Importancia de la alimentación en el control de *Salmonella*.

Actividad antimicrobiana de los ácidos orgánicos en el pienso frente a *Salmonella Entérica* aislada de porcino (II)

Martínez AA[1], Vázquez JN [1], Cuarón JA [1], Séon A [2], Simões Nunes C [2], López JA[3]

[1] Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Fisiología Animal (INIFAP), México.

[2] DSM Nutritional Products, CRNA Francia.

[3] DSM Nutritional Products Iberia.

Tabla 1. Evaluación MIC frente a *Salmonella Typhimurium*.

	MIC_{99}					MIC_{50}	
Ácidos	**pKa**	**mg/ml**	**mmol/l**	**pH**	**actividad**	**mmol/l**	**pH**
Propiónico	4.87	1.85	25	5.48	estática	12.5< <25	5.48
Butírico	4.78	2.20	25	5.49	estática	12.5< <25	5.49
Sórbico	4.76	>1.25	>11.20	<6.36		2.8< < 5.6	6.76
Acético	4.74	1.50	25	5.48	estática	12.5< <25	5.48
Succínico	4.21	2.95	25	4.84	<5 UFC	12.5< <25	4.84
Benzoico	4.19	3.05	25	5.30	Lítica	6.3< <12.5	5.96
Láctico	3.86	2.25	25	<5.15	estática	12.5< <25	5.15
Fórmico	3.74	1.15	25	5.30	estática	12.5< <25	5.30
Cítrico	3.10	5.25	25	4.36	Lítica	6.3< <12.5	4.75
Fumárico	3.04	2.90	25	4.31	Lítica	12.5< <25	4.31

Actividad "in vitro" de los ácidos orgánicos

Para evaluar el efecto "in vitro" de algunos de los ácidos orgánicos más utilizados en alimentación animal y de otros que no lo son, se diseñó una prueba con el objetivo de comparar la actividad antimicrobiana de una serie de ácidos tales como propiónico, butírico, sórbico, acético, succínico, benzoico, láctico, fórmico, cítrico y fumárico, frente a *Salmonella* subespecie enterica serotipos, *Typhimurium, Derby* y *Enteritidis*.

Materiales y métodos

Las variedades bacterianas se aislaron del contenido intestinal del lechón:

- *Salmonella* entérica subsp. entérica serotipo *Typhimurium*.
- *Salmonella* entérica subsp. entérica serotipo *Derby*.
- *Salmonella* entérica subsp. entérica serotipo *Enteritidis*.

La suspensión contenía aproximadamente 10^5 UFC/ml ($2x10^4$ << $1x10^5$). La actividad antibacteriana se calculó mediante el método de dilución de caldo Microtítulo midiendo la absorbancia a 595nm y realizando el contaje de bacterias (necesario para verificar el inóculo inicial: $2x10^4$ << $1x10^5$). El análisis de datos se realizó midiendo la reducción de la densidad del cultivo durante la experiencia y a las 24 horas, sólo de forma cualitativa y no cuantitativa para verificar la actividad bactericida. Asimismo, se determinó la concentración mínima inhibitoria (MIC) y el retraso del crecimiento de la bacteria (RC).

Los ácidos cítrico y fumárico fueron los que presentaron un mayor poder acidificante en el caldo de cultivo utilizado (BTS, caldo enriquecido de soja), seguido a continuación de los ácidos succínico y láctico. Según se aumentaba la concentración del resto de ácidos orgánicos testados, éstos mostraron efectos comparables sobre el pH.

