

Bacterial Contaminants and Antimicrobial Susceptibility Profile of Boar Semen in Southern Brazil Studs

Contaminantes bacterianos y perfil de susceptibilidad del semen porcino en centros de recogida em Brasil

Paulo E. Bennemann^{1*} Ph.D, Sergio A. Machado¹ Ph.D, Lilian K. Girardini¹ Ph.D, Karina Sonálio² M.Sc, Alexandre A. Tonin³ Ph.D

¹Universidade do Oeste de Santa Catarina (UNOESC), Mestrado em Sanidade e Produção Animal Aplicadas a Pequenas Propriedades, Brazil. ²Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Brazil. ³Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas - IFAM-CMZL Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Amazonas. *Correspondence paulo.bennemann@unoesc.edu.br

Received: April 2017; Accepted: October 2017.

ABSTRACT

Objective. To assess the microbiological profile in seven Boar Studs (BS) in Southern Brazil, as well as evaluate antimicrobial susceptibility response to most commonly found microorganisms in BS. **Materials and methods.** Bacteriologic analysis was carried out in samples from the water purification system, semen extender, raw and stored semen, lab benches, and other working surfaces. **Results.** Growth of a mixed bacterial population was observed in water samples from all but one BS. Approximately 85% of the BS had significant contamination on their working surfaces with at least one bacterial contaminant. A total of 86% of raw semen samples were contaminated with one or more different bacteria, while 100% of the boar studs provided contaminated samples. Bacterial susceptibility to antimicrobial agents varied from over 80% for gentamycin, neomycin and ceftiofur to 40% or less for penicillin and lincomycin. **Conclusions.** The identification of the critical points provides necessary support to devise better strategies to minimize contamination in BS. Also, assessing the level of antimicrobial drug resistance offers accurate information to formulate more efficient antibacterial protocols that closely observe the rational use of antibiotics.

Keywords: Boar semen; bacterial contamination; antimicrobial susceptibility (*Source: DeSC, CAB*).

RESUMEN

Objetivo. Evaluar el perfil microbiológico de siete centros de recogida de semen porcino (BS) en el sur de Brasil, así como evaluar la susceptibilidad antimicrobiana a la mayoría de los microorganismos encontrados en los BS. **Materiales y métodos.** El análisis bacteriológico se realizó en muestras del sistema de purificación de agua, diluyentes de semen, semen crudo y almacenado, bancos de laboratorio y otras superficies de trabajo. **Resultados.** El crecimiento de una población bacteriana mixta se observó en muestras de agua de todas las BS excepto una. Aproximadamente el 85% de la BS tenía contaminación significativa en sus superficies de trabajo con al menos un contaminante bacteriano. Un total de 86% de muestras de semen crudo fueron contaminadas con una o más bacterias diferentes, mientras que el 100% de BS proporcionaron muestras contaminadas. La susceptibilidad

bacteriana a agentes antimicrobianos varió en más del 80% para gentamicina, neomicina y ceftiofur a 40% o menos para penicilina y lincomicina. **Conclusiones.** La identificación de los puntos críticos proporciona el apoyo necesario para idear mejores estrategias para minimizar la contaminación en CRSP. Además, la evaluación del nivel de resistencia a los antimicrobianos ofrece información precisa para formular protocolos antibacterianos más eficientes que tengan en cuenta el uso racional de los antibióticos.

Palabras clave: Semen porcino; contaminación bacteriana; Susceptibilidad antimicrobiana (*Source: DeSC, CAB*).

INTRODUCTION

Artificial insemination (AI) has been widely used in swine production mostly because of rapid distribution of genes from genetically superior males (1). Approximately 66% of the commercial Brazilian herd is artificially inseminated (2); however, there is empirical evidence that this percentage could reach over 90%, demanding an annual production of 9.5 million high quality semen doses (SD).

Bacterial contamination of the ejaculate is one of the factors affecting sperm viability due to production of microbial metabolites (3,4), changes in pH, competition for substrate (3,4), and promotion of cell membrane injury (3). Ejaculate contamination is virtually impossible to avoid, nevertheless it can be significantly reduced if proper hygiene procedures take place throughout all the steps of semen processing. The quality of water, extender, and materials that enter in contact with the semen, in addition to quality of lab environment are factors that might hinder overall SD quality.

High concentration of bacteria in the SD contributes to low motility and increased rates of agglutination of sperm cells, in addition to a higher proportion of abnormal sperm cells (5). The negative impact of semen contamination exacerbates over time because it takes from 36 to 48 h of storage for the undesirable effects to become evident (4, 6). Flowers (7) demonstrated that the low quality of the SD was responsible for a 17 % decrease in the pregnancy rate, and a reduction of 1.2 piglets per litter.

Because it is virtually impossible to obtain bacteria-free semen samples, hygienic semen collection and proper processing techniques with stringent laboratory procedures are the first and primary lines of defense to successfully reduce contamination. In addition, antibiotics are added to semen extenders as a preventive measure to reduce bacterial contamination (4-6). However, antimicrobial resistance to the limited number of classes of antibiotics commonly used as preservative in commercial porcine

INTRODUCCIÓN

La inseminación artificial (IA) se ha utilizado ampliamente en la producción porcina, principalmente debido a la rápida distribución de genes de machos genéticamente superiores (1). Aproximadamente el 66% de la cabaña comercial brasileña es inseminada artificialmente (2); sin embargo, existe evidencia empírica de que este porcentaje podría llegar a más del 90%, demandando una producción anual de 9.5 millones de dosis de semen de alta calidad (DS).

La contaminación bacteriana del eyaculado es uno de los factores que afectan la viabilidad de los espermatozoides debido a la producción de metabolitos microbianos (3,4), los cambios en el pH, la competencia por el sustrato (3,4) y la promoción de lesiones en la membrana celular (3). La contaminación por eyaculación es prácticamente imposible de evitar, sin embargo, puede reducirse significativamente si se llevan a cabo los procedimientos de higiene adecuados en todas las etapas de procesamiento del semen. La calidad del agua, el diluyente y los materiales que entran en contacto con el semen, además de la calidad del entorno del laboratorio, son factores que pueden dificultar la calidad general de la DS.

La alta concentración de bacterias en la DS contribuye a la baja motilidad y al aumento de las tasas de aglutinación de espermatozoides, además de una mayor proporción de espermatozoides anormales (5). El impacto negativo de la contaminación del semen se agrava con el paso del tiempo, ya que se necesitan de 36 a 48 horas de almacenamiento para que los efectos indeseables sean evidentes (4, 6). Flowers (7) demostró que la baja calidad de la DS causó una disminución del 17 % en la tasa de embarazo y de una reducción de 1.2 lechones por camada.

