

Tratamento de rações de aves com ácidos orgânicos: estudo da atividade bactericida e avaliação de técnicas de recuperação de *Salmonella spp*

Treatment of feeds of chickens with organic acids:
study of bactericidal efficacy and evaluation of recovery
techniques for *Salmonella spp*

CORRESPONDÊNCIA PARA:
Ricardo de Albuquerque
Departamento de Nutrição e
Produção Animal
Faculdade de Medicina Veterinária
e Zootecnia da USP
Caixa Postal 23 – Campus de
Pirassununga
Av. Duque de Caxias Norte, 225
13630-970 – Pirassununga – SP
e-mail: ricalbuq@usp.br

1 - Departamento de Nutrição e
Produção Animal da Faculdade de
Medicina Veterinária e Zootecnia da
USP, Pirassununga – SP
2 - Spave – Consultoria em
Produção e Saúde Animal Ltda.

Ricardo de ALBUQUERQUE¹; Nair Massako Katayama ITO²; Claudio Issamu MIYAJI²

RESUMO

Este trabalho foi delineado com os objetivos de avaliar a recuperação de salmonelas em ração experimentalmente contaminada e comparar a eficiência das atividades bactericida e residual de ácidos em rações. A recuperação bacteriana foi altamente eficiente para todos os métodos usados e inicialmente não se obteve sucesso na diminuição de salmonelas presentes na ração, ao se usar Bio Add^R e Myco Curb^R. Ao se usar um veículo aquoso obteve-se que o Myco Curb^R não conseguiu eliminar as salmonelas, enquanto Bio Add^R e Salmex^R foram eficientes, e, na mistura seca, nenhum dos 3 ácidos eliminou as salmonelas da ração. No estudo da avaliação da atividade bactericida e residual de ácidos, observou-se eficácia apenas do Salmex^R, enquanto Sal Curb^R não demonstrou possuir estas atividades.

UNITERMOS: Salmonela; Ácidos orgânicos; Ração; Aves.

INTRODUÇÃO

O tratamento químico das rações contribui para a redução da incidência de salmonelas nas criações de aves, e a adição de ácidos orgânicos às rações, principalmente, os ácidos graxos de cadeia curta, tem reduzido as infecções por salmonelas em frangos⁹. A efetividade deste tratamento é variável e depende do nível inicial da contaminação¹¹. Esta efetividade, também, é demonstrada na redução da transmissão horizontal de *S. Gallinarum* em aves recebendo ração tratada com mistura de ácidos fórmico e propiônico².

Contudo, há dúvidas sobre a eficácia do tratamento das rações com ácidos orgânicos, uma vez que estes têm pouca atividade em rações secas, exercendo suas atividades somente após sua ingestão e hidratação⁵. Mesmo assim, a bibliografia tem demonstrado efeitos positivos dos tratamentos com níveis entre 0,2 e 2,0% de aditivos químicos^{8,10,12,15}. Por outro lado, tem-se demonstrado que este efeito é dependente, além da dosagem dos produtos, do nível inicial da contaminação¹¹ e do pH do meio^{6,7,13}.

Assim sendo, o objetivo deste trabalho foi o de avaliar a taxa de recuperação de salmonelas em ração experimentalmente contaminada e tratada com produtos comerciais contendo ácidos orgânicos e comparar a eficiência da atividade bactericida de ácidos orgânicos em rações de aves.

MATERIAL E MÉTODO

Para os quatro experimentos foi utilizada a água peptonada tamponada (APT), na proporção de 25 gramas para 225 ml de APT. O enriquecimento foi feito em 10 ml dos seguintes caldos seletivos: Selenito-Cistina (SC), Tetrionato Hajna (TH) e Rappaport-Vassiliadis (RV). Os 2 primeiros foram semeados com 1,0 ml, enquanto o caldo RV foi semeado com 0,1 ml. Os meios TH e SC foram incubados a 37°C por 24 horas, e os meios RV e TH (outro tubo) incubados a 42°C, sendo o meio de RV incubado por 48 horas. Cada material cultivado em APT foi semeado em 4 tubos de caldo seletivo. Foi utilizado o procedimento de enriquecimento retardado para o caldo RV, após manutenção a 42°C por 48 horas e posterior semeadura. Foi deixado à temperatura ambiente por 72 horas e depois submetido a novo repique. Os meios sólidos utilizados foram: Ágar Verde Brilhante (AVB) e Xilose Lisina Desoxicolato (XLD).