Resultados

Al evaluar la concentración mínima inhibitoria (MIC) de los ácidos orgánicos susceptibles de inhibir significativamente el crecimiento microbiano de los tres serotipos de *Salmonella* un 99 y un 50% (MIC_{99} y MIC_{50}) se observaron los resultados

Tabla 2. Retraso del crecimiento (RC) frente a diferentes soluciones de ácidos orgánicos

Solución usada ➔ 11 mm		Ácida		Neutralizada con NaOH		Sal ácida	
Acidos	**pKa**	**pH**	**RC**	**pH**	**RC**	**pH**	**RC**
Propiónico	4.87	6.41	3%	7.06	2%	7.09	0%
Butírico	4.78	6.34	3%	7.04	1%	7.09	0%
Sórbico	4.76	6.44	15%	7.08	8%	ND	ND
Acético	4.74		ND		ND	ND	ND
Succínico	4.21	5.70	4%	7.01	1%	7.07	0%
Benzoico	4.19	6.46	32%	7.06	9%	7.08	8%
Láctico	3.86	6.32	1%	7.05	1%	7.07	0%
Fórmico	3.74	6.47	2%	7.08	2%	7.09	0%
Cítrico	3.10	5.16	14%	7.06	2%	5.82	4%
Fumárico	3.04	5.41	6%	7.07	ND	7.04	0%

que se muestran en la *tabla nº 3*. Los ácidos están ordenados en función de su valor de pKa de mayor a menor.

Los valores de pH indicados en la *tabla 1* corresponden al pH *in vitro* del caldo bacteriano utilizado en este experimento *in vitro* con la mayor concentración de ácidos orgánicos testados indicados para cada concentración mínima inhibitoria (MIC).

Las determinaciones de la concentración mínima inhibitoria (MIC) de los ácidos orgánicos necesarias para inhibir el crecimiento bacteriano de *Salmonella* tras 24 horas de cultivo, se completaron con el estudio de los efectos que los ácidos orgánicos utilizados en el ensayo tuvieron sobre el retraso del crecimiento (RC) de la bacteria correspondiente, mostrándose en la tabla nº 2 los valores correspondientes a *Salmonella Typhimurium*.

A la misma concentración testada "in vitro", los ácidos benzoico, sórbico y cítrico ejercen el mayor impacto sobre el incremento de la fase lag de *Salmonella Typhimurium*. El control y las pruebas del cultivo con ácido benzoico, sórbico y cítrico requirieron respectivamente 4, 3, 11.9, 8 y 7.7 horas para alcanzar un aumento de la densidad óptica (DO) de 0,1. Estos ácidos retrasaron el crecimiento de la bacteria un 32, 15 y 14% respectivamente. Se obtuvieron resultados similares en los crecimientos de los serotipos *Enteritidis* y *Derby*.

El experimento se repitió ajustando el pH para eliminar la contribución que la acidificación podía producir. Los resultados observados mostraron que la actividad antimicrobiana se mantuvo sólo con los ácidos benzoico y sórbico.

En el año 2005 se llevo a cabo otro ensayo "in vitro" con el propósito de investigar la actividad antibacteriana del ácido benzoico y del benzoato de sodio frente a 10 serotipos de *Salmonella* de porcino causantes de daños potenciales en la industria porcina en todo el mundo. Aunque bajo condiciones MIC_{90}, la acción del ácido benzoico y del benzoato de sodio fue bactericida, la actividad antimicrobiana del ácido benzoico fue más importante que la del benzoato de sodio (*Tabla 3*).

Actividad "in vivo" frente a *Salmonella* del ácido benzoico

Aunque el uso de ácido benzoico en la dieta de los lechones no es una novedad, su uso contra *Salmonella* ha sido recientemente evaluado. A continuación, se presentan dos ensayos de desafío contra esta bacteria realizados en el Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Fisiología Animal (INIFAP) de México.

Ensayo nº 1. Respuesta de los cerdos de engorde desafiados con *Salmonella* a los antibióticos, ácidos orgánicos, extractos de plantas o levaduras vivas.

En este ensayo se utilizaron 96 cerdos con un peso vivo de 42 kg. distribuidos aleatoriamente en 6 tratamientos: control, antibióticos, levaduras vivas, ácido benzoico, mezcla comercial de ácidos orgánicos y extracto de orégano. Cada tratamiento tuvo 4 réplicas y los resultados se midieron durante 90 días. Los días 12 y 16, los animales fueron desafiados por vía oral con 1x109 UFC de *Salmonella cholerasuis* aislada de un caso clínico.