Debido a que es virtualmente imposible obtener muestras de semen libres de bacterias, la recolección higiénica de semen y las técnicas de procesamiento adecuadas con estrictos procedimientos de laboratorio son las primeras y principales líneas de defensa para reducir exitosamente la contaminación. Además, se

semen extenders has been observed among isolates from boar semen (8). Furthermore antibiotic resistance of bacteria in extended boar semen is increasing worldwide (9); therefore, the identification of types and sources of contaminations may strength the bases for the use of boar semen free of antibiotics, a current trending research line.

Current data on quality control of SD are scarce and do not define a predetermined standard for a quality SD, especially regarding the microbiological status and susceptibility profile to antibiotics. Thus, the goals of this work were to determine a microbiological profile of seven AI boar studs (BS) in Southern Brazil as well as assess the microbial agent susceptibility response to the most commonly used antibiotics.

MATERIALS AND METHODS

Sample Collection. All experimental procedures described in this experiment were conducted under experimental license (Project number 014/2016) from the Institutional Animal Care and Use Committee (CEUA-UNOESC).

This study was carried out in seven AI studs with at least 60 mature boars (ranging from 60-100 boars). Semen was collected once a week from nine to 20-month-old boars. Six ejaculates from 8 boars from each BS were used in this study (n=336). Based on Goldberg et al (26) and Schulze et al (10), critical points for the control of the production flow were determined to define possible sources of semen contamination (10). Therefore, we collected samples from water (reverse osmosis system in all BS), semen extender, raw semen, SD stored at 15-18°C for up to 96 h, and swabs from working surfaces (water storage tank, extender container, lab benches, water line, and valves for the water purification system). The samples were collected in triplicates and processed in PCA (Plate Count Agar, HiMedia, India) and VRB (Violet Red Bile Lactose, HiMedia, India) culture media. Therefore, a swab was used for each sampled site, which was stored in tubes with sterile saline solution for further dilution and bacterial counting on plates. All samples were transported at 5°C in an isothermal container and processed within 12-18 hour after collection.

Colony-Forming Units. The samples were diluted up to 10^{-4} in a 0.85% (w/v) sterile saline solution and inoculated in duplicates in PCA medium (HiMedia Lab., India) by plate streaking in duplicate. Following distribution, the Petri dishes were incubated in aerobiosis at 37°C

añaden antibióticos a los diluyentes de semen como medida preventiva para reducir la contaminación bacteriana (4-6). Sin embargo, se ha observado resistencia antimicrobiana a la limitada cantidad de clases de antibióticos utilizados habitualmente como conservantes en los diluyentes de esperma porcino comercial entre los aislados del esperma porcino (8). Además, la resistencia de las bacterias a los antibióticos en el semen porcino extendido está aumentando en todo el mundo (9); por lo tanto, la identificación de tipos y fuentes de contaminación puede reforzar las bases para el uso de semen porcino libre de antibióticos, una línea de investigación de tendencia actual.

Los datos actuales sobre el control de calidad de la DS son escasos y no definen un estándar predeterminado para una DS de calidad, especialmente en relación con el estado microbiológico y el perfil de susceptibilidad a los antibióticos. Por lo tanto, los objetivos de este trabajo fueron determinar un perfil microbiológico de siete centros de recogida de sêmen porcino (BS) en el sur de Brasil, así como evaluar la respuesta de susceptibilidad del agente microbiano a los antibióticos más comúnmente utilizados.

MATERIALES Y METODOS

Recolección de muestras. Todos los procedimientos experimentales descritos en este experimento fueron realizados bajo licencia experimental (proyecto número 014/2016) del comité institucional de cuidado y uso de animales (ceua-unoesc).

Este estudio se llevó a cabo en siete BS con al menos 60 machos maduros (entre 60 y 100 machos). El semen se recogía una vez a la semana de sementales de nueve a veinte meses de edad. En este estudio se utilizaron seis eyaculados de 8 machos de cada BS (n=336). Sobre la base de Goldberg et al (26) y Schulze et al (10), se determinaron los puntos críticos para el control del flujo de producción con el fin de definir las posibles fuentes de contaminación del semen (10). Por lo tanto, recogimos muestras de agua (sistema de ósmosis inversa en todas las BS), diluyente de semen, semen crudo, es almacenado a 15-18°C hasta 96 h, e hisopos de superficies de trabajo (tanque de almacenamiento de agua, contenedor de diluyente, bancos de laboratorio, línea de agua y válvulas para el sistema de purificación de agua). Las muestras fueron recolectadas en triplicados y procesadas en medios de cultivo PCA (Plate Count Agar, Himedia, India) y VRB (Violet Red Bile Lactose, himedia, india). Por lo tanto, se utilizó un hisopo para cada sitio de muestreo, que se almacenó en tubos con solución salina estéril para

for up to 48 h. Next, the colonies in each plate were counted, according to OIE (1998). Plates containing between 30 and 300 colony forming units (CFU) were counted, and all others with >300 CFU were attributed a grade "+300 UFC". The number of CFU per mL (CFU mL⁻¹) for each sample was calculated by multiplying the average number of colonies counted in duplicates by the inverse of the higher dilution, considering a 100 µL inoculum per plate.

Consistent with methodology used by Gaczarzewicz (11), all colonies that grew in Petri dishes containing PCA medium were counted, while only typical total coliform colonies were considered for culture using VRB (1-2 mm in diameter, red with a pinkish precipitation halo).

Identification of Microorganisms and Susceptibility to Antibiotics. The most prevalent colonies in each BS were inoculated in Blood Agar Base supplemented with 5% sheep blood (Kasvi, Brazil), McConkey and Sabouraud Agar (HiMedia Lab., India). The plates were incubated at 36°C for 24 to 48 h. The microorganisms were identified according to Markey et al (12).

Following strain isolation and identification, the Kirby-Bauer disk diffusion method for antibiotic susceptibility according to the CLSI guideline M23 for Development of In Vitro Susceptibility Testing Criteria and Quality Control Parameters (13). This test was used to determine the susceptibility of microorganisms to gentamicin (10 µg), neomycin (30 µg), ceftiofur (30 µg), penicillin (10 IU), and lincomycin (2 µg). Bacteria was considered resistant to neomycin when the inhibition halo was equal or less than 12 mm. For the remainder antibiotics the inhibition halo was considered according to the CLSI guidelines (13,27).

