1</sup> and in the DIs between 0.73 log.CFU.mL<sup>-1</sup> and 2.88 log.CFU.mL<sup>-1</sup>. The central F presented average of TAM significantly (P<0.05) higher than the others SAICs. Considering the available standards, it is concluded that the water collected, purified and stored presented a good microbiological quality in all insemination centers and had no influence the average of TAM in the prepared IDs. The increase on bacterial population may have resulted from contamination of environmental origin during the preparation of the extender and insemination doses.*

**Key-words:** *Total aerobic mesophilic, purified water, diluent contamination, boar semen, insemination doses*

## INTRODUÇÃO

Na suinocultura moderna, o manejo reprodutivo visando o aproveitamento da genética dos reprodutores e a diminuição dos custos de produção, ampliou o uso da técnica de inseminação artificial (Bortolozzo et al., 2005). Em decorrência disso, houve o incremento no processamento do sêmen suíno que é coletado, avaliado, diluído e armazenado, constituindo as chamadas doses inseminantes (DI). Por meio dessas, objetiva-se manter os espermatozoides viáveis e férteis por um tempo maior, otimizando seu emprego nas centrais da inseminação artificial (CIAs) ou permitindo a distribuição das DIs para granjas onde estão alojadas as matrizes. Por outro lado, o processamento aumenta o risco da introdução e multiplicação de micro-organismos contaminantes nas DIs, o que pode acarretar a perda de qualidade das mesmas (Althouse et al., 2000; Waberski et al., 2008).

A coleta de sêmen suíno não é um processo asséptico (Althouse e Lu, 2005), porém os procedimentos adotados durante a coleta influenciam diretamente o nível de sua contaminação (Dias et al., 2000; Benneman et al., 2000; Waberski et al., 2008). As etapas subsequentes, durante a preparação das DIs, também podem determinar o aumento da população microbiana, devido ao contato do sêmen com utensílios e frascos não esterilizados, ou à utilização de diluente contaminado (Althouse ; Lu, 2005). A contaminação do diluente, por sua vez, pode ocorrer pela falta de higiene durante seu preparo ou pelo uso de água de má qualidade (Althouse et al., 2000).

De acordo com a legislação, a água utilizada na produção animal deve apresentar padrão microbiológico compatível à classe 3 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) para água doce, o qual prevê que, em no mínimo seis amostras colhidas em um período de um ano, 80% devem conter até 1.000 coliformes termotolerantes em 100 mL de amostra (CONAMA, 2005). No caso do uso de água subterrânea para a dessedentação animal, o padrão estabelecido pelo CONAMA prevê que o valor máximo permitido é de 200 coliformes termotolerantes em 100 mL de amostra (CONAMA, 2008). Entretanto, a água utilizada na

produção de aves e suínos apresenta, geralmente, qualidade superior aos padrões previstos na legislação.

No que diz respeito à preparação de DIs, aconselha-se (Mellagi, 2011) a utilização de água reagentes tipo II na classificação do National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 1997) e do Instituto Nacional de Metrologia (INMETRO, 2001). Segundo esses padrões, a água tipo II pode apresentar no máximo 1.000 Unidades Formadoras de Colônia (UFC.mL<sup>-1</sup>) de bactérias mesófilas aeróbias totais. Apesar de ser aconselhada a utilização imediata da água purificada, a maioria das CIAs realiza seu armazenamento em barriletes, para permitir o preparo do número necessário de DIs para atender a rotina de inseminação artificial. Dessa forma, além da qualidade da água captada, a eficácia do sistema de purificação e o risco de recontaminação durante o armazenamento podem influenciar o número de bactérias presente na água utilizada no preparo das DIs.

Uma vez que a água representa um componente crucial no preparo das DIs, o objetivo desse estudo foi avaliar o número de bactérias, mesófilas aeróbias totais (MAT) na água utilizada em centrais de inseminação de suínos e sua influência nas contagens bacterianas das DIs produzidas.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Foram conduzidos três ciclos de amostragem em seis centrais de inseminação, intencionalmente incluídas no estudo, de acordo com os critérios: serem localizadas nas regiões do Rio Grande do Sul e Santa Catarina; produzirem >1.000 DIs mensais; e concordarem em participar do estudo. As coletas de amostra em cada central aconteceram mensalmente, no período de julho a novembro de 2012. A caracterização das centrais de inseminação, em termos do tipo de água captada e seu sistema de purificação, encontram-se na Tabela 1.

**Tabela 1:** Caracterização de seis centrais de inseminação de suínos, amostradas no sul do Brasil em 2012, quanto à origem de captação de água, sistema de purificação de água e média mensal de doses inseminantes produzidas.

<b>Central de Inseminação</b>	<b>Origem da água captada</b>	<b>Sistema de Purificação</b>	<b>Média mensal de doses inseminantes</b>
A	Poço artesiano	Osmose reversa e luz ultravioleta	16.000
B	Poço artesiano	Osmose reversa e luz ultravioleta	6.000
C	Poço artesiano	Osmose reversa e luz ultravioleta	18.000
D	Poço artesiano	Osmose reversa	18.000
E	Poço artesiano	Osmose reversa e luz ultravioleta	8.000
F	Poço artesiano	Osmose reversa e luz ultravioleta	3.000

A cada ciclo, eram colhidas amostras (120 mL) de água: antes da purificação (água captada pela central de inseminação); após a passagem pelo sistema de purificação; e após armazenamento. Uma amostra de diluente foi colhida imediatamente após a suspensão do produto comercial em pó na água armazenada que havia sido amostrada. Cada tipo de amostra foi colhida assepticamente, do ponto de saída dos respectivos tipos de água (antes ou após a purificação e após armazenamento), da mesma forma como era realizada a coleta rotineira para seu uso no laboratório (NCCLS, 1997). A amostra (10 mL) de diluente foi retirada diretamente do recipiente onde o mesmo havia sido preparado. Além disso, foram colhidas alíquotas (10 mL) de sêmen “in natura” de três machos coletados nesse mesmo dia e das respectivas DIs preparadas com sêmen e diluente amostrados. Todas as amostras foram colhidas em frascos

plásticos estéreis e remetidas ao laboratório em caixas isotérmicas com gelo reciclável. O processamento das amostras ocorreu no prazo máximo de 24 horas.

A água colhida antes do sistema de purificação foi avaliada quanto ao Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais e *Escherichia coli* pela técnica dos tubos múltiplos, utilizando o método COLILERT® (Idexx Laboratories), conforme as recomendações do fabricante. Os resultados obtidos foram expressos em NMP em 100 mL de amostra (NMP.100 mL<sup>-1</sup>).

