

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia



TESE

**Avaliação de tratamentos químicos, físicos e biológicos sobre características
de camas aviárias na produção de frangos de corte**

Michelle Lopes

Pelotas, 2017

MICHELLE LOPES

Avaliação de tratamentos químicos, físicos e biológico sobre características de camas aviárias na produção de frangos de corte

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências, na área de concentração: Produção Animal.

Orientador: Prof. Dr. Victor Fernando Büttow Roll

Co-orientador: Prof. Dr. Fábio Leivas Leite

Pelotas, 2017

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

L864a Lopes, Michelle

Avaliação de tratamentos químicos, físicos e biológicos sobre características de camas aviárias na produção de frangos de corte / Michelle Lopes ; Victor Fernando Buttow Roll, Fábio Pereira Leivas Leite, orientadores. — Pelotas, 2017.

65 f.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2017.

1. Cal virgem. 2. Enlonamento. 3. Modulador biológico.
I. Roll, Victor Fernando Buttow, orient. II. Leite, Fábio Pereira Leivas, orient. III. Título.

CDD : 636.51

Elaborada por Gabriela Machado Lopes CRB: 10/1842

Michelle Lopes

**Avaliação de tratamentos químicos, físicos e biológico sobre características de
camas aviárias na produção de frangos de corte**

Banca examinadora

Prof. Ph.D Fábio Pereira Leivas Leite – Presidente

Dr. Beatriz Simões Valente – UFPEL

Dr. Cristiano Costenaro Ferreira – FURG

Prof. Dr. Massako Takahashi Dourado – UFPEL

Dr. Verônica Lisboa Santos – UFPEL

Banca examinadora

Prof. Ph.D Fábio Pereira Leivas Leite – Presidente

Dr. Beatriz Simões Valente- UFPEL

Dr. Cristiano Costenaro Ferreira – FURG

Prof. Dr. Massako Takahashi Dourado – UFPEL

Dr. Verônica Lisboa Santos – UFPEL

Para minha família

DEDICO

Agradecimentos

A Deus pelas bênçãos da vida, pois quem já nasceu para a vida nunca saberá o que é a morte.

Ao Professor Fábio Leite pela atenção, paciência, amizade e principalmente por sempre acreditar em mim e me incentivar nos bons e maus momentos.

Ao Professor e meu orientador Víctor pela orientação, confiança e empenho em me direcionar ao longo desses anos.

Ao Professor Fernando Rutz pela generosidade, humildade e ensinamentos.

As empresas Biotecnal e BRF por colaborarem e estimularem a pesquisa dentro das instituições e trazerem um pouco da realidade necessária para a academia.

A uma das minhas orientadoras Silvia Ladeira.

A todos que de certa forma colaboraram para que o trabalho fosse realizado.

Ao meu João Pedro que estimula meu viver, orienta minha escrita e meu coração.

Ao meu amigo e irmão de todas as horas André Silveira da Silva que inquestionavelmente sempre torceu e torce por mim.

A minha amiga e colega Beatriz Simões Valente que sempre esteve e sempre estará presente.

A Carol Bavaresco por ser tão atenciosa e preocupada e por transmitir boas energias para os colegas, torcendo e ajudando a todos com boa vontade.

A CAPES pela bolsa de estudo concedida.

Ao Departamento de Zootecnia pela disponibilidade e oportunidade de vivenciar mais tempo de carreira quando comparo com a minha própria graduação.

Aos que torcem por mim e me desejam sucesso e pensamentos positivos de longe ou de perto,

Muito obrigada!

“Não estamos perdidos. Pelo contrário, venceremos se não
tivermos desaprendido a aprender”

Rosa Luxemburgo

Resumo

LOPES, Michelle. **Avaliação de tratamentos químicos, físicos e biológicos sobre características de cama aviária na produção de frangos de corte.** 2017. 65f. Tese (tese em Produção animal, zootecnia) - Programa de Pós Graduação em Zootecnia. Universidade Federal de Pelotas. Faculdade de Agrônoma Eliseu Maciel. Pelotas, RS, Brasil.

A utilização de cal virgem (CaO), enlonamento e complexos bacterianos em camas de aviário visam o controle sanitário a partir da minimização de efeitos das reutilizações das camas na avicultura brasileira, no entanto, poucos artigos científicos comprovaram a eficácia destes métodos na redução da carga microbiana patogênica e da melhoria da qualidade das camas de aviário durante o vazio sanitário. Por isso, o objetivo do prim

eiro trabalho foi avaliar diferentes formas de tratamento da cama sobre a contagem de bactérias totais, enterobactérias e *Staphylococcus* spp. Foram avaliados quatro tratamentos sendo: CT = sem tratamento (controle), CV = cal virgem (300g m⁻²), EN = enlonamento, EC = enlonamento + cal virgem (300g m⁻²). As amostras de cama foram coletadas no dia zero, sexto e décimo segundo após o começo do vazio sanitário. Os tratamentos CV e EC foram mais eficientes (P<0,05) em reduzir bactérias quando comparado ao EN. Com exceção do CT todos os tratamentos atingiram mais de 84% de redução na contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) ao final do vazio sanitário. Com o presente estudo conclui-se que a utilização de cal, em termos práticos, é o tratamento mais indicado para a redução da carga bacteriana da cama aviária. No segundo trabalho objetivou-se estudar, *in vitro*, o efeito de um modulador biológico na proliferação de micro-organismos patogênicos em camas de aviários reutilizadas. Para isso utilizou-se diferentes concentrações de um modulador biológico que possui concentração de 10⁸ UFC/g de *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus cereus* e *Lactococcus lactis*. O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado, sendo apresentado num esquema fatorial entre doses do modulador e reusos das camas. O modulador foi utilizado nas doses de 0, 2, 4 e 8 g para 11 g de amostra de cama, e estes materiais foram reutilizados 2, 4, 6, 8, 10 e 12 vezes. Além disso, foram coletadas amostras para análise às 24, 48 e 72 horas após a aplicação do modulador na cama, totalizando 24 tratamentos. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey, considerando p<0,05. Os meios de cultura foram Brain Heart Infusion media, MacConkey e Chapman para bactérias totais, *Enterobacteriaceae* e *Staphylococcus* spp., respectivamente. Foram realizados testes para aferição do pH e da amônia das amostras. As bactérias foram quantificadas antes (controle inicial) e depois da aplicação dos tratamentos (24, 48 e 72 h) nas amostras de cama bem como para as análises químicas. Conforme, o aumento linear da dose (4 g e 8 g) e da permanência do modulador biológico nos materiais celulósicos, pode ser observado uma significativa redução das bactérias totais, enterobactérias assim como *Staphylococcus* spp. O mesmo foi observado na redução do pH e controle na emissão de amônia.

Palavras-chave: Cal virgem; enlonamento; modulador biológico.

Abstract

LOPES, Michelle. **Assessment of chemical, physical and biological treatments on litter characteristics in broiler production.** 2017. 65f. Thesis (Doctor of Science) - Graduate Program in Animal Science, Faculty of Agriculture Eliseu Maciel, Federal University of Pelotas, Brazil.

The use of quicklime (CaO), tarping and bacterial complexes in poultry litter samples aims at sanitary control by the minimization of effects of used litters in the Brazilian poultry industry. Few scientific studies have proven the effectiveness of these methods aimed to reduce the pathogenic microbial load during poultry depopulation. The first study aimed to evaluate the following litter treatments: T1 no treatment (control), T2 quicklime (300gm^{-2}), T3 tarping, and T4 tarping + quicklime (300gm^{-2}). Litter samples were collected on day zero and the sixth and twelfth days after the start of sanitary depopulation (fallowing?). The use of quicklime alone or quicklime + tarping was more effective ($P < 0.05$) in reducing bacteria when compared to litter tarping. Except for the control group, all treatments resulted in a reduction of over 84% in colony-forming unit (CFU) count at the end of fallowing. It was concluded that the use of quicklime alone in practical terms is the best treatment for bacterial load reduction in poultry litter. The second study aimed at the *in vitro* control of the proliferation of potentially pathogenic microorganisms in reused poultry litter of aviaries through the use of an *in vitro* biological modulator. The experiment was performed at the Bacteriology Laboratory of the Department of Biotechnology and Animal Nutrition of the Federal University of Pelotas (UFPEL) by using samples of both new and used litter materials. As poultry litter biological treatment, a biological modulator was used at different levels at known concentrations of microorganisms such as *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus cereus* and *Lactococcus lactis*. The design was completely randomized, and the modulator dosage was presented in a litter reuse factorial scheme (4x6) through the use of 2 factors at different levels: modulator dosage (0, 2, 4, 8 g) and litter reuse (2, 4, 6, 8, 10, 12 litter uses), where collection periods (at 24, 48 and 72 h) were included in the mean analysis, totaling 24 treatments. Tukey's tests were performed to compare treatment means. Specific culture media were used for total bacteria analysis (Brain Heart Infusion media), *Enterobacteriaceae* (MacConkey), *Staphylococcus spp.* (Chapman). Chemical physical tests were also carried out for pH and ammonia quantification of samples. Colony Forming Unit (CFU) count both before (initial control) and after the application of treatments in reused poultry litter samples and chemical physical analyses were performed. According to dosage increase (4 g and 8 g) and biological modulator permanence in litter samples, a significant bacterial reduction trend in each medium, as well as modulator interference in pH reduction and better ammonia emission control, was observed.