During this work, all standard operating procedures in the boar stud, including semen collection and processing, were not disturbed.

Statistical Analysis. Total bacterial counts were log transformed to adjust for data dispersion and then submitted to an ANOVA test using proc GLM (SAS v. 9.1, SAS Institute, Inc, Cary, NC). The means were compared using Tukey-Kramer test for multiple comparisons. The most prevalent bacteria, as well as the correspondent percentages of each stud were analyzed using proc MEANS and proc FREQ (SAS v. 8.0, SAS Institute, Inc, Cary, NC) and presented as descriptive statistics. Differences were considered to be significant if $p < 0.05$.

una mayor dilución y recuento bacteriano en placas. Todas las muestras se transportaron a 5°C en un contenedor isotérmico y se procesaron entre 12 y 18 horas después de la recolección.

Unidades Formadoras de Colonias. Las muestras se diluyeron hasta 10⁻⁴ en una solución salina estéril al 0.85% (p/v) y se inocularon en duplicados en medio PCA (HiMedia Lab., India) por duplicado. Después de la distribución, las placas de Petri se incubaron aróbicamente a 37°C hasta 48 h. A continuación, se contaron las colonias de cada placa, según la OIE (1998). Se contaron las placas que contenían entre 30 y 300 unidades formadoras de colonias (UFC), y a todas las demás con > 300 UFC se les atribuyó un grado "+300 UFC". El número de UFC por mL (UFC mL⁻¹) para cada muestra se calculó multiplicando el número medio de colonias contadas en duplicados por el inverso de la dilución mayor, considerando un inóculo de 100 µL por placa.

De acuerdo con la metodología utilizada por Gaczarzewicz (11), se contaron todas las colonias que crecieron en placas de Petri que contenían medio de PCA, mientras que sólo se consideraron para el cultivo las colonias de coliformes totales típicas utilizando VRB (1-2 mm de diámetro, de color rojo con un halo de precipitación rosáceo).

Identificación de microorganismos y susceptibilidad a los antibióticos. Las colonias más prevalentes en cada BS fueron inoculadas en la Base de Agar Sangre complementada con 5% de sangre de oveja (Kasvi, Brasil), McConkey y Agar Sabouraud (HiMedia Lab., India). Las placas fueron incubadas a 36°C durante 24 a 48 h. Los microorganismos fueron identificados de acuerdo a Markey et al (12).

Se realizó el aislamiento e identificación de la cepa mediante el método de difusión de disco Kirby-Bauer para la susceptibilidad a antibióticos de acuerdo con la directriz CLSI M23 para el Desarrollo de Criterios de Prueba de Susceptibilidad In Vitro y Parámetros de Control de Calidad (13). Esta prueba se utilizó para determinar la susceptibilidad de los microorganismos a la gentamicina (10 µg), neomicina (30 µg), ceftiofur (30 µg), penicilina (10 IU) y lincomicina (2 µg). Las bacterias se consideraron resistentes a la neomicina cuando el halo de inhibición era igual o inferior a 12 mm. Para el resto de los antibióticos se consideró el halo de inhibición según las pautas de la CLSI (13,27).

Durante este trabajo, no se perturbaron los procedimientos operativos estándar en sementales, incluyendo la recolección y procesamiento de semen.

RESULTS

Total bacterial count for aerobic mesophiles in raw ejaculates averaged from 1×10^1 to 3×10^5 (ranging from 0– 10^5) CFU mL⁻¹. A total of 86 % of the semen samples (raw semen) tested positive for different genera of bacteria. There was bacterial growth in more than one of the samples collected from all boar studs (Table 1), so that five bacterial genera were common to 71.4 % of the studs (Table 2).

Table 1. Profile of the microbial agents found in each Boar Stud (BS).

Agent	BS 1 (%)	BS 2 (%)	BS 3 (%)	BS 4 (%)	BS 5 (%)	BS 6 (%)	BS 7 (%)
<i>S. hyicus</i>	5.5	15.9	40	-	15	42.9	20
<i>S. aureus</i>	16.7	15.9	3.4	8.8	-	-	-
<i>S. epidermidis</i>	-	-	20.0	34.7	-	-	20
<i>S. intermedius</i>	-	-	6.6	-	10	-	-
<i>Klebsiella</i> sp.	-	15.9	10	4.3	-	-	-
<i>A. faecalis</i>	27.8	7.7	3.4	4.3	5	-	-
<i>Acinetobacter</i> sp.	22.3	15.9	6.6	13.1	25	14.3	-
<i>E. coli</i>	11.1	15.9	-	8.8	20	14.3	-
<i>Serratia</i> sp.	-	7.7	-	4.3	-	-	-
<i>Pseudomonas</i> sp.	11.1	7.7	-	4.3	5	-	20
<i>Aeromonas</i> sp.	5.5	-	-	4.3	5	-	10
<i>Yersinia</i> sp.	-	-	-	4.3	15.0	-	10
<i>Enterococcus</i>	-	-	-	-	-	25.8	-
<i>Bacillus</i> sp.	-	-	-	-	-	-	20
Yeast	-	-	10.0	8.8	-	-	-

Water Samples. Only water samples from one boar stud purification system (BS 6) were bacteria-free (Table 2). We observed growth of only one bacterial genus in 16.6% (1/6) of the samples, whereas 83.3% (5/6) of the remaining samples harbored a mixed microbial population. The most prevalent bacterial agents isolated from the reverse osmosis system were *Alcaligenes faecalis* (42.8%-3/7), *S. aureus* (42.8%-3/7), *Acinetobacter* sp. (42.8%-3/7) and *Yersinia* sp. (42.8%-3/7). Additional microbial agents such as *Aeromonas* sp., *Klebsiella* sp., *Pseudomonas* sp., *Serratia* sp. and *Escherichia coli*, as well as few yeast strains were isolated from some studs (Table 2). Water samples presented a microbiota predominantly Gram-negative (66.6%; 6/9).

Análisis estadístico. Los recuentos bacterianos totales se transformaron en registros para ajustar la dispersión de los datos y luego se sometieron a una prueba ANOVA utilizando proc GLM (SAS v. 9.1, SAS Institute, Inc, Cary, NC). Las medias se compararon mediante la prueba de Tukey-Kramer para múltiples comparaciones. Las bacterias más prevalentes, así como los porcentajes correspondientes de cada semental fueron analizados usando proc MEANS y proc FREQ (SAS v. 8.0, SAS Institute, Inc, Cary, NC) y presentados como estadísticas descriptivas. Las diferencias se consideraron significativas si $p < 0.05$.