Todas as amostras colhidas foram avaliadas quanto ao número de mesófilos aeróbios totais (MAT), por meio da semeadura em profundidade em Ágar para Contagem, (Himedia) como descrito anteriormente (Silva et al., 2010). Os resultados foram expressos em Unidades Formadoras de Colônia por mililitro. (UFC.mL<sup>-1</sup>).

As contagens de mesófilos aeróbios totais, obtidas em cada tipo de amostra proveniente de cada central de inseminação foram transformadas em logaritmo na base 10 (log) e analisadas por ANOVA. As médias obtidas foram comparadas pelo teste de Tukey-Kramer (múltiplas médias). Para análise foi utilizado o programa estatístico SPSS versão 1.8, com nível de confiança de 95%.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Todas as 18 amostras de água colhidas antes da purificação apresentaram <1,1 NMP.100 mL<sup>-1</sup> de *Escherichia coli*. O número de coliformes totais em 100 mL de amostra variou de <1,1 NMP a >23 NMP; em 44,5% das amostras foi inferior a < 1,1 NMP.100 mL<sup>-1</sup>. Esses parâmetros demonstram a boa qualidade da água captada, os quais estão de acordo até mesmo com os valores máximos permitidos para água potável para humanos (Brasil, 2011). Esse resultado está, provavelmente, relacionado ao uso de água subterrânea captada por poços artesianos em todas as centrais estudadas.

Águas subterrâneas geralmente vertem por nascentes incrustadas em morros com ampla cobertura vegetal e apresentam normalmente ótimo padrão de potabilidade (Rheinheimer et al.,

2010). Entretanto, a ação antrópica em áreas rurais, como a deposição de dejetos animais não tratados no solo, contribui para a poluição da água subterrânea (Colvara et al., 2009). Áreas com exploração intensa de animais têm sido apontadas como de maior risco para a perda da qualidade da água (Rheinheimer et al., 2003), entretanto os resultados do presente estudo não demonstram a deterioração da água subterrânea nos locais onde as centrais estão estabelecidas. Esse resultado corrobora com estudo publicado recentemente, que relatou que a água subterrânea utilizada em região de exploração de suínos no Noroeste do Rio Grande do Sul estava em conformidade com os parâmetros da legislação brasileira, levando os autores a concluir que ainda não houve efeito deletério na água de abastecimento da comunidade, em decorrência da exploração de suínos na região (Nanni et al., 2012).

A média de MAT nas amostras de água variou entre 0,15 log UFC.mL<sup>-1</sup> na água pós-purificação da central E até 3,49 log UFC.mL<sup>-1</sup> na água antes da purificação da central F (Tabela 2). Não houve diferença significativa ( $P > 0,05$ ) entre as contagens médias obtidas em diferentes tipos de amostra e entre as centrais de inseminação. Estes resultados indicam que em todas as centrais não houve alteração significativa da qualidade microbiológica da água, independente do tipo de sistema de purificação e armazenamento empregado.

Um aspecto que deve ser considerado é que na água captada, além de não haver contaminação de origem fecal, indicada pela ausência de *E.coli* em todas as amostras colhidas, a contagem média de MAT ficou entre 1,58 logUFC.mL<sup>-1</sup> e 3,49 logUFC.mL<sup>-1</sup>. Resultados similares haviam sido relatados em amostras de água subterrânea colhidas na região do rio Lajeado Suruvi, em Santa Catarina. Nesse estudo, foram encontradas contagens de mesófilos aeróbios totais entre  $4,05 \times 10^1$  e  $1,3 \times 10^4$  UFC.mL<sup>-1</sup>, o que equivale a 1,61 log UFC.mL<sup>-1</sup> e 4,11 log UFC.mL<sup>-1</sup> (Schneider et al., 2008). A legislação que regulamenta o controle das águas subterrâneas brasileiras não prevê valores máximos permitidos para mesófilos aeróbios totais (CONAMA, 2008). Entretanto, a legislação que regulamenta o padrão de potabilidade da água (Brasil, 2011) estabelece que no sistema de distribuição de água tratada esse grupo de micro-organismos não pode exceder de 500 UFC.mL<sup>-1</sup>. Em face desses parâmetros, é possível afirmar

que a água captada nas centrais apresentava muito boa qualidade do ponto de vista dos parâmetros microbiológicos.

Mesmo nas situações em que a água captada em poços artesianos ou recebida do sistema de tratamento urbano apresente padrões de potabilidade, ainda poderão estar presentes quantidades variáveis de micro-organismos, materiais orgânicos e inorgânicos, não sendo adequada para o emprego em laboratório. Essas impurezas alteram características como pH e condutividade da água, exercendo efeito deletério sobre células ou alterando reagentes preparados e ensaios realizados no laboratório. No Brasil, está determinado (INMETRO, 2001) que, para o preparo de soluções e ensaios em laboratórios clínicos humanos, deve ser empregada Água Reagente (AR) Tipo II (NCCLS, 1997). Para laboratórios veterinários não há especificação, porém a utilização de AR Tipo II foi aconselhada para a preparação de diluentes para as DIs em centrais de inseminação artificial de suínos (Mellagi, 2011). No presente estudo, algumas amostras colhidas após o sistema de purificação em três centrais (A, B, F) estavam em desacordo com o valor máximo previsto ( $3 \log \text{UFC.mL}^{-1}$  de MAT), apesar da contagem média desses micro-organismos estar dentro do limite estabelecido, em todas as centrais (Tabela 2). Esse resultado evidencia que, em algumas ocasiões, doses inseminantes foram preparadas com água que não foi suficientemente purificada. Essa falha pode ser causada pela exaustão do sistema de troca iônica, decorrente do acúmulo de contaminantes no sistema de osmose reversa, ou pelo rompimento de filtros (NCCLS, 1997). Por essa razão, o controle, limpeza e reposição dos componentes do sistema de purificação deve ser parte da rotina do laboratório que prepara as DIs.

Durante o armazenamento, a qualidade microbiológica da água permaneceu inalterada, pois não houve diferença significativa nas médias de MAT observadas em amostras colhidas antes e após essa etapa (Tabela 2). A limpeza dos barriletes de armazenamento pode ser um ponto crítico nos laboratórios que preparam as DIs, pois a dificuldade de sua higienização pode levar à formação de biofilmes microbianos que constituem fonte permanente de contaminação para a água armazenada (Waberski et al., 2008). Portanto, a manutenção da qualidade

microbiológica da água armazenada foi um aspecto positivo observado nas CIAs, o que indica que estão sendo tomadas medidas corretas de controle.