Keywords: quicklime; biologic treatments; modulator

Lista de figuras

Figura 1- Comportamento da temperatura interna dos materiais de cama de aviário	35
Figura 2- Análise do pH de amostras de camas aviárias reutilizadas e tratadas com diferentes doses de um modelador biológico	47
Figura 3- Análise de níveis de amônia provenientes de camas aviárias reutilizadas e tratadas com diferentes doses de um modulador biológico.	49

Lista de tabelas

Tabela 1. Redução média da contagem bacteriana em meios de cultura e sua interação com diferentes tratamentos em cama aviária durante o vazio sanitário. ...	32
Tabela 2. Contagem bacteriana (log UFC/g) de bactérias totais em camas de aviário reutilizadas por até 12 vezes.....	42
Tabela 3. Contagem bacteriana (log UFC/g) de enterobactérias em camas de aviário reutilizadas por até 12 vezes.....	43
Tabela 4. Contagem bacteriana (log UFC/g) de <i>S. aureus</i> em camas de aviário reutilizadas por até 12 vezes.....	45

Sumário

1 Introdução Geral.....	15
2 Objetivo Geral.....	17
2.1 Objetivos Específicos.....	17
3 Revisão Bibliográfica.....	18
3.1 A cama na produção de frangos de corte.....	18
3.2 Diferentes tratamentos dos materiais de cama aviária para posterior utilização.....	19
3.2.1 Agentes alcalinizantes e acidificantes em camas de aviário.....	19
3.2.2 Métodos físicos e microbiológicos de controle patogênico nas camas de aviário.....	22
4 Capítulo 1: Avaliações da efetividade de tratamentos químicos e físicos na redução de níveis bacterianos patogênicos em camas de aviário.....	27
4.1 Introdução.....	28
4.2 Material e Métodos.....	29
4.2.1 Local e período experimental.....	29
4.2.2 Manejo das aves e da cama.....	29
4.2.3 Delineamento experimental.....	29
4.2.4 Coleta e condicionamento das amostras	30
4.2.5 Registro da temperatura.....	30
4.2.6 Análises microbiológicas.....	31
4.2.7 Análise estatística.....	31
4.4 Resultados e Discussão.....	32
4.4.1 Microbiologia.....	32
4.4.2 Temperatura interna.....	33

4.5 Conclusões.....	35
5 Capítulo 2: Efeito de um modulador biológico na redução da carga bacteriana e características químicas de camas reutilizadas de aviários.....	36
5.1 Introdução.....	37
5.2 Material e Métodos.....	38
5.2.1 Local e período da experimentação.....	38
5.2.2 Experimentação piloto.....	38
5.2.3 Grupos controle.....	39
5.2.4 Modulador biológico.....	39
5.2.5 Diluições.....	39
5.2.6 Tratamentos e delineamento experimental.....	40
5.2.7 Análises químicas.....	40
5.2.7.1 pH.....	40
5.2.7.2 Amônia.....	41
5.3 Resultados e Discussão.....	41
5.3.1 Microbiologia.....	41
5.3.1.1 Bactérias totais.....	41
5.3.1.2 Enterobactérias.....	43
5.3.1.3 <i>Staphilococcus spp.</i>	45
5.3.2 Amônia e pH.....	46
5.4 Conclusão.....	49
6 Conclusões Gerais.....	50
Referências.....	51

1. Introdução geral

O Brasil é o segundo maior produtor de carnes de frango (13,146 milhões de ton), situando-se atrás apenas dos Estados Unidos (17,96 milhões de ton). É o maior exportador de carne de frango no mundo e comercializou cerca de 4,30 mil toneladas desse produto no ano de 2015. Houve uma elevação de 3,87% nas exportações de carne de frango quando comparada ao ano anterior, sendo destinados 32,7% da produção ao mercado externo, enquanto que 67,3% manteve-se no mercado interno. O agronegócio avícola é economicamente importante para o Brasil por contribuir com 1,5% com o produto interno bruto (PIB) brasileiro e gerar cerca de 5 milhões de empregos diretos e indiretos. Apresentando tendência crescente, a produção de aves é considerada um dos setores mais promissores do agronegócio atual (ABPA, 2015).

O contínuo crescimento da produção avícola resulta em atividades geradoras de contaminantes que podem estar vinculados ao crescente número de resíduos no sistema intensivo avícola. No caso da avicultura de corte, os resíduos produzidos nos galpões de criação compreendem a cama e as carcaças de animais mortos (OVIEDO, 2008).

O manejo correto das camas é muito importante, uma vez que, quando tratadas de maneira incorreta, podem poluir as águas superficiais e o lençol freático através de altas concentrações de nitrogênio, fósforo e potássio além de comprometer a qualidade do ar por emissões de gases como amônia (MEDA et al., 2011). Além disso, existe a possibilidade da contaminação da água e solos com micro-organismos de risco para a saúde pública (ROBERTS et al., 2013).

O ambiente dos aviários promove o desenvolvimento de diversas bactérias indesejáveis, como por exemplo, *Salmonella spp.*, *Campylobacter spp.*, *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens* e *Staphylococcus aureus* (WERLE et al., 2010). Desse modo, o conhecimento da condição sanitária das camas quando inseridas no ambiente avícola é de extrema importância, pois estes podem afetar diretamente os resultados zootécnicos (PEREIRA, 2009).

Roll et al. (2011), relatam que a utilização e reutilização da cama aviária são práticas comuns na avicultura brasileira, porém, requerem tratamentos seguros entre os lotes de frangos sadios, o que assegura condições sanitárias adequadas à produção.

Níveis crescentes na produção de frangos de corte têm causado aumento na demanda por substratos utilizados como cama de aviário. Por esta razão, a reutilização da cama durante a criação de frangos é uma opção importante na indústria avícola. Atualmente no Brasil pratica-se a reutilização, que dependendo da sua qualidade, manejo e volume, pode ocorrer por até 14 lotes consecutivos (ROLL ;DAI PRÁ; ROLL, 2011).

A reutilização da cama de aviário contribui grandiosamente para a redução do volume de resíduos a serem dispostos, minimizando assim, os eventuais impactos causados ao meio ambiente. No entanto, para reutilização de cama com segurança, esta deve ser submetida a tratamentos adequados através do uso de composições microbianas (WANGEN et al., 2013), tratamentos térmicos ou físicos (CHEN et al., 2015) e condicionadores (LOPES et al., 2013) que minimizem os riscos microbiológicos, garantindo a sustentabilidade ambiental (BROUCEK; CERMAK, 2015).

Na produção agroindustrial contemporânea os tratamentos de cama não são totalmente eficientes para promover e garantir esse conjunto de parâmetros e, por isso, proporcionam inúmeros problemas produtivos diretos e indiretos como perdas no desempenho das aves, comprometimento do coxim plantar, doenças e até irritação das mucosas (SHEPHERD; FAIRCHILD, 2010).

Com a crescente ascensão da produção nacional de frangos, maiores quantidades de cama aviária são produzidas levando à necessidade de se pensar em novas possibilidades de manejo e tratamentos desses materiais a fim de minimizar os impactos por ele causados.

Objetivou-se através desse estudo avaliar os efeitos de alguns tratamentos biológicos, químicos e físicos na qualidade microbiológica e físico química de camas de aviário reutilizadas (1, 2, 4, 6, 8, 10, 12) durante o vazio sanitário.

2. Objetivo geral

Avaliar a atuação de métodos físicos, químicos e biológicos sobre as condições microbiológicas de camas de aviário reutilizadas, procurando impedir ou minimizar problemas de ordem sanitária que possam prejudicar o desempenho das aves;

Determinar tratamentos de camas efetivos e viáveis na produção de frangos de corte.

2.1 Objetivos específicos

Estudar diferentes tratamentos de camas de aves, que sejam viáveis na produção de frangos de corte;

Avaliar a atuação de diferentes técnicas empregadas no controle microbiológico como adição de óxido de cálcio (CaO) enlonamento e enlonamento + (CaO);

Verificar o efeito de um modulador biológico comercial sobre as condições químicas e microbiológicas de amostras de camas reutilizadas.

3. Revisão bibliográfica

3.1 A cama na produção de frangos de corte

A cama de frango é uma mistura de material celulósico rica em carbono que inclui principalmente subprodutos agrícolas absorventes como maravalha, casca de café, casca de arroz, sabugo de milho triturado, capins e casca de amendoim (WILKINSON et al., 2011, TUYTTENS; VANHONACKERW; VERBEKE, 2014). O tipo e a quantidade de material utilizado podem variar conforme os custos dos materiais, disponibilidade do substrato, agronegócio local assim como as condições do sistema econômico global e regional (BERNHARD; FASINA, 2008).

O material utilizado como cama deve apresentar qualidades adequadas de modo a proporcionar conforto para os animais. Além de possibilitar um ambiente mais natural para as aves, a cama possui as seguintes funções: absorção da umidade eliminada pelas fezes e equipamentos, isolamento térmico e retenção de impacto ligado ao peso da ave evitando que ocorram lesões de patas e peito (COLLETT, 2012). Esse mesmo autor cita que um lote contendo em torno de 20,000 mil aves recebe em torno de 2,500 L de umidade por dia diretamente nesses materiais de cama.

A elevação na demanda de mercado por insumos tem associação direta com os maiores volumes de produtos gerados na cadeia produtiva. O acúmulo de resíduos provenientes das atividades produtivas são os principais responsáveis por impactos sanitários e ambientais quando tratados de maneira inadequada (RESENDE, 2010). Segundo Bolan et al. (2010), 1000 frangos aos 42 dias podem produzir entre 0,7-2 toneladas de resíduo de cama.

No sistema produtivo brasileiro, os materiais de cama podem ser reutilizados por até 12 vezes ou 600 dias nos aviários, desde que estejam livres de agentes patogênicos de notificação obrigatória (MAPA, 2013). Ao considerar uma produção média de 1,75 kg de cama por frango de corte produzido (SANTOS; LUCAS; SAKOMURA, 2005), com média de 2,5 kg de peso vivo, estima-se uma produção de 7,14 bilhões de kg de cama por ano.

Considerada um dos resíduos mais valorizados na avicultura de corte, a cama de frango recebe altas concentrações de excretas, penas, restos de ração, água e secreções à medida que as aves se desenvolvem. Dessa forma, uma microbiota

diversificada proveniente do trato digestório se estabelece na cama (LOPES et al., 2013) além da inclusão de micro-organismos previamente ambientais como fungos e bactérias.

Nos materiais de cama aviária encontram-se bactérias cujo potencial patogênico pode variar de acordo com as condições físico químicas do substrato, juntamente com a sanidade das aves e práticas de manejo ambiental (WAGENBERG et al., 2012). A maioria das bactérias presentes nestes materiais são anaeróbias facultativas, sendo a sua composição muito semelhante à composição fisiológica do íleo e ceco intestinal dos frangos, que é representada por aproximadamente 67% de *Lactobacillus spp.* 9% de *Clostridium spp.* 6,5% de *Streptococcus spp.* e 6,5% de *Enterococcus spp.* (FIORENTIN, 2005).

A falta de tratamento ou a incorreta disposição dos resíduos gerados podem resultar em excesso de nutrientes no meio ambiente, principalmente nitrogênio e fósforo. Esses compostos desaguam nos corpos hídricos através do processo de escoamento superficial, tendo como consequência a eutrofização. Esta é decorrente da queda da oxigenação do meio proveniente do crescimento exarcebado das algas. Além disso, quando mal tratados, os resíduos podem ser responsáveis pela contaminação do solo e disseminação de doenças e patógenos em alimentos (PALHARES; KUNZ, 2011).

As condições estabelecidas nas camas como: temperatura, umidade, atividade de água, pH, restos de pena e ração possibilitam o desenvolvimento e ação de micro-organismos (DUMAS et al., 2011) e através dessas características indicam-se tratamentos durante o vazio sanitário, os quais podem ser realizados de diversas formas nos materiais de cama através de variados procedimentos químicos, físicos e até mesmo biológicos.