EXPERIMENTO 1: Avaliação de técnicas de recuperação de salmonelas em ração experimentalmente contaminada.

Foram utilizadas cepas de *S. Enteritidis*, *S. Pullorum*, *S. Gallinarum*, *S. Agona* e *S. Tiphymurium*, mantidas no laboratório. Estas foram cultivadas em placas de Petri contendo AVB, após 24 horas a 37°C foi efetuada a colheita de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) em 1,0 ml de solução salina (0,85%). A suspensão concentrada de bactérias foi padronizada em comparação com a observada na escala McFarland³.

A seguir, uma ração comercial farelada destinada à alimentação de aves reprodutoras, e sem matéria-prima de origem animal, foi dividida em pacotes de 1,0 kg. Foram preparadas 11 amostras autoclavadas (90°C por uma hora) e uma não-autoclavada; Usaram-se 10 amostras para efetuar a contaminação experimental (2 para cada sorovar de salmonela anteriormente descrita), sendo metade mantida como controle do processo de esterilização. A amostra não-esterilizada foi mantida como controle da ração.

Para contaminação das rações foi utilizado 1,0 ml da suspensão bacteriana, suficiente para obtenção de uma concentração estimada de 10 e 10² UFC por grama de ração. As suspensões de bactérias foram aspergidas sobre uma alíquota de aproximadamente 200 gramas de ração, para efetuar uma pré-mistura bacteriana em saco plástico, e posterior mistura com o restante da ração, conforme descrito por Hinton; Linton⁸. Na tentativa de reisolamento de salmonela, um dia após a contaminação experimental, as diferentes alíquotas de ração contaminada, assim como os controles, foram submetidas às técnicas previamente descritas.

EXPERIMENTO 2: Atividade bactericida de produtos comerciais contendo ácidos orgânicos em rações experimentalmente contaminadas com salmonelas.

Amostras de 250 g de ração previamente autoclavada e destinada a aves reprodutoras, contidas em sacos plásticos estéreis foram contaminadas com diferentes concentrações bacterianas e depois tratadas com os produtos comerciais. Foram usados: Bio Add^R (3 e 6 litros por tonelada) para as rações contaminadas com *S. gallinarum* e *S. enteritidis*, enquanto Myco Curb^R (0,5 e 1 litro por tonelada) para a ração contaminada com *S. enteritidis*. Os níveis de contaminação das rações foram 10 e 10² UFC por grama de ração, e para ambos os níveis foram utilizados controles não-tratados.

Para a recuperação bacteriana, amostras de ração contaminada (10 gramas) foram colocadas em frascos contendo 90 ml de APT e incubadas por 24 horas a 37°C, diluídas em solução salina estéril (0,85%), a 10⁻² 10⁻³... 10⁻⁷. Para cada diluição foi semeado assepticamente 0,1 ml em ágar XLD, com auxílio de um bastão de vidro estéril. Após dispersão da suspensão por toda a superfície, a placa foi mantida entreaberta por 10 minutos em câmara asséptica para secar, e então incubada em estufa por 24 horas a 37°C. Após

este período, foi processada a leitura e dados os escores, conforme os critérios descritos na Tab. 1.

EXPERIMENTO 3: Atividade bactericida (Mistura Úmida) e plaqueamento direto.

Amostras de 20 g de ração autoclavada foram contaminadas com *S. enteritidis* (10² UFC/grama), e efetuada uma suspensão em 80 ml de água destilada estéril, contendo diferentes concentrações de substâncias ácidas. Mediu-se o pH pouco antes da adição do ácido. Vinte e quatro horas após a adição e manutenção da mistura na temperatura ambiente, nova avaliação do pH foi efetuada, e semeado 0,1 ml em ágar XLD, para fins de quantificação do crescimento bacteriano, segundo os critérios estabelecidos na Tab. 1.