**Tabela 2** – Média (log UFC.mL<sup>-1</sup>) em amostras de água de seis centrais de inseminação de suínos do sul do Brasil, colhidas antes e após a passagem por sistema de purificação e durante o armazenamento.

Central de Inseminação	Média (log UFC.mL <sup>-1</sup> ) de mesófilos aeróbios totais (mínimo e máximo)		
	Antes da purificação	Após a purificação	Armazenada
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 Colônia

Não houve diferença significativa ( $P>0,05$ ) entre as centrais de inseminação.

O sucesso da inseminação artificial depende, entre outros fatores, da manutenção da capacidade fertilizante das células espermáticas, sendo essa a principal função dos diluentes empregados na produção das doses inseminantes (Bortolozzo et al., 2005). Por outro lado, o preparo do diluente pode ser uma das etapas que contribui para a introdução de bactérias na dose inseminante, tanto pela utilização de água de baixa qualidade para a suspensão dos produtos comerciais em pó, quanto pelo contato com recipientes ou ambientes contaminados (Althouse, 2000; Waberski et al., 2008). Nas centrais estudadas, a média de MAT nos diluentes variou de 0,16 log UFC.mL<sup>-1</sup> (central E) a 2,78 log UFC.mL<sup>-1</sup> (central F) (Tabela 3). As centrais D e F apresentaram diluentes significativamente ( $P<0,05$ ) mais contaminados do que as demais centrais estudadas. Uma vez que não houve diferença significativa, entre centrais, no número de mesófilos aeróbios totais na água utilizada para a suspensão do diluente, é possível inferir que os procedimentos de preparo foram os responsáveis pela maior contaminação observada.

A coleta do ejaculado suíno não é um processo livre de contaminação; apenas centrais com padrões higiênicos muito elevados conseguem obter sêmen livre de bactérias (Schulze et al., 2012). Nas centrais amostradas no presente estudo, a média de MAT variou de 1,75 log UFC.mL<sup>-1</sup> (central F) à 3,79 log UFC.mL<sup>-1</sup> (central D) (Tabela 3). As médias de MAT relatadas em estudos conduzidos em centrais de inseminação de suínos variam de 10<sup>2</sup> (2 log UFC.mL<sup>-1</sup>) até 10<sup>5</sup> (5 log UFC.mL<sup>-1</sup>) (Dias et al., 2000; Goldberg, 2009; Schulze et al., 2012).

O protocolo adotado na limpeza das instalações e dos animais, bem como os procedimentos de coleta como uso de sobreluva e esvaziamento completo do divertículo prepucial demonstraram ser capazes de diminuir de 4 log UFC.mL<sup>-1</sup> para 2 log UFC.mL<sup>-1</sup>, a contagem de MAT no sêmen coletado em centrais de inseminação de suínos (Dias et al., 2000). Pelos prepuciais compridos, luva de coleta suja e líquido pingando pela mão do coletador para o interior do frasco de coleta são fatores de risco para o aumento do percentual de ejaculados com contagens superiores à 2 log UFC.mL<sup>-1</sup> de MAT (Goldberg, 2009). O mesmo autor constatou que contagens iniciais inferiores à 2 log UFC.mL<sup>-1</sup>, originavam DIs com baixa contaminação bacteriana (<1 log UFC.mL<sup>-1</sup>), após 48 horas de armazenamento. No presente estudo apenas a central F apresentou médias de MAT inferiores a 2 log UFC.mL<sup>-1</sup>, demonstrando que ainda há aspectos na coleta de sêmen que podem ser melhorados nas centrais de inseminação artificial suína.

As DIs preparadas, a partir do sêmen e diluente que haviam sido amostrados, apresentaram médias de MAT entre 0,73 log UFC.mL<sup>-1</sup> (Central B) e 2,88 log UFC.mL<sup>-1</sup> (Central F) (Tabela 3). As centrais D e F apresentaram média de MAT significativamente maior que as demais centrais, coincidindo com os resultados obtidos na análise do diluente. No caso da Central F, apesar de ter sido a única onde o sêmen coletado apresentou média de MAT inferior a 2 log UFC.mL<sup>-1</sup>, houve incremento expressivo do número de bactérias nas doses inseminantes, demonstrando a importância da higiene em todas as etapas da coleta de sêmen preparadas do diluente e processamento das DIs. Em todas as centrais, exceto a F, as DIs apresentaram médias de MAT inferiores as do sêmen, resultado esperado em virtude do efeito

da diluição que ocorre durante a preparação das doses inseminantes. Nessa central, além do emprego de diluente que apresentava maior nível de contaminação, provavelmente houve incremento do número de mesófilos aeróbios durante a preparação das DIs. Estudo conduzido em centrais de inseminação europeias (Schulze et al., 2012) demonstrou que médias de MAT maiores do que 100 UFC.cm<sup>-1</sup> foram encontradas na superfície de estufas (46%), pias (42%), sistema de transferência do ejaculado (29%), teclado de equipamentos (29%), parte interna da tampa do tanque de diluição (17%) e superfícies de bancadas (13%). Nessas centrais, apenas 8% dos diluentes amostrados apresentavam > 100 UFC.mL<sup>-1</sup> (2 log UFC mL<sup>-1</sup>), demonstrando que o ambiente e as superfícies em contato com a DIs durante a preparação eram a origem do aumento da contagem microbiana das mesmas.

**Tabela 3** – Mediana de contagem de mesófilos aeróbios totais em amostras de diluente, sêmen e doses inseminantes colhidas em seis centrais de inseminação do Sul do Brasil, 2012.

Central de Inseminação	Contagem média (Log UFC.mL <sup>-1</sup> ) de mesófilos aeróbios (desvio padrão)		
	Diluente	Sêmen	Dose inseminante
A	0,77 (0,79) <sup>ab</sup>	2,38 (0,97) <sup>ab</sup>	1,62 (0,34) <sup>ab*</sup>
B	0,50 (0,80) <sup>ab</sup>	2,91 (0,74) <sup>bc</sup>	0,73 (1,00) <sup>ab</sup>
C	1,11 (1,39) <sup>b</sup>	2,34 (0,85) <sup>ab</sup>	1,46 (1,34) <sup>b</sup>
D	2,18 (0,65) <sup>c</sup>	3,79 (0,66) <sup>c</sup>	2,09 (1,41) <sup>c</sup>
E	0,16 (0,27) <sup>a</sup>	2,74 (1,10) <sup>abc</sup>	1,36 (1,53) <sup>a</sup>
F	2,78 (0,86) <sup>c</sup>	1,75 (0,43) <sup>a</sup>	2,88 (0,98) <sup>c</sup>

\* Letras minúsculas distintas nas colunas indicam diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre as médias.