3.2 Diferentes tratamentos dos materiais de cama aviária para posterior reutilização

3.2.1 Agentes alcalinizantes e acidificantes em camas de aviário

A utilização de produtos alcalinizantes nas suas variadas apresentações tem sido estudada

com o objetivo principal de manter o pH da cama acima de 7, condição que é prejudicial para os micro-organismos do meio (STRINGFELLOW et al., 2010). Todavia, o pH ideal para o desenvolvimento da maioria das bactérias de interesse encontram-se situados também nessa faixa alcalina entre 6 a 9 (SILVA, 2011).

Através do procedimento de alcalinização dos materiais de cama, Dai Prá et al. (2009) utilizando diferentes concentrações de cal virgem (0, 300, 600, 900 g/m²), verificaram redução do número mais provável (NMP) de bactérias como *Salmonella* spp e *Clostridium* spp nas camas, mesmo fazendo uso da mais baixa concentração do condicionador. Um dos mecanismos de ação do óxido de cálcio pode ser atribuído a capacidade de redução da umidade do meio e conseqüentemente alteração da atividade de água microbiana (< 0,6), dificultando a sobrevivência dos micro-organismos. Maguire et al. (2006) utilizaram 10% de CaO para cada 20% de material de cama, onde perceberam redução das bactérias totais de 793,000 para 6,500 UFC/mL, refletindo também na queda de outros micro-organismos, como *Salmonella* spp.

LOCH; OLIVEIRA; SILVA (2011) avaliando diversos agentes alcalinizantes sobre a qualidade da cama, entre eles o calcário, exaltaram que por ser um produto que altera o pH, a cal pode atuar melhorando a qualidade da cama, interferindo na umidade e conseqüentemente na sobrevivência dos microrganismos presentes, podendo diminuir a volatilização de amônia através da elevação do pH.

Da mesma maneira Ruiz et al. (2008) ao estudarem materiais de cama (por dois lotes) tratados com óxido de cálcio, perceberam elevação e manutenção do pH alcalino no primeiro até 10º dia em relação às camas não tratadas. Da mesma forma, quando foi aplicado óxido de cálcio nas camas aviárias os autores observaram diminuição considerável na contagem total de bactérias aeróbias.

Taxas de pH em níveis altamente alcalinos entre 12 e 13 são eficientes no controle da proliferação dos micro-organismos patogênicos em camas de aviário, como também na melhoria da qualidade do ambiente interno avícola. Através do uso de cal virgem ou cal hidratada pode ser obtido faixas de pH ideal nesse contexto, além destes produtos possuem baixo custo (DAI PRÁ et al., 2009). Além disso os efeitos da cal hidratada foram suficientes para alterar o pH de camas novas e reutilizadas como também apresentarem ação na redução da contagem de enterobactérias e mesófilos totais quando comparados à tratamentos controle

(SILVA et al., 2007), todavia estes mesmos autores consideraram o tratamento de enlonamento mais eficiente neste contexto.

A acidificação dos materiais de cama ocorre a partir do uso de condicionadores que causam efeito contrário a alcalinização, ou seja, redução do pH do meio. Este tipo de comportamento hidrogênionico pode interferir na volatilização de amônia para o ambiente deslocando o equilíbrio da relação NH_3 e NH_4 (GAY; KNOWLTON, 2009). Quando a umidade desses materiais encontram-se em faixas inferiores a 20%, a volatilização da amônia é reduzida devido a inativação da enzima urease, que é responsável pela decomposição do ácido úrico (RITZ; FAIRCHILD; LACY, 2009). Essa queda do pH cria um ambiente desfavorável para o desenvolvimento de patógenos humanos associados às aves, especialmente, *Campylobacter* e *Salmonella* (LINE; BAILEY, 2006).

A redução do pH é responsável por diminuir o número de bactérias e melhorar as condições ambientais no interior das instalações devido a menor presença de amônia que volatiliza em condições de alcalinidade (DAI PRÁ et al., 2009). Desse modo, a manutenção da acidez na cama auxilia no desenvolvimento de um ambiente benéfico para as aves. Este pode sofrer acidificação a partir de produtos a base de *Bacillus*, aluminossilicatos, sílica, gesso agrícola, bissulfato de sódio e sulfato de alumínio. Os acidificantes usuais e comumente utilizados no sistema avícola são, ácido sulfúrico (VICENTE et al., 2007), sulfato de alumínio, superfosfato simples (ROTHROCK et al., 2008), lignossulfato de sódio com ácidos fórmico e propiônico (GARRIDO et al., 2004).

O uso de produtos a base de alumínio (10%) resultou em reduções de populações *C. jejuni*, *E. coli* e *Clostridium/Eubacterium* (ROTHROCK et al., 2008). Similarmente, Gandhapudi et al. (2006), ao estudar os efeitos imediatos do alumínio na população fecal bacteriana das camas, presumiram que a redução do pH suprimiu o crescimento bacteriano.

Bissulfato de sódio foram utilizados por Line e Bailey (2006) em camas aviárias de granjas comerciais. Nesse estudo pode se observar uma leve redução na colonização de *Campylobacter*, quando se comparou as camas tratadas ou não com estes acidificantes. A ação do bissulfato de sódio em camas de frango de corte também foi estudada por Willians et al. (2012), onde os autores não observaram redução significativa na contagem de *Salmonella* spp. a partir das 32 amostras de camas testadas com esse condicionador na dose de 0,732 kg/m². Resultados

semelhantes foram encontrados por Bordignon (2013) que avaliou o efeito de diferentes tratamentos químicos sobre a qualidade de cama de frango e verificou que a cama tratada com sulfato de alumínio apresentou melhores resultados na redução do pH chegando ao valor de 3,89, que representa baixo índice de volatilização de amônia. Através do uso dessa substância observaram-se médias reduzidas de pH, amônia, contagem de bactérias totais e *E. coli*, quando comparados à camas não tratadas (POPE; CHERRY, 2000).

3.2.2 Métodos físicos e microbiológicos de controle patogênico nas camas de aviário

No Brasil denomina-se fermentação da cama o processo pelo qual a cama do aviário é umidificada e coberta com uma lona plástica por toda extensão do aviário durante o período entre 10 e 14 dias envolvendo a fase de vazío sanitário (SILVA, et al., 2007). Entretanto, esse termo não vem sendo empregado corretamente, pois através desse método é necessário conhecer todas as vias metabólicas anaeróbias e bacterianas que ocorrem nos materiais de cama.

Através da alteração e aumento da temperatura das camas de aviário, as bactérias envolvidas assim como os produtos finais desse processo, são capazes de acarretar redução da carga bacteriana patogênica local (MUNIZ et al., 2014). Esse tipo de tratamento pode ser realizado de diversas formas, visando alterar a temperatura do substrato.

Com relação às práticas associadas ao setor avícola, o efeito da atividade bacteriana e o período de ação destas nas camas varia entre 4 a 17 dias mesmo sem promover a estabilização da matéria. Todavia essa fase auxilia na redução dos micro-organismos através das atividades metabólicas e geração de calor (CHEN et al., 2013) nas camas.

Chen et al. (2013) utilizaram o método da compostagem da cama com intenção de elevação de temperatura dos substratos. No entanto, outros processos semelhantes podem ser utilizados como amontoamento profundo (KWAK; HUH; MCCASKEY, 2005), compostagem em leiras no galpão (MACKLIN; HESS; BILGILI, 2008), pasteurização interna da cama (LAVERGNE; STEPHENS; SCHIELLINGER,

2006), fermentação em leira e fermentação com lona em todo aviário (SILVA et al., 2007).

MACKLIN; HESS; BILGILI (2008), analisaram durante 7 dias pilhas de camas de dimensões de 1 x 1 x 1 m assim como camas não empilhadas, cuja eliminação completa de bactérias *Salmonella* spp. foi verificada nas camas empilhadas, enquanto permaneceram viáveis nas camas não empilhadas. Os autores atribuíram que as temperaturas internas de 50°C durante 1 a 2 dias são fundamentais para inativar bactérias, vírus e fungos nas pilhas da cama. No entanto, alguns micro-organismos têm capacidade de sobreviver ao calor, sugerindo possível adaptação de *Salmonella* spp., em camas de aviário reusadas (CHEN; WANG; JIANG, 2015).

Pesquisas atuais consideram também possíveis efeitos da radiação ultravioleta como tratamento físico sobre o esterco de aves. Através desse método foi observada redução de *Salmonella* spp. quando estas foram expostas a radiação por 80 minutos (ONI et al., 2013).

Silva et al. (2007) demonstraram que houve ação efetiva contra o desenvolvimento de enterobactérias a partir do tratamento feito em camas cobertas com lona por toda extensão do aviário. Em trabalho realizado por Resende (2010), não foi verificado o efeito bactericida do processo, todavia, foram analisados os parâmetros físicos e químicos durante a cobertura dos materiais de camas, sendo observadas concentrações superiores a 300 ppm de amônia nas camas cobertas com lona plástica, versus 60 ppm das camas descobertas. Isso sugere que provavelmente a amônia seja o principal composto envolvido em reduzir bactérias patogênicas na cama.

Métodos que impedem a sobrevivência microbiana através do uso de micro-organismos competitivos e benéficos vêm ganhando mais destaque no setor produtivo avícola. Roll et al. (2008) trabalhando com matrizes de corte com 58 semanas de idade, utilizaram um produto comercial no qual continha em sua composição cepas de *Bacillus subtilis* em dois níveis de dosagem, 2,5g/m² de cama e 5,0g/m² (dosagem recomendada), comparado com a cama sem o produto. A partir dos materiais tratados foi percebido um decréscimo na contagem de enterobactérias dos substratos e melhoria na qualidade da cama a partir da 4ª semana.

A microbiota é formada a partir do contato das aves com os micro-organismos presentes no ambiente externo (JURICOVA et al., 2012). A presença de uma cepa bacteriana com efeito benéfico em um dos primeiros ambientes de contato das aves,

como a cama, poderia direcionar a formação da microbiota endógena. Além disso, as bactérias inoculadas aceleram o processo de degradação dos dejetos e sua atividade pode inviabilizar tanto o desenvolvimento quanto a sobrevivência de bactérias patogênicas, favorecendo as características do sistema produtivo (ALIAKBARPOUR et al., 2012).

Micro-organismos bacilares testados como moduladores podem se manter viáveis nas camas de aviário após as 24 h de incubação e cultivo, sendo que nestas condições estas células se estabelecem e se multiplicam através das condições ambientais. Wadud et al. (2012) apontaram que a cama pode conter bactérias produtoras de esporos em sua microbiologia. Por outro lado, os resultados demonstraram que a utilização de micro-organismos probióticos administrados na ração, ou ainda que diretamente aplicados sobre a cama das aves, não garantem a interferência direta na composição microbiológica da cama, efeito que pode variar de acordo com o tipo de produto e concentração do inoculado.