Tabla 3. Actividad antimicrobiana del ácido benzoico.

Ácido benzoico	MIC_{99} mg/ml	pH	MIC_{90} Mg/ml	pH	MIC_{50} mg/ml
Salmonella ser. *Typhimurium* PF3127	3	5.13	1.5	6.05	0.5<<1
Salmonella ser. *Typhimurium* PF3153	2	5.78	1.5	6.05	0.5
Salmonella ser. *Typhimurium* PF2692	>1.5		1.5	6.05	0.5
Salmonella ser. *Derby* PF2981	2.5	5.45	1.5	6.05	<0.5
Salmonella ser. *Derby* PF2722	3	5.13	1.5	6.05	0.5
Salmonella ser. *Derby* PF2709	>1.5		1.5	6.05	0.5
Salmonella ser. *Infantis* PF2303	2	5.78	1.5	6.05	0.5<<1
Salmonella ser. *Enteritidis* PF1338	3	5.13	1.5	6.05	0.5<<1
Salmonella ser. *London* PF2744	3	5.13	1.5	6.05	0.5<<1
Salmonella ser. *Kedougou* PF1876	2	5.78	1	6.46	0.5<<1

Como era de esperar, el crecimiento se paralizó en todos los animales entre los días 14 y 34 después de la inoculación, siendo esta depresión del crecimiento menos severa en el grupo que recibió ácido benzoico. La ingesta diaria de pienso fue similar entre los tratamientos a lo largo del periodo estudiado y la ganancia de peso acumulada fue mayor en el grupo de antibióticos, ácido benzoico y levaduras (848, 830 y 804 g. respectivamente) en comparación a los grupos extracto de orégano, control y mezcla de ácidos (769, 761 y 760 g.)

El tratamiento administrado en el grupo de los antibióticos fue de 200 ppm de clortetraciclina y 220 ppm de furazolidona en la primera fase y 110 ppm de tirosina en las otras tres fases. Las levaduras de *Saccharomyces cerevisae* demostraron una gran capacidad para precipitar la *Salmonella* patogénica y el tratamiento con ácido benzoico redujo los recuentos microbiológicos en las heces; los acidificantes y el extracto de orégano tuvieron efectos inespecíficos. Estos resultados no se consideraron sorprendentes y se vieron como un tratamiento preventivo alternativo para las infecciones de tipo oral. En la *tabla 4* se resumen los resultados obtenidos en el ensayo.

Ensayo nº 2. El ácido benzoico como aditivo en piensos para cerdos en crecimiento infectados de forma natural con *Salmonella*.

En este otro ensayo, se utilizaron un total de 120 cerdos para evaluar los efectos de la adición del ácido benzoico, sólo o en combinación con antibióticos, para mejorar el rendimiento productivo de cerdos en crecimiento y acabado, recuperándose de una infección por *Salmonella cholerasuis*.

La infección se controló aparentemente con el uso apropiado de antibióticos y después de doce días los cerdos con un peso vivo de 18,9 kilos se asignaron a 6 tratamientos con 4 réplicas cada uno y 5 cerdos por réplica.

El diseño experimental fue factorial (2x3) con dos niveles de ácido benzoico (cero y 5 kg por tonelada) y tres tratamientos diferentes con antibióticos (ninguno, virginiamicina a 10 ppm y tilosina a 110 ppm). Después de 42 días, los cerdos fueron examinados para detectar la presencia de la *Salmonella* (de hecho su presencia se verificó atribuyéndose a un efecto de arrastre de la infección previa).