UFC= Unidades Formadoras de Colônia

Na maioria das centrais, são acrescentados antimicrobianos às DIs, como forma de manter a população microbiana estável durante o armazenamento a 17°C, o qual pode se estender até três

dias (Bortolozzo et al., 2005). Nessa temperatura, o tempo de geração das bactérias mesófilas aumenta, porém ainda há crescimento populacional. Elevadas populações bacterianas, por sua vez, podem exercer efeito deletério sobre as DIs, como aglutinação dos espermatozoides, lesões de acrossoma, acidificação e perda de motilidade (Althouse, 2000; Althouse; Lu, 2005; Althouse, 2008). Deve-se considerar que o uso de antimicrobianos nas DIs é capaz de diminuir o número de bactérias, porém não elimina totalmente a contaminação (Bennemann, 2008), pelo fato de que muitas bactérias contaminantes são resistentes aos antimicrobianos utilizados nas DIs (Schulze et al., 2012). Dessa forma, o uso de antimicrobianos não substitui ou reverte desvios nas boas práticas de preparo das DIs. Essas boas práticas, por sua vez, devem incluir, no mínimo os seguintes cuidados: a higiene rigorosa durante a coleta do ejaculado, a inspeção da limpeza de tubulações e recipientes em contato com a água, diluente ou DIs; e a limpeza das superfícies do laboratório. Além disso, o monitoramento periódico da qualidade da água e da eficácia do sistema de purificação deve ser parte da rotina do laboratório.

## CONCLUSÕES

A água captada, purificada e armazenada apresentou qualidade microbiológica satisfatória em todas as centrais de inseminação. Nas condições do estudo, a qualidade de água não influenciou a média de mesófilos aeróbios totais das DIs preparadas. O incremento de mesófilos aeróbios totais, quando observado, foi provavelmente resultante da contaminação de origem ambiental durante o preparo do diluente e das doses inseminantes.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTHOUSE et al. Field investigations of bacterial contaminants and their effects on extended porcine semen. **Theriogenology**, United States, v. 53, n. 5, p.1167-1176, Mar. 2000.

ALTHOUSE, G.C.; LU, K.G. Bacteriospermia in extended porcine semen. **Theriogenology**, United States, v.63, n.5, p. 573-584, Jan. 2005.

ALTHOUSE, G.C. Sanitary procedures for the production of extended semen. **Reproduction in Domestic Animals**.United States, v. 43, p.374-378. July. 2008. Suplemento 2.

BENNEMANN, P.E. **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. 254 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1998.

BENNEMANN et al. Motilidade espermática e integridade acrossomal em doses de sêmen suínos refrigeradas e inoculadas com *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. **Ciência Rural** Santa Maria, v.30, n.2, p.313-318, 2000

BRASIL MINISTÉRIO DE SAÚDE. 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, dez. 2011, 26 p.

BORTOLOZZO, F. P. et al. **Suinocultura em ação, 2:** Inseminação artificial na suinocultura tecnificada. Porto Alegre Pallotti. 2005. 183 p.

COLVARA, J.G.; LIMA, A.S.; SILVA, W.P. Avaliação da contaminação da água subterrânea em poços artesianos no sul do Rio Grande do Sul. **Brazilian Journal of Food Technology**. RS-Brasil p. 1-14, jan. 2009.

CONAMA, CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. Resolução n. 357 de 17 de março de 2005. Classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes e da outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 18 mar. 2005, p.58-63.

CONAMA. Resolução n. 396 de 3 de abril de 2008. Dispõe sobre a classificação e diretrizes ambientais para o enquadramento das águas subterrâneas e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, n.066, 7 de abril, 2008, p. 64-68.

DIAS et al. Grau de contaminação bacteriana no ejaculado de suínos submetidos a dois métodos de higienização e coleta. **Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS**, Porto Alegre. v. 28, n.1, p.32-40, 2000.

GOLDBERG, A.M.G. **Fatores de risco para a contaminação bacteriana durante a coleta do ejaculado suíno e suas consequências sobre a qualidade das doses inseminantes.** 2009. 44 f. Dissertação de (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2009. Disponível em: <<http://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/16234/000698777.pdf?sequence=1>>. Acesso em: 17 jun. 2012.

INMETRO INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA. 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. abr. 2001. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/reblas/cursos/qualidade2/DICLA\\_083.pdf](http://www.anvisa.gov.br/reblas/cursos/qualidade2/DICLA_083.pdf)>. Acesso em: 3 jan. 2013.

MELLAGI, A.P.G. Fatores de risco para contaminação das doses de sêmen: como otimizar a higiene na coleta e processamento do ejaculado. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE SUINOCULTURA, 6., 10 a 13 de maio, 2011, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: SUINOTEC, 2011. p. 6-16.

NANNI et al. 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**, Porto Alegre, v.17, n.2, p.43-51. abr./jun. 2012.

NCCLS NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS  
Preparation and testing of reagent water in the clinical laboratory: approved guideline. 3<sup>rd</sup> ed.  
**USA Document C3A3**, Wayne, v. 17. n. 18. 64 p. Oct. 1997.

RHEINHEIMER et al. 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.set.out. 2010.

RHEINHEIMER, D.S.; GONÇALVES, C.S.; PELLEGRINI, J.B.R. Impacto das atividades agropecuárias na qualidade da água. **Ciência & Ambiente**, Santa Maria, v. 27, n. 2, p. 85-96, 2003.

SILVA et al. Contagem total de micro-organismos aeróbios mesófilos, e psicotróficos em placas. In: Manual de métodos de análises microbiológica de Alimentos e água. 4. ed. São Paulo: Varela, 2010. cap. 6. p.95-105.

SCHNEIDER, R. N. et al. Caracterização da microbiota mesófila aeróbia de águas superficiais e subterrâneas da microbacia do Lajeado Suruvi. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v.36, n.1, p.7-12, 2008.

SCHULZE, M. et al. Benchmarking, standards and production procedures in European boar studs. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE SUINOCULTURA, 6., 15-18 de maio, 2012, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: SUINOTEC, 2012. p. 1-15.

WABERSKI, D.; PETRUNKINA, A.M.; TÖPFER-PETERSEN, E. Can external quality improve pig AI efficiency? **Theriogenology**, Los Altos, v.70, n.8, p.1346 - 1351 nov. 2008.