A produção ou liberação de compostos com característica inibitória ou destrutiva de patógenos no meio é outra característica importante vinculada a alguns micro-organismos considerados probióticos, sendo que alguns destes compostos gerados são as bacteriocinas e os ácidos orgânicos. Estas moléculas de atividade antimicrobiana produzidas pelos *Bacillus spp.* podem se ligar especificamente a patógenos do meio, como também inibir a adesão destes através da produção de toxinas (PAN; YU, 2014). Esses produtos aumentam significativamente a capacidade dos micro-organismos benéficos competirem no meio em que estiverem (LEE; LILLEHOJ; SIRAGUSA, 2010).

Pesquisas ligadas com o mecanismo de ação do *Bacillus subtilis* em plantas exalta que o efeito *in situ* pela exposição de células vivas à estes micro-organismos, favorece aspectos de crescimento e/ou o biocontrole (HAMMAMI et al., 2009). Esta espécie bacilar é também responsável pela produção de compostos de lipopeptídeos da família das surfactinas e fengicinas (ONGENA et al., 2007), favorecendo expressões de defesa e controle biológico.

Em estudos direcionados para a investigação da microbiota intestinal de frangos de corte, JAYARAMAN et al. (2013) testou particularmente a suplementação dietética com uma cepa do *Bacillus subtilis* PB6 a qual foi responsável pela melhoria da saúde intestinal das aves. Os animais foram desafiados com *Clostridium perfringens* onde este grupo apresentou escores de lesão intestinal mais acentuados

quando comparados aos grupos controle e tratados com os bacillus. A ação desse tipo de Bacillus foi atribuída a produção algumas substâncias antibacterianas como fatores anticlostridianos (TEO; TAN, 2006).

A ação benéfica dos *Bacillus subtilis* em camas de aviário foi relacionada com a produção de enzimas proteases responsáveis pela redução na contagem de enterobactérias às 24 h de contato. Também foi verificado uma ação preventiva desse micro-organismo na ocorrência de celulites em frangos de corte quando expostos à cepas de *E. Coli* (BRITO; TAGLIARI, 2007).

LEI et al. (2015) estudaram a ação do *Bacillus amyloliquefaciens* como probiótico em nível intestinal. Foi constatado redução dos níveis bacterianos cecais vinculados a espécie *Escherichia Coli* quando as aves foram suplementadas com as concentrações bacilares aos 21 e 42 dias. Através das avaliações morfológicas e da atividade microbiana cecal a pesquisa sugeriu que os mecanismos envolvidos na ação do Bacillus podem decorrer da modulação positiva os quais favorecem a saúde e o desenvolvimento maior dos vilos e criptas.

Resultados indicam redução na contagem de *Salmonella spp.* nas fezes de aves desafiadas com *Salmonella Minnesota* aos 14 dias de idade com a utilização de probiótico formado por complexos bacterianos mistos (*Lactobacillus spp.*, *Enterococcus faecium*, *Streptococcus thermophilus* e *Bifidobacterium bifidum*) e inoculado em aves (LOURENÇO et al., 2013).

Em pesquisas de cunho sanitário foram avaliados títulos de anticorpos para doença de Newcastle, percentual de linfócitos T, características de órgãos linfóides assim como também a presença de bactérias provenientes do sistema digestivo em fezes de frangos de corte. Estes animais foram suplementados com *Lactobacillus spp.*, *Bacillus cereus* e polissacarídeos de *Astragalus*, onde foi exaltado uma melhora significativa nos parâmetros avaliados e uma consistente redução na contagem de *Escherichia coli* nas fezes dos lotes tratados com os complexos bacterianos (LI; ZHAO; WANG, 2009).

Estudos descrevem que as bactérias da espécie *Bacillus licheniformis* são produtoras de componentes com grande importância na área da biotecnologia e na indústria da fermentação como amilases, antibióticos, proteases e químicos específicos possuindo baixo potencial para a saúde animal e sem efeitos adversos ambientais (HE, et al. 2006). A produção de compostos antimicrobianos incluem predominantemente peptideos os quais são sintetizados ribossomalmente ou não

(CAETANO, et al. 2011). A bacitracina foi o primeiro antibiótico peptídico de síntese não ribossomal derivado de culturas de *B. licheniformis* e tem sido amplamente aplicado nas áreas humanas e de veterinária, podendo promover atividade antibacteriana no meio (ABRIOUEL, et al. 2011).

4. Capítulo 1

Avaliações da efetividade de tratamentos químicos e físicos na redução dos níveis bacterianos patogênicos em camas de aviário

4.1 Introdução

A cama aviária pode ser renovada a cada ciclo ou reutilizada por vários lotes de frangos (CHINIVASAGAM; TRAN; BLACKALL, 2012, ROLL et al., 2011). A reutilização é uma prática adotada para diminuir custos de produção e também para aumentar a quantidade de nutrientes presentes no substrato para posterior utilização como fertilizante na agricultura reduzindo desta forma o impacto ambiental da avicultura (TERZICH et al., 2000).

Na indústria avícola brasileira os métodos mais utilizados para o tratamento de cama em aviários de frango de corte durante o intervalo sanitário são o enlonação e o uso do óxido de cálcio (CaO). O custo para adoção de cada uma destas práticas na avicultura é relativamente baixo em decorrência do benefício que apresentam, ficando os valores na faixa de U\$ 150,00 para um galpão padrão de 1200 m² (LOPES et al., 2013). No entanto, a sua reutilização em lotes sucessivos pode dificultar a desinfecção do ambiente alterando a qualidade microbiológica do sistema de produção (LOPES ASSIS; DIAS LUNS, CURY, 2013). Este fator pode contribuir para a prevalência de micro-organismos no ambiente, como a enterobactérias, *Staphylococcus* spp., *Campylobacter* spp., *Clostridium perfringens* (STRINGFELLOW et al., 2010, ROLL et al., 2011). Em estudo realizado por KWAK; HUH; MCCASKEY, (2005), foram encontrados 31 gêneros distintos de bactérias na cama aviária, sendo 82% Gram-positivas, principalmente *Lactobacillus* sp. e *Salinococcus* sp. e alguns *Clostridium* sp., *Staphylococcus* sp. e *Bordetella* sp.

Em decorrência disso, diferentes práticas de manejo têm sido utilizadas para reduzir a umidade e os níveis de patógenos na cama aviária (COOK et al., 2012). Substâncias como óxido de cálcio (LOPES et al., 2013), hidróxido de cálcio (LUCCA et al., 2012), gesso agrícola (SANTOS; ESCOSTEGUY; RODRIGUES, 2010), sulfato de alumínio (FERREIRA; OLIVEIRA; TRALDI, 2004) e *Bacillus subtilis* (ROLL et al., 2008) foram adicionadas na cama a fim de melhorar sua qualidade microbiológica.

Em grande parte do Brasil, devido à facilidade de manejo, o uso de lona cobrindo a cama em toda a extensão do aviário é o método mais utilizado em aviários com vão livre. De forma semelhante, o uso de cal virgem tem sido muito utilizado principalmente em galpões com postes centrais, pois provoca a redução da atividade de água (Aw) e a elevação do pH que são dois aspectos importantes no controle de patógenos presentes na cama (LOPES et al., 2013). Porém para que o

manejo da cama seja realizado corretamente é necessário retirar as incrustações e queimar as penas antes e aplicar os tratamentos e permitir um período de vazio sanitário de no mínimo 15 dias entre lotes (DAI PRÁ; ROLL, 2012).

O objetivo do trabalho foi estudar a eficácia de diferentes tratamentos utilizados em camas de aviário (maravalha) visando a redução de bactérias patogênicas.

4.2 Material e métodos

4.2.1 Local e período experimental

O estudo foi conduzido logo após a retirada de 384 aves da linhagem Cobb do Laboratório de Ensino e Experimentação Zootécnica Professor Renato Rodrigues Peixoto, do Departamento de Zootecnia/ FAEM/ UFPEL, onde estes animais permaneceram por um lote ou 42 dias.

As análises microbiológicas foram realizadas no Laboratório de Microbiologia do Centro de Biotecnologia UFPEL.

4.2.2 Manejo das aves e da cama

Previamente ao início do experimento as aves foram aleatoriamente distribuídas em 32 boxes experimentais com medidas de 1 m² cada, com densidade de 12 aves por m². Os boxes continham 10 cm de maravalha. Após a retirada das aves as amostras foram removidas para o controle inicial. Foi realizado o enlonação com lona preta cobrindo toda a superfície do boxe para evitar a entrada de oxigênio e facilitar a fermentação. Nesse processo foram aspergidos 100 mL de água para umedecer o meio e facilitar o processo fermentativo e permanecendo assim por 12 dias consecutivos.

4.2.3 Delineamento experimental

O delineamento foi totalmente casualizado, onde foram aplicados 4 tratamentos 8 repetições. Os tratamentos foram aplicados às unidades experimentais após a saída

das aves, durante o vazio sanitário, e teve duração de 12 dias, podendo ser divididos em:

CT) Sem tratamento (controle),

CV) CaO (300g m^{-2}),

EN) Enlonamento,

CN) Enlonamento + CaO (300g m^{-2}).

No método de enlonamento + CaO foram incorporadas 300 g de CaO por metro quadrado de cama que foram misturadas com a cama e logo cobertas com a lona.

4.2.4 Coleta e acondicionamento das amostras

Foram realizadas três coletas durante o vazio sanitário, sendo a primeira, após a retirada das aves (dia zero) e a segunda e terceira coletas no 6º e 12º dias, respectivamente. Foram coletadas alíquotas individuais em cinco pontos eqüidistantes 1 m entre si, quatro deles localizados em cada canto e o quinto, no centro de cada unidade experimental correspondente a um tratamento. Os mesmos pontos foram marcados e medidos para os tratamentos com enlonamento, porém nessa situação era realizado um pequeno corte (5 cm) na lona para coleta da amostra e posterior fechamento com uma fita adesiva preta multiuso. As amostras (288) foram acondicionadas em sacos plásticos estéril nasco em uma temperatura de 4 °C até posterior e rápida manipulação.