RESULTADOS

El conteo bacteriano total para mesófilos aeróbicos en eyaculados crudos promediado de 1×10^1 a 3×10^5 (rango de 0- 10^5) CFU mL⁻¹. Un total del 86% de las muestras de semen (semen bruto) dio positivo en diferentes géneros de bacterias. Hubo crecimiento bacteriano en más de una de las muestras recogidas de todos los machos sementales (Tabla 1), de modo que cinco géneros bacterianos resultaron comunes al 71.4% de los machos (Tabla 2).

Muestras de agua. Sólo las muestras de agua del sistema de purificación de uno BS (BS6) estaban libres de bacterias (Tabla 2). Observamos el crecimiento de sólo un género bacteriano en el 16.6% (1/6) de las muestras, mientras que el 83.3% (5/6) de las muestras restantes albergaba una población microbiana mixta. Los agentes bacterianos más prevalentes aislados del sistema de ósmosis inversa fueron *Alcaligenes faecalis* (42.8%-3/7), *S. aureus* (42.8%-3/7), *Acinetobacter* sp. (42.8%-3/7) y *Yersinia* sp. (42.8%-3/7). Se aislaron agentes microbianos adicionales como *Aeromonas* sp., *Klebsiella* sp., *Pseudomonas* sp., *Serratia* sp. y *Escherichia coli*, así como algunas cepas de levadura de algunos sementales (Tabla 2). Las muestras de agua presentaron una microbiota predominantemente Gram-negativa (66.6%; 6/9).

Hisopos de superficie. De las muestras recolectadas de los bancos de procesamiento de semen y de los equipos que entran en contacto directo con el semen, el 57.1% de los BS (5/7) presentaron dos o más contaminantes bacterianos. *Staphylococcus* sp. estaba presente en el 85.7% (6/7) de los BS (Tabla 2).

Muestras de semen. El crecimiento bacteriano de al menos dos microorganismos diferentes estuvo presente en todas las muestras de semen crudo y de semen extendido. Las cepas más prevalentes en el semen crudo fueron *Staphylococcus hyicus* (42.8%; 3/7), *Escherichia coli* (28.5%; 2/7) y *Alcaligenes faecalis* (28.5%; 2/7), mientras que las muestras de semen extendido presentaron

Table 2. Most prevalent microbial agents in boar studs (BS) according to source of contamination.

Location	BS 1	BS 2	BS 3	BS 4	BS 5	BS 6	BS 7
Water	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>A. faecalis</i>	<i>Aeromonas</i> sp.	<i>Aeromonas</i> sp.	NG	<i>Yersinia</i> sp.
	<i>A. faecalis</i>	<i>S. hyicus</i>	Yeast	<i>Klebsiella</i> sp.	<i>A. faecalis</i>		
	<i>Acinetobacter</i> sp.	<i>Serratia</i> sp.	<i>S. epidermidis</i>	Yeast	<i>Yersinia</i> sp.		
		<i>Klebsiella</i> sp.	<i>S. aureus</i>	<i>Yersinia</i> sp.			
		<i>E. coli</i>	<i>S. hyicus</i>	<i>Acinetobacter</i> sp.			
		<i>Acinetobacter</i> sp.		<i>S. epidermidis</i>			
	<i>Pseudomonas</i> sp.						
Surface Swab	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. hyicus</i>	<i>E. coli</i>	<i>Acinetobacter</i>	<i>S. hyicus</i>	<i>S. hyicus</i>
	<i>E. coli</i>	<i>A. faecalis</i>	Yeast	<i>S. epidermidis</i>			<i>S. epidermidis</i>
		<i>E. coli</i>					<i>Bacillus</i> sp.
Raw Semen	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Klebsiella</i> sp.	<i>S. aureus</i>	<i>S. hyicus</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Bacillus</i> sp.
	<i>S. hyicus</i>	<i>Klebsiella</i> sp.	<i>S. hyicus</i>	<i>A. faecalis</i>	<i>Yersinia</i> sp.	<i>S. hyicus</i>	<i>S. epidermidis</i>
	<i>A. faecalis</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>Acinetobacter</i>	<i>Acinetobacter</i>	<i>Aeromonas</i>
	<i>Acinetobacter</i> sp.		<i>Acinetobacter</i>	<i>Acinetobacter</i> sp.	<i>E. coli</i>		
			<i>Pseudomonas</i> sp.				
Extended Semen	<i>E. coli</i>	<i>Acinetobacter</i> sp.	<i>S. hyicus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. intermedius</i>	<i>E. coli</i>	<i>Pseudomonas</i> sp.
	<i>Acinetobacter</i> sp.	<i>S. hyicus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>Acinetobacter</i>	<i>Acinetobacter</i> sp.		<i>Bacillus</i> sp.
	<i>Aeromonas</i> sp.			<i>Serratia</i> sp.			
	<i>S. aureus</i>						

NG- there was no bacterial growth

Surface Swabs. Out of the samples collected from semen processing benches and equipment that come in direct contact with semen, 57.1% of the studs (5/7) presented two or more bacterial contaminants. *Staphylococcus* sp. was present in 85.7% (6/7) of the boar studs (Table 2).

Semen Samples. Bacterial growth of at least two different microorganisms was present in all raw semen and extended semen samples. The most prevalent strains in the raw semen were *Staphylococcus hyicus* (42.8%; 3/7), *Escherichia coli* (28.5%; 2/7), and *Alcaligenes faecalis* (28.5%; 2/7), whilst samples of extended semen presented contamination with *Staphylococcus* sp. (36.3%; 4/11), and *Escherichia coli* (18.8%; 2/11) with predominance of Gram-negative microbiota (Table 2).

Total Bacterial Count. The average number of CFU mL⁻¹ varied among boar studs. Mesophilic bacteria significantly ranged ($p < 0.05$) from 1.66 (BS 6) to 3.78 (BS 4) Log CFU mL⁻¹. The number of coliform bacteria (Table 3) varied from 1.76

contaminación con *Staphylococcus* sp. (36.3%; 4/11) y *Escherichia coli* (18.8%; 2/11) con predominio de microbiota Gram-negativa (Tabla 2).

Conteo bacteriano total. El número medio de UFC mL⁻¹ varió entre los BS. Las bacterias mesófilas variaron significativamente ($p < 0.05$) de 1.66 (BS 6) a 3.78 (BS 4) Log CFU mL⁻¹. El número de bacterias coliformes (Tabla 3) varió de 1.76 (BS 3) a 2.52 (BS 4) Log CFU mL⁻¹, sin embargo, no se identificaron diferencias significativas.

