



Escola de Ciências da Vida

Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal

Natural Antimicrobials for Safety and Shelf-Life Extension Research Group

Relatório Científico

Efeito de Probiótico comercial na população de *Salmonella* Enteritidis durante o processo de digestão simulada de frangos

Pesquisadores Responsáveis

Dr. Fernando Bittencourt Luciano

Dr. Giuseppe Meca

Dezembro 2016

Plano de atividades realizado:

- 1) Reativação e preparação de uma mistura de 5 cepas de *Salmonella* Enteritidis. As bactérias foram adaptadas a um ambiente de baixa atividade de água, simulando uma situação real de um patógeno encontrado no solo ou em uma ração;
- 2) O pool de *Salmonella* foi adicionado tanto no início do processo (simulando ingestão em ração), quanto no final do processo (simulando um intestino infectado);
- 3) A fórmula probiótica foi adicionada no início do processo. Para tanto, o produto em pó foi adicionado na ração nas proporções indicadas pela indústria (1 kg probiótico/tonelada de ração);
- 4) A digestão simulada foi constituída das seguintes etapas:

Simulação da digestão no papo: Neste compartimento, a ração contendo a fórmula probiótica foi adicionada em 10 mL de água deionizada estéril e o pH ajustado para 6,0 com solução de HCl 1M. O tempo de digestão foi de 30 minutos. Também foi adicionado o pool do patógeno neste momento para simulação da ingestão de *Salmonella* via ração.

Simulação da digestão no proventrículo: No mesmo erlenmeyer contendo a solução representativa do papo, foram adicionados 25 mL de água deionizada estéril, 3.850 U/mL de pepsina e pH da digesta ajustado para 2,5 com solução de HCl 1M. O tempo de permanência foi de 30 minutos.

Simulação da digestão na moela: Foram adicionadas à solução anterior bolas de vidro para a simulação da digestão mecânica que ocorre na moela. O sistema foi colocado sob agitação a 220 rpm e o pH é ajustado para 3,0 com solução de NaHCO₃ 1M. O tempo de permanência nesta etapa foi de 60 minutos.

Simulação da digestão no intestino delgado: À solução da digestão da moela foram adicionados 8,0 U/mL de pancreatina e 135 mg de sais biliares e o pH ajustado para 6,2, com solução de NaHCO₃ 1M. O tempo de permanência nesta etapa foi de 120 minutos. No caso de simulação de um intestino já infectado, foi adicionado o pool de *Salmonella* neste momento.

Simulação da digestão no intestino grosso: Após o tempo de permanência no intestino delgado, o pH da solução foi aumentado para 7,0, com solução NaHCO₃ 1M, mantendo-se essa condição por 20 minutos.

- 6) Análises Microbiológicas:

Foram retiradas amostras depois da simulação da digestão para a quantificação das bactérias probióticas (meio MRS) e de *Salmonella* (meio TSA com overlay de XLD para quantificação de bactérias fisiologicamente sanas e injuriadas).