A tentativa de recuperação das bactérias, por plaqueamento direto, foi realizada, tendo sido utilizadas as seguintes concentrações para os produtos ácidos: Bio Add^R (0; 3; 6; 9; 12; 15 e 18 litros por tonelada de ração); Myco Curb^R (0; 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5 e 3 litros por tonelada) e para Salmex^R (0; 1; 2; 3; 4; 5 e 6 litros por tonelada).

EXPERIMENTO 4: Atividade bactericida de produtos comerciais contendo ácidos orgânicos em rações úmidas experimentalmente contaminadas com salmonelas.

Amostras de 20 gramas de rações esterilizadas, e depois contaminadas com *S. enteritidis* (10² UFC por grama), foram aspergidas com os produtos comerciais: Bio Add^R (0; 3; 6 e 12 litros por tonelada de ração), Myco Curb^R (0; 0,5; 1 e 2 litros por tonelada de ração) e Salmex^R (0; 1; 2 e 4 litros por tonelada de ração). Após 4 horas à temperatura ambiente, foram adicionados 80 ml de água destilada estéril para cada concentração. Foram semeados com 0,1 ml em ágar XLD, e 10 ml dessas misturas contendo as rações tratadas foram submetidas a pré-enriquecimento em APT estéril. Os valores de pH foram coletados logo após a adição da água destilada estéril e, novamente, após a incubação em APT. Depois de serem incubadas em estufa (37°C/24horas), as amostras pré-enriquecidas em APT foram passadas nos meios seletivos: TH (42°C/24horas), SC (37°C/24horas) e RV (42°C/48horas), e posteriormente, submetidas ao plaqueamento em meio sólido (XLD). A quantificação do crescimento bacteriano foi efetuada mediante a utilização de escores, cujos critérios foram estabelecidos na Tab. 1.

RESULTADOS

EXPERIMENTO 1: O processo de contaminação utilizado foi eficiente, e as rações contaminadas submetidas à tentativa de recuperação de salmonelas permitiram a demonstração de um número incontável de UFC em todas as placas. Todos os métodos de isolamento também se mostraram altamente eficientes para a recuperação de salmonelas. Para os controles não-contaminados, não se observou o isolamento de salmonelas.

EXPERIMENTO 2: O Bio Add^R adicionado às rações contaminadas com *S. gallinarum* ou *S. enteritidis* e que foram examinadas bacteriologicamente um dia após tratamento não foi eficiente para descontaminar a ração. Mesmo mantendo o tratamento por 7 dias, não foi notado qualquer sinal de redução da contaminação por *S. enteritidis*. O Myco Curb^R também não foi efetivo em reduzir a contaminação por *S. enteritidis*. Tais resultados foram obtidos mediante leitura das placas semeadas e análise do escore obtido, conforme descrito na Tab. 1.

Tabela 1

Estimativa de escores de crescimento bacteriano na recuperação de salmonelas de rações experimentalmente contaminadas e tratadas com produtos comerciais contendo ácidos orgânicos (São Paulo, 1993).

Escore	Observações Efetuadas
0	ausência de crescimento.
1	1 a 50 Unidades Formadoras de Colônias (UFC) por placa.
2	50 a 100 UFC por placa.
3	10 a 25 UFC por centímetro quadrado.
4	25 a 100 UFC por centímetro quadrado, sem alteração da coloração do meio.
5	Número incontável de UFC, com discreta alteração da coloração do meio.
6	Número incontável de UFC lactose negativas, com alteração da coloração do meio.

EXPERIMENTO 3: A ração experimentalmente contaminada com *S. enteritidis*, pouco antes da adição dos diferentes produtos ácidos comerciais, por mistura úmida apresentou pH 6,9. A variação do pH para as rações tratadas, mantidas à temperatura ambiente, e submetidas à mensuração do pH após 24 horas, encontra-se na Tab. 2, onde também se observa que os produtos eficientes na eliminação da contaminação por *S. enteritidis* foram Bio Add^R e Salmex^R, e que existe uma relação entre o pH da mistura úmida após 24 horas e a recuperação da bactéria, sendo que para valores de pH iguais ou inferiores a 6,5 se obteve ausência do crescimento da bactéria.