#### **4 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

A água é um componente essencial nas atividades de laboratório, desta forma deve haver um adequado processo de purificação, procurando a remoção das impurezas e da contaminação bacteriana. Também é importante fazer uma contínua manutenção e revisão do equipamento de purificação, para garantir uma melhor qualidade no método do tratamento durante a purificação da água.

Durante o período de armazenamento da água purificada, os riscos de contaminação bacteriana podem acontecer mediante a formação de biofilmes nos barriletes, com efeito deletério para a pureza da água.

Estudos realizados descrevem que os diluentes contem nutrientes suficientes para fornecer um meio adequado para o crescimento bacteriano. O acréscimo de antimicrobianos pode contribuir para o controle de bactérias, mas não é suficiente para reverter desvios nas boas práticas de produção das DIs.

Portanto, as centrais de inseminação devem concentrar esforços no treinamento de pessoal, na elaboração de procedimentos padronizados de produção de DIs e no monitoramento periódico da qualidade microbiológica da água purificada, do sêmen e das DIs produzidas.

## REFERÊNCIAS

- AGUIAR, A. M. S. et al. Avaliação do emprego da radiação ultravioleta na desinfecção de águas com turbidez e cor moderadas. **Engenharia Sanitária Ambiental**, Rio de Janeiro, v.7, n.1, p. 37-47, jan. mar. 2002.
- AGUIAR, A.M.S. **Avaliação do emprego da radiação ultravioleta na desinfecção de águas com cor e turbidez moderada**. 2000. 111 f. Dissertação (Mestrado em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos) - Escola de Engenharia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2000.
- ALTHOUSE, G.C. et al. Field investigations of bacterial contaminants and their effects on extended porcine semen. **Theriogenology**, Los Altos, v.53, n.5, p.1167-1176, Mar. 2000.
- ALTHOUSE, G.C.; LU, K.G. Bacteriospermia in extended porcine semen. **Theriogenology**, Los Altos, v.63, n.2, p. 573-584. Jan. 2005.
- ALTHOUSE, G.C.; PIERDON, M.S. ; LU, K.G. Thermotemporal dynamics of contaminant bacteria and antimicrobials in extended porcine semen. **Theriogenology**, Los Altos, v.70, n.8, p.1317-1323, Nov. 2008.
- BELLAVER, C.; OLIVEIRA, P.A.V. Balanço de água nas cadeias de aves e suínos. **Avicultura Industrial**. Concórdia, n. 10, p. 30-44, 2009.
- BIANCHI, I. et al. Importância do uso da inseminação artificial na prevenção da veiculação de patógenos através do sêmen suíno. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 30, n. 1/2, p. 72-77, jan./jun. 2006.
- BOLLWEIN, H. et al. The incidence of agglutination and its influence on sperm quality and fertility of boar semen. **Berliner Munchener Tierarztliche Wochenschrift**, Hannover, v. 117, n. 7-8, p. 327-333. July/Aug. 2004.
- BORTOLOZZO, P. F.; WENTZ, I. Incremento da eficiência reprodutiva em programa de inseminação artificial I.A. no suíno. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 11., 1995, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1995. p.131-141.
- BORTOLOZZO, F. P.; WENTZ I. Inseminação artificial em suínos no Brasil **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. Belo Horizonte v.21, n.3, p. 13-15, 1997.
- BORTOLOZZO, F.P.; WENTZ, I. Viabilidade técnica e econômica da inseminação artificial (IA) em suínos: pontos críticos da IA. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE SUINOCULTURA, 3., São Paulo, 1998., **Anais...** São Paulo: Agroceres, 1998. p. 101-112.
- BORTOLOZZO, F.P.; WENTZ, I.; DALLANORA D. Situação atual da inseminação artificial em suínos. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v.33, n.1, p.117-132, ago, 2005.

BORTOLOZZO, F.P.; WENTZ, I.; DALLANORA, D. Avanços na inseminação artificial de suínos. In: ENCONTROS TÉCNICOS ABRAVES-RS. **Anais...** Estrela: ABRAVES, 2002. p.01-20.

BORTOLOZZO, F. P.; GOLDBERG, G. A. M.; WENTZ, I. Até onde é possível reduzir o número de espermatozoides empregados na inseminação artificial intra-cervical em suínos sem comprometer a fertilidade? **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v.36, p.17-26, maio 2008. Suplemento 1.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria n. 518, de 25 de março de 2004. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2005. DF. 34 p.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Vigilância e controle da qualidade da água para consumo humano. Brasília-DF: (Série B. Textos Básicos de Saúde). **Ministério da Saúde** 212 p. 2006.

BRASIL. **Farmacopeia brasileira** 5 ed. São Paulo: Agencia Nacional de Vigilância Sanitária, 2010. 546 p.

BRASIL Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Portaria nº 2914 de 12 de dezembro de 2011 Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. **Diário Oficial [da] União**, Brasília, DF, 14 dez. 2011. 32 p. Disponível em: <[http://www.suvisa.rn.gov.br/contentproducao/aplicacao/sesap\\_suvisa/arquivos/gerados/portaria\\_ms\\_2914\\_dez\\_2011.pdf](http://www.suvisa.rn.gov.br/contentproducao/aplicacao/sesap_suvisa/arquivos/gerados/portaria_ms_2914_dez_2011.pdf)>. Acesso em 5 jul. 2012.

BREDA, E. M. **Água grau reagente para laboratório e outros fins especiais**. Set. 2001. 29 f. Disponível em: <<http://www.apostilaz.com.br/educacionais/Agua-grau-reagente-para-laboratorios.html>>. Acesso em: 18 out. 2009.

BUSSALLEU, E. et. al. Effects of different concentration of enterotoxigenic and verotoxigenic Escherichia coli on boar sperm quality. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 127, n. 3-4, p. 176-182. Sept, 2011.

CETESB. Ministério do Meio Ambiente. **Qualidade das águas interiores no Estado de São Paulo: Série relatórios técnico**: apêndice A: significado ambiental e sanitário das variáveis de qualidade das águas e dos sedimentos e metodologias analíticas e de amostragem. São Paulo, 2009. 44 p. (Série Relatórios).

CONAMA. CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. Resolução n. 357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] União**, Brasília, DF, 18 mar. 2005 p.58-63.

CONAMA. Resolução n. 396 de 3 de abril de 2008. Dispõe sobre a classificação e diretrizes ambientais para o enquadramento das águas subterrâneas e dá outras

providências. Publicada no **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, n.066, 7 de abril de 2008, p. 64-68.

DAVIES-COLLEY, R. J. et al. Water quality impact of a dairy cow herd crossing a stream. **New Zealand Journal of Marine Freshwater Research**, Hamilton, v. 38, n. 4, p. 569-576, Aug. 2004.