Todos os ensaios foram realizados em triplicata

Resultados

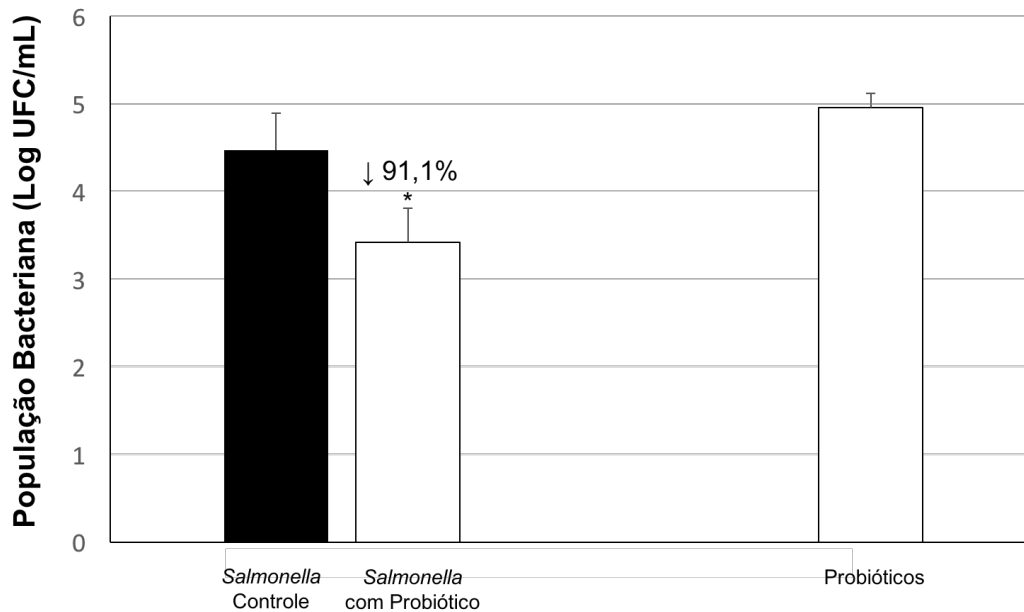


Figura 1. População bacteriana após o processo de digestão simulada em Log UFC/mL. Tanto o pool de *Salmonella* quanto os probióticos estavam presentes desde o início do processo. * Representa diferença significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,05$).

Como observado na Figura 1, a adição da fórmula probiótica na ração resultou em uma redução superior a um ciclo logarítmico (91,1%) em relação ao grupo controle. Ambos os ensaios foram submetidos exatamente às mesmas condições, tendo como única diferença a presença ou não dos probióticos em pó na ração.

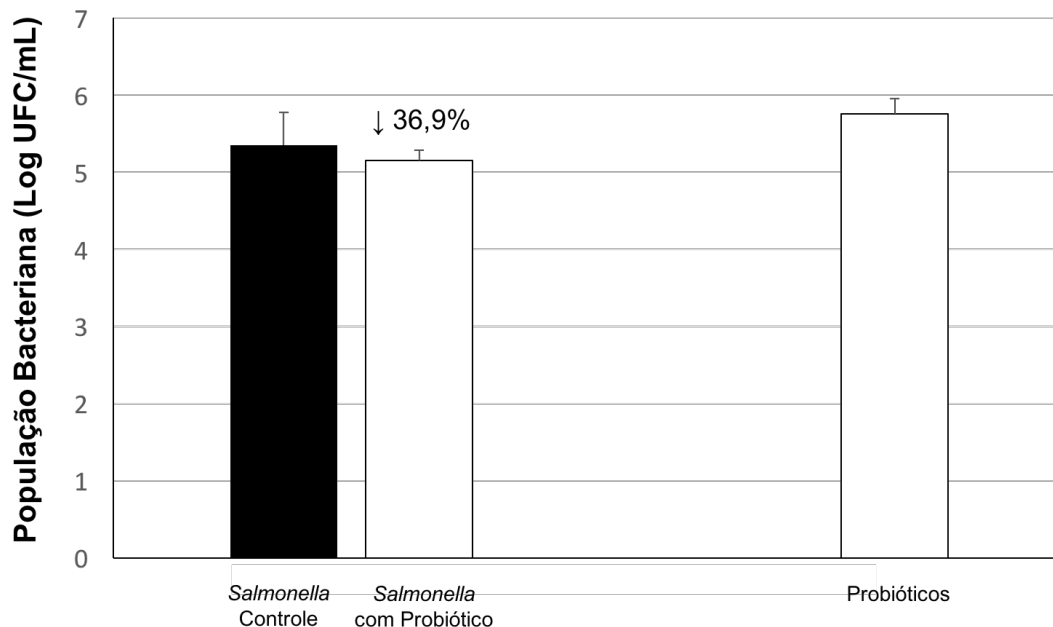


Figura 2. População bacteriana após o processo de digestão simulada em Log UFC/mL. Os probióticos estavam presentes desde o início do processo, enquanto que o *pool* de 5 cepas de *Salmonella* Enteritidis só foi adicionado na fase de intestino delgado.

Pode-se observar na Figura 2 que não ocorreu uma redução significativa (36,9%) da população de *Salmonella* quando a mesma foi inoculada diretamente na fase de intestino delgado. Neste experimento, a *Salmonella* não enfrentou o pH ácido das fases de proventrículo e moela. Além disso, o tempo de exposição do patógeno com os probióticos foi bastante reduzido, caindo de 4 horas e 20 minutos para apenas 2 horas e 20 minutos. De qualquer maneira, este ensaio teve o intuito de observar a ação dos probióticos sobre uma população de *Salmonella* já presente no intestino.

Vale ressaltar que estes testes são indicativos e buscam simular o mais realisticamente possível os processos de digestão. Ensaio *in vivo* são indispensáveis para validar a ação dos probióticos.



Dr. Fernando Bittencourt Luciano
Professor Adjunto III
NASSLE Research Group
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal
Escola de Ciências da Vida
Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Email: fernando.luciano@pucpr.br
Skype: fbluciano
www.nasslegroup.com