Se observó que había diferentes grados de contaminación entre los BS y la fuente de contaminación (Tabla 4). Esto se debe probablemente a los diferentes procedimientos de manejo e higiene adoptados en los diferentes machos sementales.

Pruebas de Susceptibilidad. Todas las bacterias aisladas de la BS se sometieron a pruebas de susceptibilidad a los agentes antimicrobianos. Hubo un aumento de la susceptibilidad antimicrobiana a la gentamicina (87.5%), neomicina (87.5%) y ceftiofur (81.2%) en contraste con la mayoría

Table 3. Average number of CFU mL⁻¹ found in boar studs.

Boar Stud	Log ₁₀ CFU mL ⁻¹	
	Mesophiles	Coliforms
1	3.76±0.55 ^a	2.52±1.49
2	3.34±1.28 ^{bc}	2.22±0.88
3	3.16±1.55 ^{bc}	1.76±1.00
4	3.83±1.34 ^a	2.11±0.62
5	2.82±1.06 ^{bc}	2.09±1.09
6	1.66±0.66 ^{bc}	2.18±0.48
7	2.02±1.01 ^{bc}	2.31±0.78

^{a,b,c} different superscripts in columns indicate statistical differences ($p < 0.05$; Tukey-Kramer). Data are presented as mean \pm SEM.

(BS 3) to 2.52 (BS 4) Log CFU mL⁻¹, however no significant differences were identified.

It was observed that there were different degrees of contamination among the boar studs and the source of contamination (Table 4). This is probably due to different management and hygiene procedures adopted in different boar studs.

Susceptibility Tests. All bacteria isolated from the BS were tested for susceptibility to antimicrobial agents. There was an increased antimicrobial susceptibility to gentamycin (87.5%), neomycin (87.5%), and ceftiofur (81.2%) in contrast to the majority of other antimicrobial agents tested. Bacterial isolates presented remarkably low sensibility to penicillin (25%) and lincomycin (12.5%). Therefore, all bacterial samples isolated from BS 3 and 7

de otros agentes antimicrobianos probados. Las cepas bacterianas presentaron una sensibilidad notablemente baja a la penicilina (25%) y a la lincomicina (12.5%). Por lo tanto, todas las muestras bacterianas aisladas de BS 3 y 7 fueron resistentes a la lincomicina, mientras que el porcentaje de resistencia microbiana a la penicilina fue de 60, 75, 75 y 100% para BS 3, 5, 6 y 7, respectivamente.

DISCUSIÓN

La contaminación bacteriana es un fenómeno frecuente durante la recogida y el tratamiento rutinarios del semen porcino (4,9,20). Asimismo, nuestros resultados indican que el 86% de las muestras de semen, semen crudo, recogido en diferentes BS, contenía uno o más microorganismos. Según Goldberg et al (26), la presencia de más de 10² UFC mL⁻¹ de mesófilos aeróbicos en el semen indica una muestra altamente contaminada, lo que podría afectar la calidad del semen. En nuestro estudio el promedio fue de 10³ CFU mL⁻¹, lo que sugiere un gran efecto potencial sobre la calidad del semen.

El agua utilizada en el procesamiento del semen fue la principal fuente de contaminación, ya que el 85.7% (6/7) de la BS tenía, al menos, uno o más microorganismos en las muestras de agua. La calidad del agua es crítica y su contaminación representa un factor de riesgo significativo, contribuyendo a la mala calidad del semen (7,14). Reicks (15) reportó que, entre 15 especies bacterianas aisladas del semen, el sistema de agua era la fuente primaria de los tres géneros más comunes, *Alcaligenes*, *Pseudomonas* y *Burkholderia*. Payne et al (16) observaron que la contaminación del sistema de destilación del agua con *Achromobacter xylosoxidans*, una bacteria similar a *Pseudomonas*, provocó endometritis y

Table 4. Average number of CFU mL⁻¹ for mesophiles and coliforms in different boar studs (BS) according to source of contamination.

Sample	Culture	Log ₁₀ CFU mL ⁻¹						
		BS 1	BS 2	BS 3	BS 4	BS 5	BS 6	BS 7
Water	Mesophiles	3.47	3.28	3.69	5.47	2.79	NG	3.04
	Coliforms	1.47	2.47	3.47	2.28	NG	NG	2.74
Surface	Mesophiles	3.47	3.89	2.97	3.73	2.63	1.00	2.41
	Coliforms	3.13	2.81	1.51	1.95	3.29	NG	1.57
Raw Semen	Mesophiles	4.61	2.30	2.53	3.47	3.39	1.86	1.53
	Coliforms	4.00	1.47	1.96	2.32	1.86	2.18	2.31
Extended Semen	Mesophiles	3.50	4.00	3.58	3.38	2.11	2.04	1.65
	Coliforms	1.47	1.47	1.15	1.76	1.00	NG	2.60

NG - there was no bacterial growth

were resistant to lincomycin, whereas percent microbial resistance to penicillin was 60, 75, 75, and 100% for BS 3, 5, 6, and 7, respectively.

DISCUSSION

Bacterial contamination is a common event during routine collection and processing of swine semen (4,9,20). Likewise, our results indicate that 86% of semen samples, raw semen, collected in different BS, contained one or more microorganism. According to Goldberg et al (26), the presence of more than 10^2 CFU mL⁻¹ of aerobic mesophiles in the semen indicates a highly contaminated sample, which might affect the semen quality. In our study the average was 10^3 CFU mL⁻¹; suggesting a great potential effect on semen quality.

The water used in the processing of semen was the major source of contamination, since 85.7% (6/7) of BS had, at least, one or more microorganisms in water samples. The quality of water is critical and its contamination represents a significant risk factor, contributing to poor semen quality (7,14). Reicks (15) reported that, among 15 bacterial species isolated from semen, the water system was the primary source of the three most common genera, *Alcaligenes*, *Pseudomonas*, and *Burkholderia*. Payne et al (16) observed that the contamination of the water distillation system with *Achromobacter xylosoxidans*, a *Pseudomonas*-like bacterium led to endometritis and subsequent reproductive failure in sows and gilts. In this sense, Flowers (7) performed a study, reporting that there was a decrease of 8% in sow pregnancy rate, as well as a reduction in 0.7 piglets born per litter, by using water with low quality. In our study, the BS that showed bacterial contamination of water, 66.6% (4/6) had one or more genus of the *Enterobacteriaceae* family. Therefore, the contamination may have occurred due to hygiene failures in the processes of purification, storage or handling of water. Studies have shown that nearly all large water purification systems can cause the formation of biofilm in the tubing. This biofilm can spread microorganisms within the system and contribute to an increase in particles and bacteria (23). Bresciani et al (24) also identified *Enterobacteriaceae* as the major boar semen contaminant. It is well documented that the presence of contaminants induces sperm agglutination (6) and reduces the viability and fertility of the semen (4).