DOREAU, M. et al. Water use by livestock: A global perspective for a regional issue? **Animal Frontiers** Champaign v. 2, n. 2, p. 9-16. Apr, 2012.

DIEMER, T. et al. Influence of Escherichia coli on motility parameters of human spermatozoa in vitro. **International Journal of Andrology**, Copenhagen. v. 19, n. 5 p. 271-277, Oct. 1996.

DIEMER, T. et al. Escherichia coli induced alterations of human spermatozoa. An electron microscopy analysis. **International Journal of Andrology**. Copenhagen. v. 23, n.3, p.178-186. June, 2000.

EMBRAPA-CNPSA **Encontro do conesul de técnicos especialistas em siscal. 2.**, Concórdia, 1999 **Anais...** 1999. 148 p. (Documentos, 61).

FUNASA FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE **Cianobactérias tóxicas na água para consumo humano na saúde pública e processos de remoção em água para consumo humano.** Brasília-DF: Ministério da Saúde, 2003. 56 p.

FUNASA. **Manual prático do análises de água.** 2. ed. Brasília-DF: Ministério da Saúde, 2006, 146 p.

FLOWERS, W. L. Anatomy and physiology of boar. In: MIDWEST BOAR STUD MANAGERS CONFERENCE, 3., 2008, St. Louis. **Proceedings...** St. Louis: National Pork Board, 2008. 9 p.

GADEA, J. Semen extenders used in the artificial insemination of swine. **Spanish Journal of Agricultural Research**. Madrid, v.1 n. 2, p. 17-27. Sept. 2003.

GARNER, D.L.; HAFEZ, E.S.E. Spermatozoa and seminal plasma. In: HAFEZ, E. S. E (Ed.). **Reproduction in farm animal.** 6<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Lea and Febiger, 1993. p. 165-187.

GEOBRASIL Recursos hídricos: componentes da série relatórios sobre o estado e perspectivas do meio ambiente no Brasil. Ministério de Meio Ambiente. Agência Nacional de Águas. Programas das Nações Unidas para meio ambiente, Brasília: MMA ; ANA janeiro, 2007. p. 1-264.

GIRARD, C. L. Reducing the impact of animal production on the water supply: increasing knowledge is the only solution. **Animal Frontiers**, Champaign, v. 2, n. 2, 2 p. Apr. 2012.

GOLDBERG, G. A. M. **Fatores de risco para contaminação bacteriana durante a coleta do ejaculado suíno e suas consequências sobre a qualidade das doses inseminante.** 2009. 44 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Faculdade

de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.  
Disponível em:  
<<http://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/16234/000698777.pdf?sequence=1>>  
Acesso em: 3 abr. 2012.

HANCOCK, J. L.. Semen and testis characteristics and sexual behaviour of boars.  
**Journal Agricultura Science**, London, v. 53, p. 313-326, Dec. 1959.

HELLER, L.; PÁDUA, V. L. **Abastecimento de água para consumo humano**. Belo Horizonte: UFMG, 2006. 859 p.

LEVIS, D. G. Anatomy and physiology of boar spermatozoa In: MIDWEST BOAR STUD MANAGERS CONFERENCE, 2008, St. Louis. **Proceedings...** St. Louis Missouri, 2008. 14 p.

McCLESKEY, R.B. Electrical conductivity of electrolytes found in natural waters from (5 to 90°C.). **Journal of Chemical & Engineering**. Colorado, v. 56, no. 2, p. 317-327. 2011.

MAES, D. et al. Diseases in swine transmitted by artificial insemination.  
**Theriogenology**, Los Altos, v. 70, n. 8, p. 1337-1345, Nov. 2008.

MAROTO et al. Bacterial contamination of boar semen affects the litter size. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 120, n. 1-4, p. 95-104. July. 2010.

MCALLISTER, T. A.; TOPP, E. Role of livestock in microbiological contamination of water: Commonly the blame, but not always the source. **Animal Frontiers**. Champaign, v. 2 n. 2 p. 17-27, Apr. 2012.

MEDINA, V. R. Y.; VALDÉS, S. P.; GÓMEZ, M. L. Agua para uso en laboratorio.  
**Boletín Científico Técnico INIMET**, La Habana, n.1 p. 3-10, 2010.

MENDES, et al. A importância da qualidade da água reagente no laboratório clínico  
**Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. Rio de Janeiro, v.47. n.3 p.217-223. jun. 2011.

OECD. **FAO Agricultural Outlook 2012**, [S.l.]: OECD publishing, 2012. 281 p.  
Disponível em: <[www.anpros.cl/documentos/INFORME\\_FAOOECD.pdf](http://www.anpros.cl/documentos/INFORME_FAOOECD.pdf)>. Acesso em: 11 mar. 2013.

PARRON, L. M.; MUNIZ, D. H.; PEREIRA, M.C. **Manual de procedimento de amostragem e análises físico-químico de água**. Colombo: Embrapa Floresta, ago. 2011. 69 p.

PATIENCE, J. F. The importance of water in pork production. **Animal Frontiers**. Champaign, v. 2, n. 2, p. 28-35, Apr. 2012.

SILVA, C.H. et al. Caracterização dos biofilmes formados em filtros de carvão ativado de sistemas de purificação de água em laboratórios clínicos. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, Rio de Janeiro, v. 38, n. 4, p. 243-253. 2006.

SILVA et al. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água**. 4. ed. São Paulo: Varela, 2010. cap. 6, p. 95-105.

SILVA, C.L.; BASSI, N.S.S. Análise dos impactos ambientais no Oeste Catarinense e das tecnologias desenvolvidas pela Embrapa Suínos e Aves. In: Encontro Nacional da ANPPAS, IV, Belém-Pará, Brasil. 2012. v.16, n.1 p. 128-143, set. 2012.

SONE, M. Investigations on the control of bacteria in boar semen. **Japanese Journal Animal of Reproduction**, Kannon-Dai, Tsukuba, v. 36, n. 5, p. 23-29, Dec. 1990.

SONE, M. et al. Prolonged storage of boar semen in liquid form. **Japanese Journal of Swine Science**. Atsugi-shi, Kanawa, v. 29, n.1 p. 41-50, Mar. 1992.

TAVARES, G.A. et al. Implantação de uma estação de produção de água deionizada para uso nos laboratórios do CENA/USP empregando resinas de troca-iônica **Revista Analytica**. Centro de Energia Nuclear na Agricultura. Universidade de São Paulo. Piracicaba, n.10, p.36-42, abri. maio.2004.