Tabela 2

Valores de pH obtidos após 24 horas, e de escores de crescimento de *S. enteritidis* em ágar XLD para ração tratada (mistura úmida) com diferentes concentrações de ácidos orgânicos (São Paulo, 1993).

Bio Add ^R			Myco Curb ^R			Salmex ^R		
C(l/t)*	pH	Escore	C(l/t)	pH	escore	C(l/t)	pH	escore
0	7.1	3	0	7.1	2	0	7.0	5
3	5.6	0	0.5	6.9	1	1	6.5	0
6	5.2	0	1.0	6.8	0	2	6.2	0
9	5.0	0	1.5	6.7	1	3	6.0	0
12	4.8	0	2.0	6.6	0	4	5.9	0
15	4.7	0	2.5	6.6	1	5	5.8	0
18	4.6	0	3.0	6.5	1	6	5.7	0

* C (l/t): concentração (litros/tonelada).

Tabela 3

Valores de pH das soluções de rações obtidos mediante utilização de ácidos orgânicos, logo após a adição da água destilada estéril (pH 1) e 24 horas depois da incubação em APT (pH 2) (São Paulo, 1993).

Bio Add ^R			Myco Curb ^R			Salmex ^R		
C(l/t)*	pH1	pH2	C(l/t)	pH1	pH2	C(l/t)	pH1	pH2
0	6.9	7.5	0	7.0	7.5	0	6.9	7.5
3	6.1	7.5	0.5	6.9	7.5	1	6.8	7.5
6	5.8	7.5	1.0	6.8	7.5	2	6.6	7.4
9	5.4	7.4	2.0	6.8	7.5	4	6.5	7.4

* C (l/t): concentração (litros/tonelada).

EXPERIMENTO 4: A variação verificada nos valores de pH, obtidos após adição de água destilada estéril (pH 1) é verificada na Tab. 3, podendo-se notar ter havido maior variação de valores, conforme o aumento da concentração ácida, para rações tratadas com Bio Add^R que para rações tratadas com Salmex^R e com Myco Curb^R. Os valores obtidos após incubação em APT estéril (pH 2) são apresentados na mesma tabela, podendo se observar resultados praticamente idênticos para os produtos ácidos em suas diferentes concentrações usadas. Os escores de crescimento obtidos foram pequenos em UFC no plaqueamento direto.

DISCUSSÃO

Mediante o uso da metodologia descrita para o isolamento de salmonelas de rações artificialmente contaminadas, verificou-se que o processo de contaminação utilizado foi eficiente, visto no ex-

perimento 1 ter sido conseguida a recuperação bacteriana para todas as salmonelas inoculadas e por todos os métodos de isolamento, os quais se mostraram igualmente eficientes, não tendo sido possível estabelecer-se a superioridade de um sobre o outro.

Com relação ao tratamento ácido da ração, algumas tentativas para controle de salmonelas resultaram em incompleta destruição da bactéria, conforme relatado por Westerfield *et al.*¹⁶ e Duncan; Adams⁵, devido ao nível relativamente baixo de tratamento ácido utilizado (0,1%). Tratamentos bem-sucedidos demonstrando a possibilidade de uso de ácidos como aditivos alimentares descontaminaram a ração e os seus ingredientes ao usar ácido fórmico a 0,25%⁹ e Myco Curb^R também a 0,25%¹². Contrariamente ao observado por estes autores, na pesquisa aqui relacionada como experimento 2, não se obteve sucesso na diminuição de salmonelas presentes na ração ao se usar Bio Add^R e Myco Curb^R, mesmo com níveis de inclusão destes aditivos superiores às dosagens recomendadas.

Busta⁴ relatou que agentes antibacterianos como os ácidos têm potencialmente maior atividade contra células injuriadas; assim, se um ácido é incorporado durante a fabricação de ração, pode-se esperar que este material tenha uma influência sobre células estressadas maior que sobre as não-estressadas. Portanto, os ácidos podem produzir dano ou servir como um agente específico para inibir células injuriadas e são usados para detectar ou definir injúria, sendo que estes agentes obviamente afetam de forma negativa a reparação da injúria.