Analyzing bacterial growth on surfaces (countertops, barrels, pipes), we observe that two BS (28.6%) had enterobacterial contamination. In virtually all BS *Staphylococcus sp.*, was the predominant microflora. The presence of *S. aureus* might lead to a decrease in the number of spermatozoa,

el consiguiente fracaso reproductivo en cerdas y cerdas jóvenes. En este sentido, Flowers (7) realizó un estudio, informando donde hubo una disminución del 8% en la tasa de gestación de las cerdas, así como una reducción de 0.7 lechones nacidos por camada, mediante el uso de agua de baja calidad. En nuestro estudio, la BS que mostró contaminación bacteriana del agua, 66.6% (4/6) tenía uno o más géneros de la familia *Enterobacteriaceae*. Por lo tanto, la contaminación puede haber ocurrido debido a fallas de higiene en los procesos de purificación, almacenamiento o manejo del agua. Los estudios han demostrado que casi todos los sistemas grandes de purificación de agua pueden causar la formación de biopelícula en la tubería. Esta biopelícula puede propagar microorganismos dentro del sistema y contribuir a un aumento de partículas y bacterias (23). Bresciani et al (24) también identificaron *Enterobacteriaceae* como el principal contaminante del semen porcino. Está bien documentado que la presencia de contaminantes induce la aglutinación de los espermatozoides (6) y reduce la viabilidad y fertilidad del semen (4).

Analizando el crecimiento bacteriano en superficies (encimeras, barriles, tuberías), observamos que dos BS (28.6%) presentaban contaminación enterobacteriana. En prácticamente todos los BS *Staphylococcus sp.*, fue la microflora predominante. La presencia de *S. aureus* puede llevar a una disminución en el número de espermatozoides, supresión de la motilidad, cambios en la morfología y capacidad fertilizante. Un número considerable de microorganismos patógenos y de descomposición pueden participar tanto en los procesos de adhesión como en los de formación de biopelículas (19). Las superficies de acero inoxidable, vidrio, caucho y polipropileno pueden estar contaminadas por el deterioro o por microorganismos patógenos que, bajo ciertas condiciones, se depositan, se adhieren e interactúan con la superficie, iniciando crecimiento celular y, por consiguiente, la formación de biopelículas (19,20). Teniendo en cuenta que la temperatura de las salas de procesamiento de semen en BS está controlada, la alta prevalencia de *Staphylococcus sp.*, era biológicamente esperada, ya que es un agente mesofílico, y podría haber sido uno de los factores que han influido en la alta prevalencia en estas superficies. Corroborando esta hipótesis, en el cultivo de células en caldo de soja triptico a temperaturas inferiores a las óptimas (20, 25 y 30°C), Rode et al (21) encontraron la mayor capacidad de fijación de *S. aureus* en poliestireno. De Souza et al (22) observaron que las cepas de *S. aureus* se adhirieron en grandes cantidades independientemente del tipo de superficie evaluada y de la temperatura de incubación (7 o 28°C). Por lo tanto, nuestros resultados sugieren la necesidad de mejores procesos de inactivación o eliminación de agentes contaminantes en las superficies de

suppression of motility, changes in morphology, and fertilizing capacity. A considerable number of both spoilage and pathogenic microorganisms are able to participate in both adhesion and biofilm formation processes (19). Stainless steel, glass, rubber, and polypropylene surfaces can be contaminated either by spoilage or pathogenic microorganisms that, under certain conditions are deposited, adhered to, and interact with the surface, initiating cellular growth, and consequently leading to biofilm formation (19,20). Considering that the temperature of semen processing rooms in BS is controlled, the high prevalence of *Staphylococcus* sp., was biologically expected, since it is mesophilic agent, and might it has been one of the factors influencing the high prevalence on these surfaces. Corroborating to this hypothesis, in cultivating cells in tryptic soy broth at sub-optimal temperatures (20, 25 and 30°C), Rode et al (21) found the highest attachment capacity with *S. aureus* on polystyrene. De Souza et al (22) observed that *S. aureus* strains adhered in high numbers regardless the type of assayed surface and incubation temperature (7°C or 28°C). Therefore, our results suggest the need for better processes of inactivation or removal of contaminant agents in BS surfaces. Regarding biofilm organisms, the sanitization solution must penetrate the matrix of exopolymers and gain access to the microbial cells causing biofilm inactivation and removal (22).

The collection of a bacteria-free ejaculate is a significant challenge, since the microorganisms are inherent of the environment in which the ejaculate is collected, being present in dust particles in suspension, as well as on the normal microflora of the animal itself (5), representing a mixed microbiota. In this sense, our results pointed out that 57.14% of BS had ejaculated containing bacteria of the Enterobacteriaceae family. It is corroborated by a study of Úbeda et al (23), which also report the enterobacteria as the main ejaculate contaminants. These authors also observed that agents related to this family contaminated 40.68% of semen samples assessed, and these are related to reduced motility and increased sperm pathologies. Moreover, these microorganisms might be involved in inflammatory processes of the endometrium of inseminated sows (5,24). While sperm motility, sperm morphology, and concentration of the SD produced are the parameters commonly used to assess semen quality, the microbiological evaluation is not a routine practice in boar semen evaluation, and may indicate other potential indicators of poor semen quality. Thus, considering poor semen quality as one of the primary causes of female reproductive failure in animals, including swine, the microbiological evaluation should be applied, especially because it consists of an easy and low-cost technique.

BS. En el caso de los organismos de biopelícula, la solución desinfectante debe penetrar en la matriz de exopolímeros y acceder a las células microbianas causantes de la inactivación y remoción de la biopelícula (22).