TONIOLLI, R. Aspectos de um programa de inseminação artificial em suínos. **Revista Ciência Animal**. Fortaleza, v.12, n.1, p.7-17. 2002.

TONIOLLI, R. Recentes avanços na tecnologia de sêmen e inseminação artificial em suínos **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. Belo Horizonte. v. 34, n. 2, p. 105-113. abri/jun. 2010.

UNEP 2008: Annual report. [S.l]: United Nations Environment Programme, 2009. 106 p. 2008 Disponível em:  
<[http://www.unep.org/PDF/AnnualReport/2008/AnnualReport2008\\_en\\_web.pdf](http://www.unep.org/PDF/AnnualReport/2008/AnnualReport2008_en_web.pdf)>.  
Acesso em: 20 maio 2012.

WILLIAMS, S. Assessment of the boar reproductive efficiency: physiology and implications. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. Belo Horizonte, v.33, p. 194-198, Dec. 2009. Suplemento 6.

WRIGHT, H. B.; CAIRNS, W. L. Desinfecção de água por médio de luz ultravioleta. In: SIMPOSIO OPS SOBRE CALIDAD DEL ÁGUA: DESINFECCIÓN EFECTIVA, 1998, Lima. **Anales...** Lima: OPS/CEPIS, 1998. 28 p.

## **ANEXOS**

## ANEXO I

O Anexo I apresenta lista de parâmetros com maior probabilidade de ocorrência em águas subterrâneas, seus respectivos Valores Máximos Permitidos (VMP) para cada um dos usos considerados como preponderantes e os limites de quantificação praticáveis (LQP), considerados como aceitáveis para aplicação desta Resolução.

Parâmetros	Nº CAS	Usos Preponderantes da Água				LQP Praticável - LQP
		Consumo Humano	Dessedentação de animais	Irrigação	Recreação	
<b>Inorgânicos</b>		<b>µg.L-1</b>				
Alumínio	7429-90-5	200 (1)	5.000	5.000	200	50
Antimônio	7440-36-0	5				5
Arsênio	7440-38-2	10	200		50	8
Bário	7440-39-3	700			1.000	20
Berílio	7440-41-7	4	100	100		4
Boro	7440-42-8	500 (2)	5.000	500 (4)	1.000	200
Cádmio	7440-43-9	5	50	10	5	5
Chumbo	7439-92-1	10	100	5.000	50	10
Cianeto	57-12-5	70			100	50
Cloreto	16887-00-6	250.000 (1)		100.000 - 700.000	400.000	2000
Cobalto	7440-48-4		1.000	50		10
Cobre	7440-50-8	2.000	500	200	1.000	50
Crômio (Cr III + Cr VI)	Cr III (16065831) Cr VI (18540299)	50	1.000	100	50	10
Ferro	7439-89-6	300 (1)		5.000	300	100
Fluoreto	7782-41-4	1.500	2.000	1.000		500
Lítio	7439-93-2			2.500		100
Manganês	7439-96-5	100 (1)	50	200	100	25
Mercurio	7439-97-6	1	10	2	1	1
Molibdênio	7439-98-7	70	150	10		10
Níquel	7440-02-0	20 (3)	1.000	200	100	10
Nitrato (expresso em N)	14797-55-8	10.000	90.000		10.000	300
Nitrito (expresso em N)	14797-65-0	1.000	10.000	1.000	1.000	20
Prata	7440-22-4	100			50	10
Selênio	7782-49-2	10	50	20	10	10
Sódio	7440-23-5	200.000 (1)			300.000	1000
Sólidos Totais Dissolvidos (STD)		1.000.000 (1)				2000
Sulfato		250.000 (1)	1.000.000		400.000	5.000
Urânio	7440-61-1	15 (2,3)	200	10 (4)		
100 (5)		50				
Vanádio	7440-62-2	50	100	100		20
Zinco	7440-66-6	5.000 (1)	24.000	2.000	5.000	100
<b>Orgânicos</b>		<b>µg.L-1</b>				
Acetilamida	79-06-1	0,5				0,15
Benzeno	71-43-2	5			10	2
Benzo antraceno	56-55-3	0,05				0,15

Benzo fluoranteno	205-99-2	0,05				0,15
Benzo(k)fluoranteno	207-08-9	0,05				0,15
Benzo pireno	50-32-8	0,05			0,01	0,15
Cloreto de vinila	75-01-4	5				2
Clorofórmio	67-66-3	200	100			5
Criseno	218-01-9	0,05				0,15
1,2-Diclorobenzeno	95-50-1	1.000 (1)				5
1,4-Diclorobenzeno	106-46-7	300 (1)				5
1,2-Dicloroetano	107-06-2	10	5		10	5
<b>Orgânicos</b>			<b>µg.L-1</b>			
1,1-Dicloroetano	75-35-4	30			0,3	5
1,2-Dicloroetano						
(cis + trans)	cis (156-59-2)					
trans (156-60-5)	50				5 para cada	
Dibenzo antraceno	53-70-3	0,05				0,15
Diclorometano	75-09-2	20	50			10
Estireno	100-42-5	20				5
Etilbenzeno	100-41-4	200 (1)				5
Fenóis (10)		3	2		2	10
Indeno(1,2,3)pireno	193-39-005	0,05				0,15
PCBs (somatória de 7) (9)	(9)	0,5			0,1	0,01 para cada
Tetracloroeto de carbono	56-23-5	2	5		3	2
Triclorobenzenos (1,2,4-TCB + 1,3,5-TCB + 1,2,3)	1,2,4-TCB(120-82-1); 1,3,5-TCB(108-70-3) 1,2,3-TCB(87-61-6)	20				5 para cada
Tetracloroetano	127-18-4	40			10	5
1,1,2-Tricloroetano	79-01-6	70	50		30	5
Tolueno	108-88-3	170 (*)	24			5
Xileno Total (o+m+p)	m (108-38-3); o (95-47-6); p (106-42-3)	300 (*)				5 para cada
<b>Agrotóxicos</b>			<b>µg.L-1</b>			
Alaclor	15972-60-8	20			3	0,1
Aldicarb + ald. sulfona + ald. sulfóxido	Aldicarb (116-06-3), ald. sulfona (1646-88-4) e ald. sulfóxido (1646-87-3)	10	11	54,9		3 para cada
Aldrin + Dieldrin	Aldrin (309-00-2) Dieldrin (60-57-1)	0,03			1	0,005 para cada
Atrazina	1912-24-9	2	5	10		0,5
Bentazona	25057-89-0	300			400	30
Carbofuran	1563-66-2	7	45		30	5
Clordano (cis + trans)	cis (5103-71-9) e trans (5103-74-2)	0,2			6	0,01 para cada
Clortalonil	1897-45-6	30	170	5,8		0,1
Clorpirifós	2921-88-2	30	24		2	2
2,4-D	94-75-7	30			100	2