4.2.5 Registo da temperatura

A aferição da temperatura interna das camas foi realizada durante o experimento nos três períodos de coleta das amostras (0, 6 e 12 dias). A temperatura interna da cama era verificada com um termômetro digital de haste metálica ($\pm 0,5^\circ\text{C}$ COTERM 180) com haste de 0,17m., colocado durante 4 minutos no interior da cama a quatro cm da superfície. Nas camas aviárias, cujos tratamentos continham lona, a aferição da temperatura era feita com a mesma haste metálica

através de uma abertura de 5 cm no centro da lona e no centro do boxe. Logo após a leitura da temperatura a lona era vedada com uma fita adesiva.

4.2.6 Análises microbiológicas

Para realização das análises microbiológicas, as amostras de cama eram retiradas de cinco pontos internos dos boxes, sendo posteriormente homogeneizadas e acondicionadas, formando um *pool* de amostra por tratamento. Para o processamento de cada amostra, uma alíquota de 1g foi utilizada para contagem microbiana. Essa alíquota de 1 g foi diluída em 9 mL de água destilada estéril e a partir desta, 100µL foram semeados na superfície do meio de cultura com uma alça de Drigalski em placas de Petri contendo as diluições seriadas de 10^{-7} no meio *Brain Heart Infusion Agar* (BHI), 10^{-6} MacConkey (Acumedia®) e 10^{-6} no meio Chapman (Acumedia®). As alíquotas foram semeadas em triplicata nos três meios de culturas e incubadas em estufa bacteriana à 37°C por 24h, após esse período, era realizada a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC/mL). Para avaliar o número total de bactérias foi considerado o crescimento no meio BHI, para a contagem de *Staphylococcus* no meio Chapman e para Enterobacteriaceae o crescimento no meio MacConkey.

4.2.7 Análise estatística

A análise estatística dos resultados foi realizada pelo procedimento análise de medidas repetidas, obtendo-se as médias dos efeitos principais e das interações. As comparações das médias entre tratamentos para a proporção na redução bacteriana em cada um dos períodos avaliados foram realizadas pelo teste Tukey Kramer a 5% de significância.

4.4 Resultados e discussão

4.4.1 Microbiologia

Na tabela 1, pode ser observado que, independente do meio de cultivo utilizado houve redução significativa ($P < 0,05$) no número de bactérias da cama com a aplicação dos tratamentos ao final do período de vazio sanitário comparado ao grupo controle, exceto o enlonamento da cama para as bactérias que crescem em meio de cultivo *Staphylococcus* spp.

Tabela 1: Redução média da contagem bacteriana em meios de cultura e sua interação com diferentes tratamentos em cama aviária durante o vazio sanitário.

Meios de cultura						
Bactérias Totais						
Tratamentos	0		6		12	
	dias					
	Log10 ⁷ UFC/g (contagem inicial)	Redução proporção	Log10 ⁷ UFC/g	Redução proporção	Log10 ⁷ UFC/g	Redução proporção
Controle	2,463A	-	2,45 ^a	0,0024b	2,41A	0,021b
Enlonamento	2,34A	-	2,147 ^a	0,09ab	1,82B	0,23a
Enlonamento, CaO*	2,30A	-	1,92B	0,16a	1,5C	0,34a
CaO*	2,208A	-	1,89AB	0,14a	1,49BC	0,32a
Staphylococcus						
	0		6		12	
	dias					
	Log10 ⁶ UFC/g (contagem inicial)	Redução proporção	Log10 ⁶ UFC/g	Redução proporção	Log10 ⁶ UFC/g	Redução proporção
Controle	1,83A	-	1,87 ^a	-0,024b	1,64A	0,12b
Enlonamento	1,87A	-	1,67AB	0,11ab	1,33B	0,29b
Enlonamento, CaO*	1,63A	-	1,26B	0,23a	0,52C	0,70a
CaO*	1,47A	-	0,98B	0,33a	0,36C	0,75a
Enterobacteriaceae						
	0		6		12	
	dias					
	Log10 ⁶ UFC/g (contagem inicial)	Redução proporção	Log10 ⁶ UFC/g	Redução proporção	Log10 ⁶ UFC/g	Redução proporção
Controle	1,81A	-	1,79A	0,03c	1,75A	0,07b
Enlonamento	1,63A	-	1,19B	0,27bc	0,19C	0,87a
Enlonamento, CaO*	1,74A	-	0,65B	0,72a	0,33B	0,92a
CaO*	1,93A	-	0,95B	0,51ab	0,33C	0,84a

Médias seguidas por letras minúsculas diferentes na mesma coluna e por letras maiúsculas na mesma linha diferem entre si pelo teste Tukey Kramer a 5%. *Óxido de cálcio (300 g/m²).

O método aplicação isolada de CaO ou em combinação com o enlonamento apresentaram maior redução proporcional de unidades logarítmicas de UFC, comparados a utilização de apenas enlonamento sobre a cama aviária tanto nos

meios de cultura BHI (32%, 34% e 23%, respectivamente) como Chapman (75%, 70% e 29%, respectivamente) aos 12 dias de tratamento.

Esta redução no número de bactérias pode ser explicada possivelmente em decorrência da combinação de CaO com a água, que forma Ca(OH)_2 , promovendo a redução do teor de umidade e da atividade de água na cama aviária (FERREIRA; OLIVEIRA; TRALDI, 2004, AHN; RICHARD; GLANVILLE, 2008). Corroborando com as afirmações, Dai Prá et al. (2009) testaram diferentes doses de CaO em cama aviária e verificaram que a partir de 300 g m^{-2} de CaO, houve uma redução significativa de 2,75% na atividade de água o que colaborou para a redução da *Salmonella* spp. e do *Clostridium* spp. Por outro lado o CaO promove um aumento do pH da cama um dia após a aplicação com um efeito residual que pode durar até dez dias após a mistura na cama (RUIZ et al., 2008).

No entanto, a menor eficácia do enlonação sem a adição de CaO pode ser explicada pela presença da cobertura de lona que pode ter auxiliado na redução da perda de umidade para o meio, favorecendo a manutenção da atividade microbiana na cama aviária, concordando com Macklin et al. (2006) que não verificaram diferenças significativas na maioria dos tratamentos com lonas entre o início e o final do período avaliado, quanto ao teor de umidade da cama aviária.

No mesmo período, com exceção do grupo controle, pode ser observado que todos os tratamentos atingiram mais de 84% de redução em unidade logarítmica na contagem de UFC, no meio de cultura MacConkey. De forma similar, Lopes et al. (2013) aplicaram 300 g m^{-2} de óxido de cálcio em diferentes tipos de cama aviária durante o vazio sanitário e verificaram redução de 92.1% na contagem de UFC nos meios de cultura MacConkey. A redução das enterobactérias pelo método enlonação pode ter ocorrido possivelmente devido ao efeito da amônia produzido pela cama aviária em decomposição. Hahn et al. (2012) avaliando a persistência de patógenos em pilhas de compostagem de cama aviária verificaram um acúmulo de NH_3 próximo à superfície de contato com o polietileno utilizado como cobertura. O forte poder germicida da amônia pode inibir a atividade microbiana (KWAK et al., 2005; EL KADER et al., 2007), o que pode explicar a redução significativa no número de bactérias da cama aviária independente do meio de cultivo utilizado.

4.4.2 Temperatura interna

Com relação à temperatura da cama aviária durante a aplicação dos métodos de tratamento enlonamento e enlonamento em combinação com CaO, pode ser observado uma variação de 24,4 a 34,7 °C e 24,9 a 36,4 °C no decorrer do vazio sanitário, respectivamente. Embora tenha havido redução de bactérias totais, estafilococcus e enterobactérias ao final do vazio sanitário, a presença de outros micro-organismos decompositores da cama aviária não avaliados nesse estudo, podem ter contribuído para o aumento das temperaturas no decorrer do período. Entretanto, comparando-se aos estudos de Kwak et al. (2005) e MACKLIN; HESS; BILGILI (2008), que verificaram durante o vazio sanitário, temperaturas de 62 °C e 50 °C, respectivamente, sugere-se que a altura de 0,10m de cama aviária não possibilitou o desenvolvimento adequado de micro-organismos termófilos na biomassa.

A menor temperatura alcançada no presente experimento pode ser explicada pelo fato de que os outros autores realizaram enlonamento de leiras com maior volume de substrato, utilizando as dimensões 1 m x 1,2 m x 1 m e 1,5 m x 0,9 m x 0,7 m, respectivamente. Valente et al. (2009) afirmam que uma altura mínima de 0,80 m deve ser respeitada, abaixo da qual não existem condições adequadas para a formação e manutenção da temperatura na cama em virtude da ação de bactérias termófilas.

Diferentemente, verifica-se na figura 1, que as temperaturas do tratamento controle e do CaO mativeram-se praticamente constantes a partir do sexto dia de vazio sanitário. Os resultados demonstram a importância da umidade e da atividade de água para o crescimento e desenvolvimento de micro-organismos na cama aviária. Hills et al. (1997) afirmam que com a diminuição da disponibilidade de água, o microrganismo necessitará de maior energia para retirá-la da cama, de forma a utilizá-la no seu metabolismo, dificultando ou impedindo sua sobrevivência.

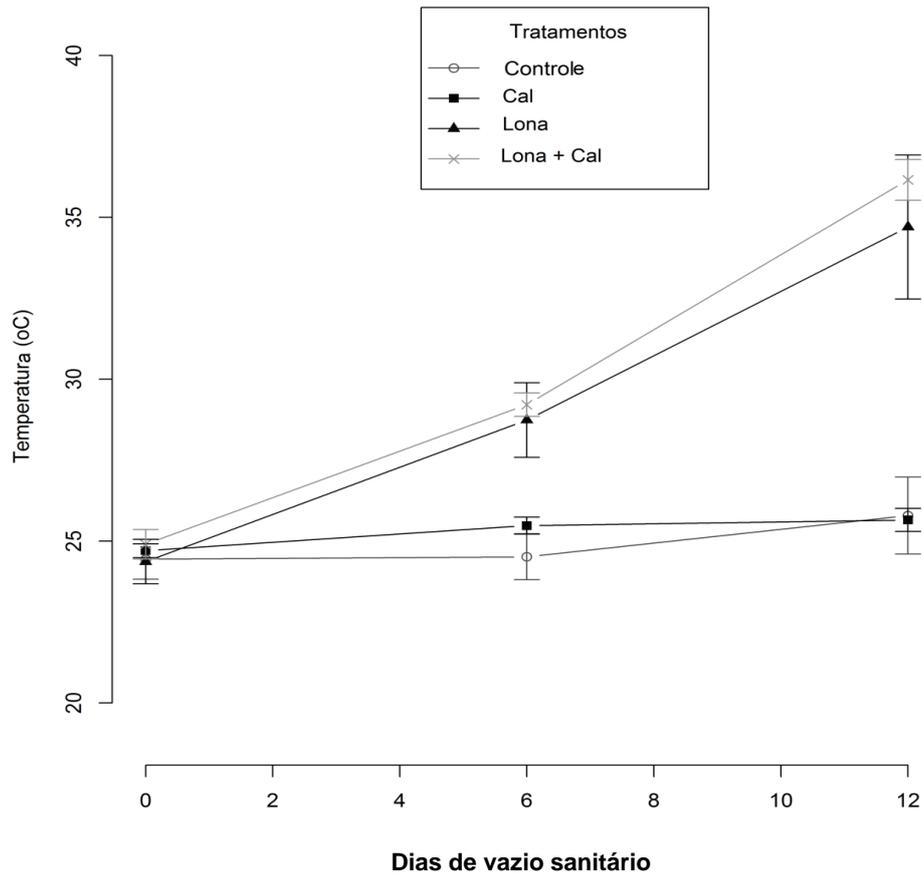


Figura 1 – comportamento da temperatura interna dos materiais de cama de aviário

4.5 Conclusões

A aplicação de cal isolada ou em combinação com enlonação apresenta melhores efeitos sobre as Enterobactereaceas em comparação com o enlonação da cama.