La recolección de un eyaculado libre de bacterias es un reto importante, ya que los microorganismos son inherentes al ambiente en el que se recoge el eyaculado, estando presentes en partículas de polvo en suspensión, así como en la microflora normal del propio animal (5), representando una microbiota mixta. En este sentido, nuestros resultados señalaron que el 57.14% de las BS habían eyaculado conteniendo bacterias de la familia *Enterobacteriaceae*. Esto fue corroborado por un estudio de Úbeda et al (23), en el que también se informa de que las enterobacterias son los principales contaminantes de la eyaculación. Estos autores también observaron que los agentes relacionados con esta familia contaminaron el 40,68% de las muestras de semen evaluadas, y éstos están relacionados con la reducción de la motilidad y el aumento de las patologías espermáticas. Además, estos microorganismos pueden estar implicados en procesos inflamatorios del endometrio de las cerdas inseminadas (5,24). Aunque la motilidad de los espermatozoides, su morfología y la concentración de la DS producida son los parámetros comúnmente utilizados para evaluar la calidad del semen, la evaluación microbiológica no es una práctica rutinaria en la evaluación del semen porcino, y puede indicar otros posibles indicadores de mala calidad. Por lo tanto, considerando la mala calidad del semen como una de las causas principales del fracaso reproductivo de las hembras en animales, incluidos los porcinos, debe aplicarse la evaluación microbiológica, especialmente porque se trata de una técnica fácil y de bajo costo.

Considerando la contaminación bacteriana encontrada en el agua y en el semen crudo, como se esperaba, el análisis de los resultados demuestra que la mayor contaminación mesofílica, en la DS diluida, se encontró en el BS que también tenía contaminación en el suministro de agua purificada y en el semen crudo. La recolección higiénica de semen y las técnicas de procesamiento adecuadas con procedimientos de laboratorio rigurosos son las primeras y principales líneas de defensa para reducir con éxito la contaminación (18). Se añadieron antibióticos a los diluyentes de semen como medida preventiva para reducir la contaminación bacteriana (5,6). Se ha observado cierto nivel de resistencia a los medicamentos entre los aislados del semen de porcino frente a los antibióticos comúnmente utilizados como conservantes antimicrobianos en los diluyentes

Considering the bacterial contamination found in water and raw semen, as expected, the analysis of results demonstrates that the highest contamination of mesophilic, in diluted SD, were found in BS who also had contamination in purified water supply and raw semen. Hygienic semen collection and proper processing techniques with stringent laboratory procedures are the first and primary lines of defense to successfully reduce contamination (18). Antibiotics were added to semen extenders as a preventive measure to reduce bacterial contamination (5,6). Some level of drug resistance has been observed among isolates from boar semen against antibiotics commonly used as preservative antimicrobials in commercial porcine semen extenders (3,8). Our results on evaluation of susceptibility to antimicrobial agents has shown a good efficacy (*in vitro*) of aminoglycosides (neomycin and gentamicin) on the main contaminants found in BS. It represents an important issue, since these antibiotics are the most commonly added to extenders of boar semen. However, susceptibility testes should be carried out more often, since our results differ significantly from other authors; in Italy, Bresciani et al (18) observed gentamicin resistance on isolate of *E. coli* (50%), *Serratia marcescens* (50%), *Proteus sp.* (50%), *Streptococcus sp.* (50%) and *Staphylococcus aureus* (100%).

On the other hand, our results showed an important resistance to penicillin (>75%) and lincomycin (>87.5%). It has been shown that when utilizing β -lactams in a mixed bacterial population of susceptible and resistant cells, resistant cells quickly (in as little as 2.5 h) degrade the β -lactam, eliminating whatever selection pressure the antimicrobial provided (25). Considering that mixed isolation was the major finding observed, we believe this mechanism of degradation might contributed to the high level of penicillin resistance observed in our results. Although the penicillin is an antibiotic recommended only for Gram positive bacteria, it was used because it is a constituent of most of commercial semen extenders, Since the origin of the contamination cannot be predicted. Lincomycin is an antibiotic with spectrum activity on Gram positive bacteria; thus, based on our bacterial isolation, the high degree of resistance was expected, since most of bacterial genera isolated corresponded to Gram negative.

Based on the results obtained, we concluded that 86% of semen samples, raw semen, collected in different BS, contained one or more genera of bacteria. Water was the major source of contamination. Additionally, our results on evaluation of susceptibility to antimicrobial agents has shown a good efficacy (*in vitro*) of aminoglycosides (neomycin and gentamicin) on

de semen porcino comercial (3,8). Nuestros resultados en la evaluación de la susceptibilidad a los agentes antimicrobianos han mostrado una buena eficacia (*in vitro*) de los aminoglucósidos (neomicina y gentamicina) sobre los principales contaminantes encontrados en la BS. Esto representa un problema importante, ya que estos antibióticos son los que se añaden con más frecuencia a los diluyentes del semen. Sin embargo, las pruebas de susceptibilidad deberían realizarse con mayor frecuencia, ya que nuestros resultados difieren significativamente de los de otros autores; en Italia, Bresciani et al (18) observaron resistencia a la gentamicina en el aislado de *E. coli* (50%), *Serratia marcescens* (50%), *Proteus sp.* (50%), *Streptococcus sp.* (50%) y *Staphylococcus aureus* (100%).

Por otro lado, nuestros resultados mostraron una importante resistencia a la penicilina (>75%) y a la lincomicina (>87.5%). Se ha demostrado que al utilizar β -lactams en una población bacteriana mixta de células susceptibles y resistentes, las células resistentes degradan rápidamente (en tan sólo 2,5 h) el β -lactam, eliminando cualquier presión de selección que proporcione el antimicrobiano (25). Considerando que el aislamiento mixto fue el mayor hallazgo observado, creemos que este mecanismo de degradación podría contribuir al alto nivel de resistencia a la penicilina observado en nuestros resultados. Aunque la penicilina es un antibiótico recomendado sólo para las bacterias Gram positivas, se utilizó porque es un componente de la mayoría de los diluyentes de semen comerciales, ya que el origen de la contaminación no puede predecirse. La lincomicina es un antibiótico con actividad espectral en bacterias Gram positivas; por lo tanto, en base a nuestro aislamiento bacteriano, se esperaba un alto grado de resistencia, ya que la mayoría de los géneros bacterianos aislados eran Gram negativos.

Con base en los resultados obtenidos, concluimos que el 86% de las muestras de semen, semen crudo, recogido en diferentes BS, contenía uno o más géneros de bacterias. El agua fue la principal fuente de contaminación. Además, nuestros resultados en la evaluación de la susceptibilidad a los agentes antimicrobianos han mostrado una buena eficacia (*in vitro*) de los aminoglucósidos (neomicina y gentamicina) sobre los principales contaminantes encontrados en la BS. Por otro lado, hubo una importante resistencia a la penicilina (>75%) y a la lincomicina (>87.5%). Por lo tanto, la comprensión de la dinámica bacteriana en los procesos de contaminación, así como la identificación de los principales géneros de contaminantes bacterianos, y su fuente y perfil de susceptibilidad a los antimicrobianos, es

the main contaminants found in BS. On the other hand, there was an important resistance to penicillin (>75%) and lincomycin (>87.5%). Therefore, the understanding of bacterial dynamics on contamination processes, as well as identification of major bacterial contaminants genera, and their source and profile of antimicrobial susceptibility is mandatory for a proper quality control and reduced risk of contamination of semen doses in boar studs.