DDT (p,p'- DDT + p,p'-DDE + p,p'-DDD)	p,p'-DDT (50-29-3) p,p'-DDE (72-55-9) p,p'-DDD (72-54-8)	2			3	0,01 para cada
Endosulfan (I + II + sulfato)	I (959-98-8)					
II (33213-65-9) sulfato (1031-07-8)	20			40	0,02 para cada	
Endrin	72-20-8	0,6			1	0,01
Glfosato + Ampa	1071-83-6	500	280	0,13 (6); 0,06 (7); 0,04 (8)	200	30
Heptacloro + heptacloro epóxido	Heptacloro (76-44-8);					
Heptacloro epóxido (1024-57-3)	0,03			3	0,01 para cada	
Hexaclorobenzeno	118-74-1	1	0,52			0,01
Lindano (gama-BHC)	58-89-9	2	4		10	0,01
<b>Agrotóxicos</b>			<b>µg.L-1</b>			
Malatton	121-75-5	190				2
Metolacloro	51218-45-2	10	50	28	800	0,1
Metoxicloro	72-43-5	20				0,1
Molnato	2212-67-1	6			1	5
Pendimetalina	40487-42-1	20			600	0,1
Pentaclorofenol	87-86-5	9			10	2
Permetrina	52645-53-1	20			300	10
Propanil	709-98-8	20			1.000	10
Simazina	122-34-9	2	10	0,5		1
Trifuralina	1582-09-8	20	45		500	0,1
<b>Microorganismos</b>						
E. coli	-	Ausentes em 100ml	200/100 ml		800/100mL	--
Enterococos	-	-	-	-	100/100mL	--
Coliformes termotolerantes	-	Ausentes em 100ml	200/100 ml		1000/100mL	--

**RESOLUÇÃO No 357, DE 17 DE MARÇO DE 2005**  
**Publicada no DOU nº 053, de 18/03/2005, págs. 58-63**

<b>TABELA III - CLASSE 3 - AGUAS DOCES</b>	
<b>PADROES</b>	
<b>PARÂMETROS</b>	<b>VALOR MÁXIMO</b>
Clorofila <i>a</i>	60 µg/L
Densidade de cianobactérias	100.000 cel/mL ou 10 mm <sup>3</sup> /L
Sólidos dissolvidos totais	500 mg/L
<b>PARÂMETROS INORGÂNICOS</b>	<b>VALOR MÁXIMO</b>
Alumínio dissolvido	0,2 mg/L Al
Arsênio total	0,033 mg/L As
Bário total	1,0 mg/L Ba
Berílio total	0,1 mg/L Be

Boro total	0,75 mg/L B
Cádmio total	0,01 mg/L Cd
Chumbo total	0,033 mg/L Pb
Cianeto livre	0,022 mg/L CN
Cloreto total	250 mg/L Cl
Cobalto total	0,2 mg/L Co
Cobre dissolvido	0,013 mg/L Cu
Cromo total	0,05 mg/L Cr
Ferro dissolvido	5,0 mg/L Fe
Fluoreto total	1,4 mg/L F
Fósforo total (ambiente lântico)	0,05 mg/L P
Fósforo total (ambiente intermediário, com tempo de residência entre 2 e 40 dias, e tributários diretos de ambiente lântico)	0,075 mg/L P
Fósforo total (ambiente lótico e tributários de ambientes intermediários)	0,15 mg/L P
Lítio total	2,5 mg/L Li
Manganês total	0,5 mg/L Mn
Mercúrio total	0,002 mg/L Hg
Níquel total	0,025 mg/L Ni
Nitrato	10,0 mg/L N
Nítrito	1,0 mg/L N
Nitrogênio amoniacal total	13,3 mg/L N, para $\text{pH} \leq 7,5$ 5,6 mg/L N, para $7,5 < \text{pH} \leq 8,0$ 2,2 mg/L N, para $8,0 < \text{pH} \leq 8,5$ 1,0 mg/L N, para $\text{pH} > 8,5$
Prata total	0,05 mg/L Ag
Selênio total	0,05 mg/L Se
Sulfato total	250 mg/L $\text{SO}_4$
Sulfeto (como $\text{H}_2\text{S}$ não dissociado)	0,3 mg/L S
Urânio total	0,02 mg/L U
Vanádio total	0,1 mg/L V
Zinco total	5 mg/L Zn
<b>PARÂMETROS ORGÂNICOS</b>	<b>VALOR MÁXIMO</b>
Aldrin + Dieldrin	0,03 $\mu\text{g/L}$
Atrazina	2 $\mu\text{g/L}$
Benzeno	0,005 mg/L
Benzo(a)pireno	0,7 $\mu\text{g/L}$

<b>PARÂMETROS ORGÂNICOS</b>	<b>VALOR MÁXIMO</b>
Carbaril	70,0 µg/L.
Clordano (cis + trans)	0,3 µ/L.
2,4 - D	30,0 µg/L.
DDT (p,p'-DDT+ p,p'-DDD)	1,0 µg/L.
Demeton (Demeton -O + Demeton -S)	14,0 µg/L.
1,2-Dicloroetano	0,01 mg/L.
1,1-Dicloroetano	30 µg/L.
Dodecacloro Pentaciclodecano	0,001 µg/L.
Endossulfan ( I + II + sulfato)	0,22 µg/L.
Endrin	0,2 µg/L.
Fenóis totais (Sustâncias que reagem com 4-aminoantipirina)	0,01 mg/L.
Glifosato	280 µg/L.
Gution	0,005 µg/L.
Heptacloro epóxido + Heptacloro	0,03 µg/L.
Lindano (Gama- HCH)	2,0 µg/L.
Malation	100,0 µg/L.
Metoxicloro	20,0 µg/L.
Paration	35,0 µg/L.
PCBs - Bifenilas policloradas	0,001 µg/L.
Pentaclorofenol	0,009 mg/L.
Substâncias tenso- ativas que reagem com o azul de metileno	0,5 mg/L.
2,4,5 -T	2,0 µg/L.
Tetracloroeto de carbono	0,003 mg/L.
Tetracloroetano	0,01 mg/L.
Toxafeno	0,21 µg/L.
2,4,5-TP	10,0 µg/L.
Tributilestanho	2,0 µg/L. TBT
Tricloroetano	0,03 mg/L.
2,4,6 - Triclorofenol	0,01 mg/L.

Fonte: CONAMA, 2005