Tanto a aplicação de CaO, o enlonação ou a combinação destes dois tratamentos são eficientes em reduzir pelo menos 84% a contagem logarítmica de UFC de Enterobactereaceas ao final de 12 dias de vazio sanitário

Dentre os tratamentos estudados das camas aviárias durante o vazio sanitário recomenda-se a utilização de cal (CaO) isoladamente por ser uma técnica bastante eficiente no controle dos principais patógenos testados, apresentando baixo custo, alta disponibilidade, além de ser de fácil aplicabilidade.

5. Capítulo 2

Efeito de um modulador biológico na redução da carga bacteriana e características químicas de camas reutilizadas de aviário

5.1 Introdução

Apresentando tendência crescente, a produção de aves é considerada um dos setores mais promissores do agronegócio atual. A produção média de carne de frangos nos últimos foi em torno de 12,714 milhões ton no Brasil. Destinando 32,7% da produção total para o mercado externo, o Brasil segue como maior exportador de carne de frango no mundo produzindo 4,304 mil ton e agregando em torno de 1,5 no PIB anualmente (ABPA, 2015).

De acordo com o contínuo crescimento avícola brasileiro, estima-se maior demanda por substratos utilizados como cama aviária, assim como elevação na produção dos resíduos e outros compostos gerados nesse sistema (UBA, 2013). Os materiais de cama aviária são dispostos por todo galpão e podem ser reutilizados por até 14 lotes consecutivos nos aviários brasileiros (ROLL et al., 2011). A partir da criação intensiva de frangos de corte e consecutivas reutilizações das camas aviárias, ocorre elevação e acúmulo de elementos provenientes das excretas nesses materiais.

Camas reutilizadas oferecem condições para o desenvolvimento de populações de micro-organismos com possível potencial patogênico, como por exemplo, *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens* e *Staphylococcus aureus* (WERLE et al., 2010, COOK et al, 2012). Isto pode ser considerado indesejável por apresentar grande capacidade de manutenção e disseminação micro-organismos patogênicos no meio, além de serem potenciais contaminantes para a água e solo (ROBERTS et al., 2013).

Além da contaminação por patógenos, o incorreto manejo e disposição desses materiais no meio ambiente podem poluir as águas superficiais e lençóis freáticos com as altas concentrações de nitrogênio, fósforo e potássio como também comprometer a qualidade do ar por emissões de gases como amônia (MEDA et al., 2011).

No entanto, para que esta prática seja considerada segura e eficiente os materiais de cama devem ser submetidos a tratamentos que auxiliem na redução da carga microbiana patogênica e melhorem suas características físico-químicas (LOPES et al., 2013). Durante o vazio sanitário produtos comerciais têm sido utilizados na indústria com a finalidade de desinfecção ambiental e alguns estudos comprovam a sua eficácia bem como o seu modo de ação (LOPES et al., 2015;

KWAK; HUH; MCCASKEY, 2005, LAVERGNE; STEPHENS; SCHIELLINGER, 2006, MACKLIN; HESS; BILGILI (2008).

Produtos biológicos tais como o modulador avaliado no presente estudo, podem demonstrar alguns benefícios impedindo o desenvolvimento de bactérias patogênicas (ROLL et al., 2008). Através da ação desse complexo bacteriano espera-se favorecer o crescimento de comunidades bacterianas positivas no ambiente aviário, auxiliando no melhor desempenho e sanidade das aves. Outras vantagens podem ser percebidas como de fácil aplicação no ambiente em que as aves se encontram, ausência de produção de pó assim como menor volume de aplicação ao comparar com outros materiais de tratamento de cama.

Através do presente estudo, objetivou-se avaliar *in vitro* o efeito de um modulador à base de micro-organismos vivos frente ao crescimento de bactérias Gram positivos e Gram negativos como grupos da família *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus* spp., bem como bactérias totais com possível potencial de patogenicidade.

5.2 Material e métodos

5.2.1 Local e período da experimentação

O experimento foi realizado entre julho de 2014 a março de 2015, no laboratório de Microbiologia do Centro de Desenvolvimento Tecnológico CDTec/UFPEL. As análises químicas das amostras de cama de aviário foram realizadas no laboratório de Nutrição Animal do Departamento de Zootecnia da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel FAEM/UFPEL.

5.2.2 Experimentação piloto

Previamente ao início do experimento com as camas reutilizadas de aviário foram realizados experimentos pilotos para caracterização de parâmetros microbiológicos do modulador utilizado. Testes de resistência e capacidade de multiplicação microbiana também foram avaliados em amostras de cama previamente selecionadas. Os micro-organismos foram cultivados a partir de meios de cultivo específico e semeados em cama de aviário estéreis com ou sem a

presença de fezes. As camas de aviário eram formadas por maravalha (partículas do beneficiamento de *Pinus elliotti*) e casca de arroz (50% de cada) e que foram uadas 2, 4, 6, 8, 10 e 12 vezes em aviários de frangos de corte. Este material era pesado sempre na mesma balança de precisão eletrônica, sendo que cada saco continha 11 g de material de cama aviária. Nestes mesmos materiais foram inoculados concentrações de bactérias patogênicas conhecidas, onde a pureza e viabilidade de todas as cepas bacterianas foram conferidas. Também foram realizados testes bioquímicos específicos (QUINN et al., 1994) e técnica de coloração de Gram para cada cepa bacteriana previamente selecionada.

5.2.3 Grupos controle

Previamente ao início do experimento foi realizada a contagem inicial das UFC em todas as amostras de camas (ao total 432 amostras), as quais foram reutilizadas por até 12 vezes durante o ciclo produtivo de frangos de corte. Estas amostras eram provenientes de uma empresa integradora avícola presente no Estado do Rio Grande do Sul. O grupo controle constou das quantificações de colônias bacterianas de interesse, semeadas a partir desses materiais formados a partir dos diferentes ciclos de criação de frangos de corte.

5.2.4 Modulador Biológico

O modulador biológico avaliado no presente estudo é um complexo de bactérias bacilares com possíveis ações na transformação da matéria orgânica, assim como na redução de micro-organismos patogênicos presentes no ambiente avícola. Este produto é formado pelos seguintes micro-organismos: *Bacillus subtilis* ($1,25 \times 10^8$ UFC/g), *Bacillus licheniformis* ($1,25 \times 10^8$ UFC/g), *Bacillus amyloliquefaciens* ($1,25 \times 10^8$ UFC/g), *Bacillus cereus* ($1,25 \times 10^8$ UFC/g), *Lactococcus lactis* ($1,25 \times 10^8$ UFC/g), acrescidos de cloreto de sódio (5 %), bicarbonato de sódio (10 %) e farelo de trigo (85 % veículo).

5.2.5 Diluições

Durante o desenvolvimento do experimento, foram retiradas alíquotas de todas as amostras para posterior quantificação e contagem do número de bactérias, utilizando meios de cultivo para contagem de bactérias totais, enterobactérias, e *Staphylococcus* spp. Primeiramente foi retirada 1 g de alíquota que foi diluída em 9 mL de solução salina estéril, para posteriores diluições seriadas. De cada diluição (10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7}) foram utilizados 100 μ para sementeiras em triplicata com auxílio de uma alça de Drigalski.

5.2.6 Tratamentos e delineamento experimental

As amostras controle e tratadas com o modulador foram incubadas em estufa a 37°C por 24, 48 e 72 h, períodos em que eram retiradas as amostras para posterior sementeira, análises microbiológicas e testes físico químicos. Foram aplicados nas camas de aviário diferentes doses do modulador biológico sendo 2, 4 e 8 g equivalentes a 2,77, 3,07, 3,38 log₁₀ UFC g⁻¹/cama do modulador biológico. Para a detecção e contagem de *Staphylococcus* spp. foi utilizado um meio seletivo para estafilococos e detecção de *S. aureus*, sendo as colônias quantificados a partir do meio de cultivo ágar Chapman. Para crescimento de bactérias do gênero *Salmonella* spp., *Escherichia coli* e enterobactérias, foi realizado a sementeira através da contagem das UFC presentes nos meios diferencial e seletivo BD MacConkey agar. Já para quantificação das bactérias totais foi utilizado o meio BHI (Brain Heart Infusion).

O delineamento experimental foi completamente casualizado em arranjo fatorial 4 x 6, sendo quatro doses de modulador biológico (0, 2, 4, e 8 g) e seis diferentes reusos (2, 4, 6, 8, 10 e 12), totalizando 24 tratamentos para cada grupo bacteriano testado. Após realizar ANOVA foi utilizado o procedimento “LSM- least squares means” sendo a comparação das médias ajustadas através do teste Tukey a 5% de probabilidade. As análises estatísticas foram realizadas pelo programa R (R CORE TEAM, 2015).

5.2.7 Análises químicas

5.2.7.1 pH

A quantificação do pH foi realizada através do método de Benabdeljelil; Ayachi, (1996) em triplicata para todas as amostras de camas novas e usadas, tratadas ou não com o modulador.

5.2.7.2 Amônia

A volatilização de amônia foi determinada com base na adaptação da metodologia proposta por Babko; Pilipenko, (1976). Utilizando frascos de 250 cm³, foram colocados 25 gramas de cada amostra de cama usada juntamente com um béquer contendo ácido bórico 2% (m/v) e indicadores, sendo a seguir tampado. O frasco foi mantido em incubação por 16 h, a uma temperatura constante de 30°C. A solução fixadora de amônia foi titulada com ácido sulfúrico 0,05N (HERNANDES; CAZETTA, 2001). Para coletar a amônia exalada pela amostra, foi utilizado 10 mL de solução de ácido bórico 20 g/100 mL, através do método de Kjeldhal por ser a comumente usado nas determinações de amônia pelo (AOAC, 1970).