Ao usarem um produto comercial à base de ácido propiônico, Duncan; Adams⁵ obtiveram pouco efeito sobre a população de salmonelas e relataram que a redução observada deve ter sido espontânea e especulam que o aditivo pode ser efetivo somente contra células se multiplicando ou em crescimento, ou que a ineficácia poderia ser devida à ligação das partículas do aditivo químico com a ração e não entrando em contato com as células bacterianas. Finalizam afirmando que o modo de ação do aditivo sobre células bacterianas necessita de investigação adicional.

No aqui considerado experimento 3, foi usado um veículo aquoso, justamente para haver contato entre células bacterianas e o aditivo químico, e mediante a leitura do escore de crescimento, pode-se concluir não ser este o motivo da não-obtenção de resultados adequados, pois dos três ácidos utilizados, apenas um (Myco Curb^R) é que não conseguiu eliminar as salmonelas, enquanto para os outros dois ácidos (Bio Add^R e Salmex^R) não se conseguiu a recuperação bacteriana para os diferentes níveis de tratamento ácido.

No estudo da atividade bactericida na mistura seca, para os níveis de tratamento ácido empregados, não foi obtida a eliminação total de salmonela das rações.

Neste trabalho (experimentos 3 e 4) houve preocupação com o pH, e esta foi motivada em parte pela consideração de que a atividade de muitos aditivos antimicrobianos disponíveis para uso em rações são dependentes do pH, conforme foi relatado por Tabib *et al.*¹⁴.

Todavia, diante dos resultados obtidos, pode-se verificar que mesmo diante de altas concentrações de ácidos, o pH manteve-se dentro da faixa considerada por Andrews como adequada para o crescimento das salmonelas, o que evidencia não ser a simples queda do pH a causa da inibição do crescimento bacteriano, havida no experimento 3, embora tenha sido verificada maior diminuição nos valores de pH para os ácidos que foram efetivos (Bio Add^R e Salmex^R). Uma observação interessante pode ser feita com relação aos valores de pH obtidos no experimento 4. Esses valores eram diferentes logo após a incorpo-

ração dos produtos ácidos. Todavia, na leitura efetuada 24 horas depois, verificou-se que apresentaram resultados praticamente idênticos; este fato nos leva a aduzir, em concordância com Tabib *et al.*¹⁴, que a alteração nos valores de pH se deveu ao crescimento das salmonelas.

Os resultados obtidos ainda demonstraram que as medidas adotadas atualmente são ineficientes para impedir a disseminação de salmonelas, e deixam entrever a necessidade de um programa preventivo consistente, no qual as medidas gerais efetivadas em nível de granja deveriam ser complementadas por outras direcionadas às vias de transmissão, como as matérias-primas que compõem as rações.

CONCLUSÕES

Baseando-se nos resultados obtidos, e para as condições da pesquisa realizada, é lícito concluir que: os caldos de enriquecimento seletivo: TH, SC e RV foram igualmente eficientes no reisolamento de salmonelas a partir de ração artificialmente contaminada, o mesmo ocorrendo com os meios sólidos de plaqueamento AVB e XLD, e os ácidos orgânicos apresentaram comportamento irregular em termos de atividade bactericida em rações artificialmente contaminadas por *Salmonella spp.*

SUMMARY

This research was designed to evaluate salmonella recovery from experimentally contaminated feeds and to compare the bactericidal and residual efficacy of acids in feeds for chickens. The bacterial recovery was successful for all of the utilized media, and on a first trial, Bio Add[®] and Myco Curb[®] were not effective in the decrease of salmonella in experimentally contaminated feeds. On a second trial, using water solution to apply the acids, Bio Add[®] and Salmex[®] were effective. Bactericidal activity on dry mix was not observed with any of the products or levels tested in feeds. In bactericidal and residual evaluations of organic acids, Salmex[®] was effective and Sal Curb[®] was not.