Conflict of interest

None of the authors have any conflict of interest to declare.

obligatoria para un control de calidad adecuado y para reducir el riesgo de contaminación de las dosis de semen en los BS.

Conflicto de intereses

Ninguno de los autores tiene ningún conflicto de intereses que declarar.

REFERENCES

1. Bortolozzo FP, Menegat MB, Mellagi APG, Bernardi ML, Wentz I. New artificial insemination technologies for swine. *Reprod Dom Anim.* 2015; 50(Suppl. 2):80-84.
2. Riesenbeck A. Review on international trade with boar semen. *Rep Domestic Anim.* 2011; 46(Suppl. 2):1-3.
3. Morrell JM. Antimicrobials in boar semen extenders – A risk / Benefits analysis. *J Antimicrob.* 2016; 2(1):107-108.
4. Althouse GC. Sanitary Procedures for the Production of Extended Semen. *Reprod Dom Anim.* 2008; 43:374-378.
5. Althouse GC, Pierdon MS, Lu KG. Thermotemporal dynamics of contaminant bacteria and antimicrobials in extended porcine semen. *Theriogenol.* 2008; 70:1317-1323.
6. Bussalleu E, Yeste M, Sepúlveda L, Torner E, Pinart E, et al. Effects of different concentrations of enterotoxigenic and verotoxigenic *E. coli* on boar sperm quality. *Anim Reprod Sci.* 2011; 127:176-182.
7. Schultze M, Ammon C, Rudiger K, Jung M, Grobbel M. Analysis of hygienic critical points in boar semen production. *Theriogenology.* 2015; 83:430-437.
8. Schulze M, Grobbel M, Muller KM, Junkes C, Dathe M, Rudiger KR, Jung M. Challenges and limits using antimicrobial peptides in boar semen preservation. *Reprod Dom Anim.* 2015; 50(Suppl 2):5-10.
9. Grossfeld R, Peralta W, Weitze K, Waberski D. Antibiotic-free hypothermic storage of boar semen in Androstar +5 extender results in similar fertility results compared to semen stored at 17°C in extender with antibiotic content. *Anim Reprod Sci.* 2016; 169:125.
10. Schulze M, Ammon C, Rüdiger K, Kung M, Grobbel M. Analysis of hygienic critical control points in boar semen production. *Theriogenol.* 2015; 83(3):430-437.
11. Gaczarzewicz D, Udala J, Piasecka M, Blaszczyk B, Stankiewicz T. Bacterial contamination of boar semen and its relationship to sperm quality preserved in commercial extender containing gentamicin sulfate. *Polish J Vet Sci.* 2016; 19(3):451-459.
12. Markey B, Leonard F, Archambault M, Cullinane A, Maguire D. *Clinical Veterinary Microbiology*, 2 ed. Mosby: USA; 2013.
13. CLSI. Development of In Vitro Susceptibility Testing Criteria and Quality Control Parameters. 5th Ed. CLSI guideline 23. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2018.
14. Althouse GC. Sanitary procedures for the production of extended semen. *Reprod Dom Anim.* 2008; 43:374-378.
15. Rodriguez AL, Soom AV, Arsenakis I, Maes D. Boar management and semen handling factors affect the quality of boar extended semen. *Porcine Health Management.* 2017; 3:15.

16. Payne BJ, Clark S, Maddox C, Ness A. *Achromobacter xylosoxidans* in extended semen causes reproductive failure in artificially inseminated sows and gilts. *J Swine Health Prod.* 2008; 16(6):316-322.
17. Gary E Ritchie. Water for Pharmaceutical Purposes USP 24/NF. *Pharmacopeia.* 2000; 30(5):1744. URL available in: http://www.pharmacopeia.cn/v29240/usp29nf24s0_c1231.html
18. Bresciani C, Cabassi CS, Morini G, Taddei S, Bigliardi E, Di Lanni F, Sabboni A, Parmigiani E. Boar semen bacterial contamination in Italy and antibiotic efficacy in a modified extender. *Ital J Anim Sci.* 2014; 13:3082.
19. Tremblay YDN, Hathroubi S, Jacques M. Les biofilms bactériens: leur importance en santé animale et en santé publique. *Canadian J Vet Res.* 2014; 78(2):110-116.
20. Fuster-Valls N, Hernández-Herrero M, Marín-de-Mateo M, Rodríguez-Jerez JJ. Effect of different environmental conditions on the bacteria survival on stainless steel surfaces. *Food Cont.* 2008; 19:308-314.
21. Rode TM, Langsrud S, Holck A, Moretro T. Different patterns of biofilm formation in *Staphylococcus aureus* under food-related stress conditions. *Int J Food Microbiol.* 2007; 116:372-383.
22. De Souza EL, Meira QG, Barbosa IM, Athayde AJAA, Conceição ML, Siqueira-Junior JP. Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* from food contact surfaces in a meat-based broth and sensitivity to sanitizers. *Braz J Microbiol.* 2014; 45(1):67-75.
23. Úbeda JL, Ausejo R, Dahmani Y, Falceto MV, Usan A, Malo C, Perez-Martinez FC. Adverse effects of members of the *Enterobacteriaceae* family on boar sperm quality. *Theriogenol.* 2013; 80:565-570.
24. Mazurova J, Kukla R, Rozkot M, Lustykova A, Slehova E, Sleha R, Lipensky J, Opletal L. Use of natural substances for boar semen decontamination. *Vet Med.* 2015; 60:235-247.
25. Korpimäki T, Kurittu J, Karp M. Surprisingly fast disappearance of β -lactam selection pressure in cultivation as detected with novel biosensing approaches. *J Microbiol Met.* 2003; 53(1):37-42.
26. Goldberg AMG, Argenti LE, Faccin JE, Linck L, Santi M, Bernardi ML, Cardoso, MRI; Wentz, I; Bortolozzo, FP. Risk factors for bacterial contamination during boar semen collection. *Res Vet Sci.* 2013; 95:362-367.
27. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), Performance Standard for Antimicrobial Susceptibility Testing; TwentyFourty Informational Supplement. CLSI document M100-S24. Wayne: PA, USA; 2014.