Los resultados indicaron que el uso de ácido benzoico o antibióticos redujo la mortalidad en comparación con el control (no se observaron efectos interactivos en cualquier rasgo estudiado en este ensayo), obteniendo con el ácido benzoico la menor tasa de mortalidad (1,2% frente a 6% en el control negativo). Durante los primeros 28 días, el ácido benzoico o la virginiamicina obtuvieron el crecimiento más alto. Al final del ensayo, los cerdos tratados con virginiamicina o ácido benzoico fueron 7 y 4 kg más pesados que los cerdos control, respectivamente. Aunque el ácido benzoico no sustituye las propiedades terapéuticas de un antibiótico para enfermedades respiratorias inespecíficas (tilosina en este caso), obviamente ayudó en el control de la enfermedad, dando lugar a excelentes resultados, mejores que los obtenidos con virginiamicina.

Conclusiones

- En el ensayo "i*n vitro*", con la excepción del ácido láctico, la concentración de to-

Tabla 4. Ensayo "In vivo" nº 1. Resultados productivos en el desafio frente a *Salmonella*.

	Control	Antibióticos	Levaduras	Ácidos orgánicos	Orégano	Acido Benzoico
Peso inicial	43.00	42,72	42,06	42.06	42,14	41.13
Peso final	111.46^{c}	119,02^{a}	114,5^{b}	110.5^{c}	111,37^{c}	115.87^{b}
CMD	2.657^{a}	2,593^{a}	2,461^{b}	2.571^{ab}	2,515^{ab}	2.407^{b}
GMD	0.761^{c}	0,848^{a}	0,805^{b}	0.760^{c}	0,769^{c}	0.831^{ab}
IC	3.49^{b}	3,06^{a}	3,06^{a}	3.38^{b}	3,27^{b}	2.89^{a}

dos los ácidos orgánicos que inhibieron el 99% del crecimiento bacteriano de cada *Salmonella* testada, fue la misma, 25mmol/l., las MIC_{99} no pudieron distinguir los diferentes ácidos, mientras que las actividades antimicrobianas fueron diferentes.

- Las altas concentraciones de los ácidos orgánicos testados en la prueba *"in vitro"* mostraron que propiónico, butírico, acético y fórmico fueron notablemente menos eficaces frente a los tres serotipos de *Salmonella Entérica* ensayados.

- La determinación de MIC_{50} mostró que, en general, a esta concentración testada *"in vitro"*, los ácidos sórbico, benzoico y cítrico fueron los compuestos más activos frente a *Salmonella entérica*.

- Los estudios de retraso del crecimiento confirmaron que el ácido benzoico presentaba los efectos más pronunciados como inhibidor del crecimiento bacteriano, seguido de cerca por los ácidos sórbico y cítrico. Estos resultados *"in vitro"* manifiestan con rotundidad que éstos tres ácidos pueden reducir la presencia de *Salmonella "in vivo"*.

- En relación a la prueba *"in vivo"* en el primer ensayo, el grupo del ácido benzoico mostró los mejores resultados con solo una GMD 2% menor que el grupo antibiótico pero con un IC inferior en un 5,5% (2,89 vs 3,06). El grupo del ácido benzoico también obtuvo mejor rendimiento que la mezcla de ácidos orgánicos (+9,3% de GMD y -14% de IC).

- El grupo del ácido benzoico medido fase por fase mostró los mejores resultados demostrando una buena eficacia al desafío con *Salmonella*, sobre todo al principio de la prueba cuando los animales son más susceptibles a la enfermedad.

- En el segundo ensayo se observó que el uso de ácido benzoico o antibióticos redujo la mortalidad en comparación con el control, obteniendo con el ácido benzoico la menor tasa de mortalidad y, al final del ensayo, se pudo ver como los cerdos tratados con virginiamicina o ácido benzoico tuvieron mejores resultados que los cerdos del control.

- Aunque el ácido benzoico no sustituye las propiedades terapéuticas de un antibiótico para enfermedades respiratorias inespecíficas, ayudó en el control de la enfermedad, dando lugar a excelentes resultados, mejores que los obtenidos con virginiamicina.

Bibliografía

A cualquier interesado en obtener las referencias bibliográficas de este trabajo, pueden solicitarlas a.

DSM Nutritional Products Iberia.
+34 91 104 55 00
Nutricion-animal.madrid@dsm.com