5.3 Resultados e discussão

5.3.1 Microbiologia

5.3.1.1 Bactérias totais

Conforme pode ser observado na tabela 2, o modulador biológico na dose de 8g reduziu significativamente o número de bactérias totais nos diferentes reusos de cama. Houve ação inibitória do modulador contra as bactérias totais nas 24h de análise para as amostras de cama testadas (exceto 10 reusos). No período de 48h, a inclusão das doses 4g e 8g do modulador demonstrou efeito no controle do crescimento bacteriano total do meio. Maiores concentrações do modulador influenciaram na atividade dos micro-organismos presentes nas camas, cujos fatores individuais e ambientais podem ter interferido na inibição do crescimento bacteriano (CHINIVASAGAM et al., 2010). Já em camas com doze reusos a resposta antibacteriana ocorreu a partir de 4g de uso do modulador.

O efeito antibacteriano a partir de doses menores do modulador (2g) foi constatado em amostras com oito e doze reusos as 72h de incubação. A capacidade de desenvolvimento bacteriano em camas de aviário pode ocorrer a partir da união dos micro-organismos em comunidades bacilares, além dessas, também foi observada a possibilidade de preservação dos micro-organismos de interesse (DRESCHER et al., 2014) em ambientes celulósicos, como a cama de aviário.

Tabela 2. Contagem de bactérias totais (log UFC/g) em diferentes períodos de incubação de camas de aviário reutilizadas por até 12 vezes e submetidas a diferentes doses do modulador biológico

Reutilização da cama						
24 horas incubação						
Dose/g	2	4	6	8	10	12
0	7,73 Ba	7,09 Ba	8,42Ca	8,13 Ba	8,21 Ba	8,46 Ba
2	7,76 Ba	6,30 Ba	7,21 Bca	7,43 Ba	7,15 Ba	7,72 Ba
4	7,34 Ba	7,23 Ba	6,48 Ba	6,72 Ba	7,23 Ba	7,51 Ba
8	0 Ab	0 Ab	2,20 Aa	1,00 Aab	2,38 Ba	2,00 Aa
48 horas incubação						
Dose	2	4	6	8	10	12
0	7,99 Ba	3,66 Bb	8,45Ca	8,35 Ba	8,18 Ba	8,46Ba
2	7,45 Ba	6,82 Ca	6,97 Bca	6,87 Ba	6,86 Ba	7,63 Ba
4	6,83 Ba	6,75 Ca	5,35 Ba	6,25 Aba	6,64 Ba	2,10 Aa
8	3,62 Aab	0 Ac	2,00 Aabc	4,18 Aa	1,00 Abc	1,00 Ab
72 horas incubação						
Dose	2	4	6	8	10	12
0	7,79 Ba	7,72Ba	8,25 Ba	8,03 Ba	8,27 Ca	7,98 Ca
2	7,21 Ba	6,65 Ba	6,38 Ba	0 Ab	6,75 Bca	2,10 Ab
4	6,25 Ba	1,66 Abc	5,49 Ba	0 Ac	4,49 Bab	0 Ac
8	0,00 Aa	1,00 Aa	0 Aa	0 Aa	2,49 Aa	0 Aa

Letras maiúsculas nas colunas mostram diferenças entre doses. Letras minúsculas nas linhas mostram diferenças entre reusos. As contagens "0" correspondem a uma concentração de $\log 10^4$ UFC/g.

Valores de Probabilidades (24h de incubação) Dose= $P<0,001$, Reuso = $P<0,05$, Interação DoseXReuso $P=0,1047$

Valores de Probabilidades (48h de incubação) Dose= $P<0,001$, Reuso= $P<0,001$, Interação DoseXReuso = $P<0,001$

Valores de Probabilidades (72h de incubação) Dose= $P<0,001$, Reuso= $P<0,001$, Interação DoseXReuso = $P<0,001$

Em camas com dois, quatro e seis reutilizações somente as doses 4g e 8g foram efetivas em reduzir o crescimento das bactérias totais. Puderam ser verificadas interações significativas entre a dose do modulador e os reusos das camas, tanto as 48h quanto as 72h de incubação. Isto indica que a ação do modulador biológico depende do número de reutilizações da cama e do tempo de inoculação nas camas de aviário que vai permitir um período maior de ação do mesmo nos substratos.

Visto que poucos são os dados disponíveis na literatura relatando a utilização de micro-organismos benéficos na cama, as justificativas dos resultados podem estar ligadas às atividade do complexo bacilar testado como liberação de substâncias antibacterianas e competição por substratos no meio além das ótimas condições de crescimento microbiano no meio como alto teor de material orgânico, umidade adequada,

5.3.1.2 Enterobactérias

Na tabela 3 pode ser observada redução significativa no grupo das enterobactérias com o uso de 8g do modulador nas 24h de incubação na maiorias amostras de cama.

Tabela 3. Contagem de enterobactérias (log UFC/g) em diferentes períodos de incubação de camas de aviário reutilizadas por até 12 vezes e submetidas a diferentes doses do modulador biológico

Reutilização da cama						
24 horas incubação						
Dose/g	2	4	6	8	10	12
0	7,17 Ba	1,82Aa	7,91 Ba	7,36 Ba	7,27 Ba	7,96 Ba
2	7,27 Ba	6,13 Bca	6,54 Ba	6,33 Ba	6,88 Ba	7,37 Ba
4	6,81 Ba	7,34 Ca	6,51 Ba	6,25 Ba	6,86 Ba	7,33 Ba
8	0 Ab	3,64 Ab	2,00 Ab	1,00 Ab	0,00 Ab	1,00 Ab
48 horas incubação						
Dose	2	4	6	8	10	12
0	7,57 Bab	8,03 Cab	7,72Cab	7,77 Cab	6,80 Bb	8,41 Ba
2	7,38 Ba	6,63 Bab	6,33 Ba	6,51 Ba	6,94 Ba	7,23 Ba
4	6,48 Ab	6,89 Bca	0 Ab	6,00 Ba	6,20 Ba	0 Ab
8	2,46 Ab	0 Ac	0 Ac	3,91 Aa	0 Ac	0 Ac
72 horas incubação						
Dose	2	4	6	8	10	12
0	6,96 Ba	6,05 Ba	7,85 Ca	7,23Ca	7,12 Ca	8,17 Ba
2	6,51 Bab	4,10 Babc	6,55 Babc	0 Aa	2,00 Abc	2,00 Abc
4	5,90 Ba	0 Ab	3,99 Aab	2,15 Bb	4,89 Babc	0 Ab
8	1,39 Aa	0 Aa	1,23 Aa	0 Aa	0 Aa	0 Aa

Letras maiúsculas nas colunas mostram diferenças entre doses. Letras minúsculas nas linhas mostram diferenças entre reusos. As contagens "0" correspondem a uma concentração de log 10⁴UFC/g.

Valores de Probabilidades (24h de incubação) Dose= P<0,001, Reuso= P<0,193, Interação DoseXReuso P= P<0,001

Valores de Probabilidades (48h de incubação) Dose= P<0,001, Reuso=P<0,001, Interação DoseXReuso =P<0,001

Valores de Probabilidades (72h de incubação) Dose= P<0,001, Reuso=P<0,001, Interação DoseXReuso =P<0,007

O acúmulo do material orgânico decorrente do reuso das camas favorece o aumento dos elementos que servem como substratos para o desenvolvimento das famílias bacterianas, incluindo as bactérias presentes no modulador biológico.

Períodos maiores de incubação (72 h) podem ter favorecido o aumento das atividades metabólicas e antimicrobianas dos microrganismos do modulador reduzindo o crescimento de outras bactérias.

No geral, *Bacillus spp.* crescem em condições aeróbias estritas e consomem oxigênio rapidamente (BARUZZI ET AL., 2011; GENG ET AL., 2011). A elevada demanda por oxigênio no meio proporciona um ambiente satisfatório que predispõe o maior desenvolvimento das espécies anaeróbias bacilares (SONG et al., 2014) presentes nas camas de aviário. *Bacillus amyloliquefaciens* são capazes de reduzir o pH intestinal como também ambiental, favorecendo a colonização dos *Lactobacillus* e suprimindo as enterobactérias do meio como *Escherichia coli* (WU et al., 2011).

Os resultados avaliados sugerem possível capacidade de sobrevivência e multiplicação das enterobactérias frente à adição das diferentes doses do modulador biológico em camas de quatro reusos. Nas 48h de incubação efeito antibacteriano foi verificado em algumas amostras a partir do uso de doses menores (4g) do modulador, todavia a aplicação de 8g do modulador foi eficiente para todos os reusos de cama testados.

A interação entre a dose do modulador e o número de reusos das camas ocorreu tanto nos períodos de 24h como também em 48h de análises. O efeito do modulador foi superior ou mais eficiente na redução de UFC para amostras derivadas de camas que apresentaram maior número de reutilizações. Possivelmente esta resposta pode ser explicada pela maior disponibilidade de matéria orgânica presente em camas mais reutilizadas favorecendo o crescimento e atividade do grupo de micro-organismos presentes no modulator utilizado.

Entre as distintas comunidades bacterianas existem ações favoráveis à adaptação e manutenção no meio, tais quais: cooperação, competição, liberação de substâncias, ações estas as quais exemplificam a inibição de diferentes micro-organismos nas camas de aviário (NADELL et al., 2016).

Trabalho semelhante desenvolvido por Cruz et al. (2013) buscou determinar possíveis benefícios do uso de micro-organismos em camas de frangos de corte, onde verificaram a ausência de impactos do complexo bacteriano utilizado na qualidade dos materiais de cama, assim como no desempenho das aves. Por outro lado, materiais de cama compostados com inoculantes bacilares lácticos, otimizaram

a atividade microbiana no meio assim como melhoraram índices de taxas de degradação orgânica do resíduo (WANGEN et al., 2013).

5.3.1.3 *Staphilococcus spp.*

Conforme pode ser observado na Tabela 4 a partir das 24 h de incubação já foi possível verificar a ação inibidora do modulador frente ao crescimento do *Staphilococcus spp.* nas amostras de cama de frango.