UNITERMS: Salmonella; Organic acids; Feed; Chickens.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- ANDREWS, W.H. A review of culture methods and their relation to rapid methods for the detection of salmonella in foods. **Food Technology**, v.39, n.3, p.77-82, 1985.
- 2- BERCHIERI Jr., A.; BARROW, P.A. Reduction in incidence of experimental fowl typhoid by incorporation of a commercial formic acid preparation into poultry feed. **Poultry Science**, v.75, n.3, p.339-441, 1996.
- 3- BIER, O. **Bacteriologia e Imunologia**. São Paulo: Melhoramentos, 1985. 1234p.
- 4- BUSTA, F.F. Practical implications of injured microorganisms in food. **Journal Milk Food Technology**, v.39, n.2, p.138-45, 1976.
- 5- DUNCAN, M.S.; ADAMS, A.W. Effects of a chemical additive and of formaldehyde gas fumigation on Salmonella in poultry feeds. **Poultry Science**, v.51, n.3, p.797-802, 1972.
- 6- GENIGEORGIS, C.A. Factors affecting the probability of growth of pathogenic microorganisms in foods. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.179, n.12, p.1410-7, 1981.
- 7- GOEPFERT, J.M.; HICKS, R. Effect of volatile fatty acids on *Salmonella typhimurium*. **Journal of Bacteriology**, v.97, p.956-8, 1969.
- 8- HINTON, M.; LINTON, A.H. Control of salmonella infections in broiler chickens by the acid treatment of their feed. **Veterinary Record**, v.123, n.16, p.416-21, 1988.
- 9- HINTON, M.; LINTON, A.H.; PERRY, F.G. Control of salmonella by acid disinfection of chicks food. **Veterinary Record**, v.116, n.16, p.502, 1985.
- 10- HUMPREY, T.J.; LANNING, D.G. The vertical transmission of salmonella and formic acid treatment of chicken feed. **Epidemiology and Infection**, v.100, n.1, p.43-9, 1988.
- 11- PUMFREY, L.; NELSON, C.E. Use of a most probable number method modified with a deoxyribonucleic acid probe to monitor control by food preservatives of natural salmonella contamination in animal meat meals. **Poultry Science**, v.70, n.4, p.780-4, 1991.
- 12- ROUSE, J.; ROLOW, A.; NELSON, C.E. Effect of chemical treatment of poultry feed on survival of salmonella. **Poultry Science**, v.67, n.8, p.1225-8, 1988.
- 13- SALMOND, C.V.; KROLL, R.G.; BOOTH, I.R. The effect of food preservatives on pH homeostasis in *Escherichia coli*. **Journal of General Microbiology**, v.130, p.2845-50, 1984.
- 14- TABIB, Z.; JONES, F.T.; HAMILTON, P.B. Microbiological quality of poultry feed and ingredients. **Poultry Science**, v.60, n.7, p.1392-7, 1981.
- 15- VANDERWAL, P. Salmonella control of feedstuffs by pelleting or acid treatment. **World's Poultry Science Journal**, v.35, n.2, p.70-8, 1979.
- 16- WESTERFELD, B.L.; ADAMS, A.W.; ERWIN, L.E.; DEYOE, C.W. Effect of a chemical additive on salmonella in poultry feed and host birds. **Poultry Science**, v.49, n.5, p.1319-23, 1970.

Recebido para publicação: 22/04/1997

Aprovado para publicação: 30/03/1998

ANEXO: COMPOSIÇÃO DOS PRODUTOS ÁCIDOS COMERCIAIS UTILIZADOS

Salmex[®] (Anitox Corporation): ácido propiônico líquido (7%), formaldeído (30%) e solução amoniacal a 5% e água (63%).

Myco Curb[®] (Kemin Industries inc.): ácido propiônico (65%), ácido acético (5%), ácido sórbico (3%), ácido benzóico (3%), mono e di éster 1-2 propanodiol, fosfato de amônio hidratado (20%), benzoato de

propila (1%), acetato de propila (1%) e hidroxianisole butilado (1%).

Sal Curb[®] (Kemin Industries inc.): sais de ácidos propiônico, fórmico e sórbico, além de agentes umectantes mono e diglicéridios.

Bio Add[®] (British Petroleum Company): ácido fórmico (68%), ácido propiônico (20%) e água (12%).