Tabela 4. Contagem de *S. aureus* (log UFC/g) em diferentes períodos de incubação de camas de aviário reutilizadas por até 12 vezes e submetidas a diferentes doses do modulador biológico

Reutilização da cama						
24 horas incubação						
Dose/g	2	4	6	8	10	12
0	6,94 Ba	8,03 Ba	7,02 Ba	6,25 Ba	7,09 Ba	7,37 Ba
2	6,54 Ba	6,85 Ba	6,15 Ba	6,25 Ba	6,51 Ba	6,91 Ba
4	6,15 Ba	7,05 Ba	6,38 Ba	5,92 Ba	6,69 Ba	7,24 Ba
8	0 Aa	0 Aa	1,00 Aa	0 Aa	1,00 Aa	1,15 Aa
48 horas incubação						
Dose	2	4	6	8	10	12
0	6,74 Ba	7,39 Ba	6,77 Ba	6,10 Bba	7,07 Ba	8,27 Ca
2	6,97 Ba	6,67 Ba	6,31 Ba	6,64 Ba	6,75 Ba	6,88 Ca
4	3,49 Ab	6,59 Ba	6,15 Bab	5,98 ABab	6,10 Bab	4,10 Bab
8	2,73 Aab	1,28 Aab	0 Ab	3,59 Aa	0 Ab	0 Ab
72 horas incubação						
Dose	2	4	6	8	10	12
0	7,30 Ca	6,67 Ca	7,01 Ba	6,28 Ba	6,54 Ba	8,03 Ba
2	6,38 Bcab	5,98 Bcab	6,69 Ba	0 Ab	3,43 ABab	1,11 Ab
4	2,73 Abab	2,14 Abab	4,02 Bab	2,27 Aab	4,66 Bab	0 Ab
8	0,00 Aa	0 Aa	0 Aa	0 Aa	0 Aa	0 Aa

Letras maiúsculas nas colunas mostram diferenças entre doses. Letras minúsculas nas linhas mostram diferenças entre reusos. As contagens "0" correspondem a uma concentração de $\log 10^4$ UFC/g.

Valores de Probabilidades (24h de incubação) Dose= $P<0,001$, Reuso = $P<0,001$, Interação DoseXReuso $P= P<0,7$

Valores de Probabilidades (48h de incubação) Dose= $P<0,001$, Reuso= $P<0,45$, Interação DoseXReuso = $P<0,002$

Valores de Probabilidades (72h de incubação) Dose= $P<0,001$, Reuso= $P<0,004$, Interação DoseXReuso = $P<0,002$

Houve redução significativa nas UFC com o uso da maior concentração do modulador (8g) em comparação com outras doses em todos os reusos das camas.

No período de 48h foi observado efeito significativo do uso de 4g do modulador na redução das UFC para amostras provenientes de camas com dois, oito e doze reusos. Essa situação novamente demonstra interferência do tempo de incubação sobre a maior multiplicação e ação dos micro-organismos presentes no modulador nas amostras de cama. Nas camas de quatro, seis, dez como também

doze reusos, a aplicação da maior dose (8g) do modulador foi significativamente mais eficiente, causando, em alguns casos, a eliminação da detecção de microorganismos na concentração 10^4 UFC/g.

A ação antibacteriana do modulador também pode ser atribuída a produção de enzimas extracelulares produzidas pelo complexo bacteriano nas camas testadas, destacando-se a α -amilase, celulase, metaloproteases, proteases (AHMED et al., 2014), α -acetolactato, descarboxilase, endoglucanase, hemicelulases, fitase, amilase maltogênica e xilanases (SUPRIYATI et al., 2015).

A bactéria *Bacillus licheniformes*, um dos componentes do modulador biológico, está ligada diretamente com a produção das bacteriocinas que, por sua vez, são consideradas moléculas de potente efeito antimicrobiano contra bactérias da espécie *Staphylococcus spp.* (ABRIOUEL, et al. 2011)

Já nas 72h de incubação, os resultados mostram eficiência na inibição dos patógenos com a utilização de 2g do modulador para todas as amostras de camas testadas, exceto nas camas com seis reutilizações nas quais somente a dose de 8g foi eficaz. Foram encontradas interações significativas entre a dose do modulador e o reuso da cama, tanto nas 48h como 72h de incubação, novamente demonstrando que a ação do modulador biológico é afetada pelo número de reutilizações da cama.

Esta característica pode explicar a eficiente atuação de menores concentrações do modulador nas amostras de camas mais reutilizadas. Microorganismos bacilares e constituintes do modulador biológico testado produzem bacteriocinas, como a barnase (AHMED et al., 2014), subtilina e mersacidina (HERZNER et al., 2011), as quais são capazes de inibir o crescimento de *S. aureus* que competem por substratos nas camas de aviário. Dada a maior permanência (48h e 72h) do modulador nas amostras que continham maior número de reutilizações (oito, dez e doze reusos), foram requeridas menores doses do modulador para haver efeito antibacteriano.

5.3.2 Amônia e pH

Na figura 2 podem ser observadas faixas com tendência alcalina mantiveram-se para grupos considerados controle ou sem a presença do modulador. Conforme o aumento do número de reusos, foi percebido elevação do pH nestes grupos avaliados. Já para as amostras tratadas com o modulador, o incremento das doses

pode ter acarretado redução do pH das camas reusadas e avaliadas. Neste estudo podem ser observados valores de pH adequados (entre 8 e 9) os quais facilitam o desenvolvimento microbiano ideal (DAI PRÁ et al., 2009). Mesmo nessas condições, constatou-se redução significativa de todos os grupos bacterianos testados nos materiais de aviário. De acordo com JIANG et al., (2013), tanto a presença como ação intensa dos micro-organismos no meio pode provocar algumas reações químicas com liberação de bases pela matéria orgânica, elevando, assim, o pH da massa (JIANG et al., 2013).

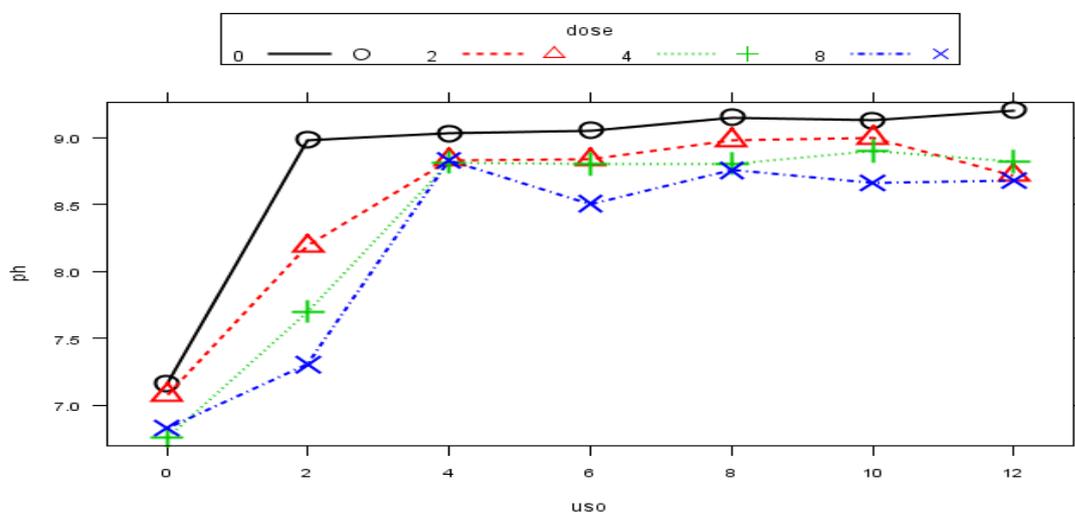


Figura 2- Análise do pH de amostras de camas aviárias reutilizadas e tratadas com diferentes doses de um modificador biológico

O pH da cama tem importante papel na multiplicação bacteriana, inclusive de bactérias dos gêneros *Salmonella* e *Escherichia coli*. Os resultados sugerem que as faixas de pH encontradas podem decorrer da ação de substâncias produzidas através da atividade bacteriana do modulador. Estas são capazes de alterar o pH através de ácidos orgânicos, ácidos voláteis, bacteriocinas, enzimas e até peróxidos de hidrogênio, tornando o meio prejudicial para o desenvolvimento das bactérias patogênicas (STRINGFELLOW et al., 2010).

Os compostos produzidos podem modificar as características da cama aviária devido as suas propriedades, baixando o pH e desse modo reduzindo o número de agentes patogênicos ou até mesmo atenuando alguns dos seus fatores de patogenicidade, como por exemplo, o metabolismo de produção de toxinas (BOTONE, 2010). Tratamentos contendo doses superiores de modulador (4g e 8 g)

sugerem que a redução do pH da cama pode interferir na emissão de amônia, prejudicando o crescimento microbiano devido as desfavoráveis condições do meio.

De acordo com o maior número de reutilizações, o acúmulo de excretas pode ter favorecido o aumento do pH, justificando maiores concentrações de amônia nos grupos controle. Com pH abaixo de 7 a volatilização de amônia diminui os íons livres de H⁺ elevando a proporção entre amônio:amônia, ou seja, mais amônia é convertida em amônio que é uma forma não volátil (FRANÇA et al., 2014), por outro lado a falta de tratamento adequado ou longos períodos de reutilização apresentam como consequência maior a volatilização de amônia, que tende a se desprender dos materiais reutilizados (SANTOS et al., 2012).

Roll et al. (2011) relatam que o número de reutilizações da cama causam elevação na umidade e na quantidade de bactérias desnitrificantes as quais são responsáveis por acelerar a degradação dos uratos presentes nas excretas e cama, intensificando a produção de amônia, a qual inibe o desenvolvimento de *Salmonella spp.*

Existe efeito do pH sobre a quantidade e proporção de amônio e amônia formados, uma vez que na cama mais ácida a amônia é convertida em amônio, assim como efeito do pH sobre a atividade microbiana na decomposição do ácido úrico em amônia que é extremamente importante para determinação da volatilização de amônia no ambiente. Os dois processos de formação de amônia, relação amônio: amônia e degradação do ácido úrico, são potencializados em pH na faixa de 7 e 10 (GAY; KNOWLTON, 2009).

Na figura 3, observa-se a relação entre o aumento da concentração do modulador utilizado e a queda na liberação de amônia das amostras testadas. Durante a experimentação, diferentes níveis de amônia foram constatados, onde se destacou menores emissões de amônia para todos os grupos de camas tratados com o modulador biológico em níveis mais elevados. Já para as amostras que não receberam o modulador biológico verificaram-se maiores produções de amônia. Tanto as concentrações de 2g como 4g e 8g do modulador foram mais efetivas no controle da emissão de amônia no ambiente para todos os reusos de cama. De encontro com esses resultados LIMA et al., (2011) ao comparar camas novas e usadas em aviários de pressão negativa, observaram taxas de emissão de amônia mais baixas em camas novas.

Conforme pode ser observado na figura 3 houve um aumento muito significativo em camas reutilizadas duas vezes em comparação com as camas novas. Porém a partir do segundo reuso as estimativas de emissões de amônia parecem se manter mais ou menos constantes até o 12º uso.

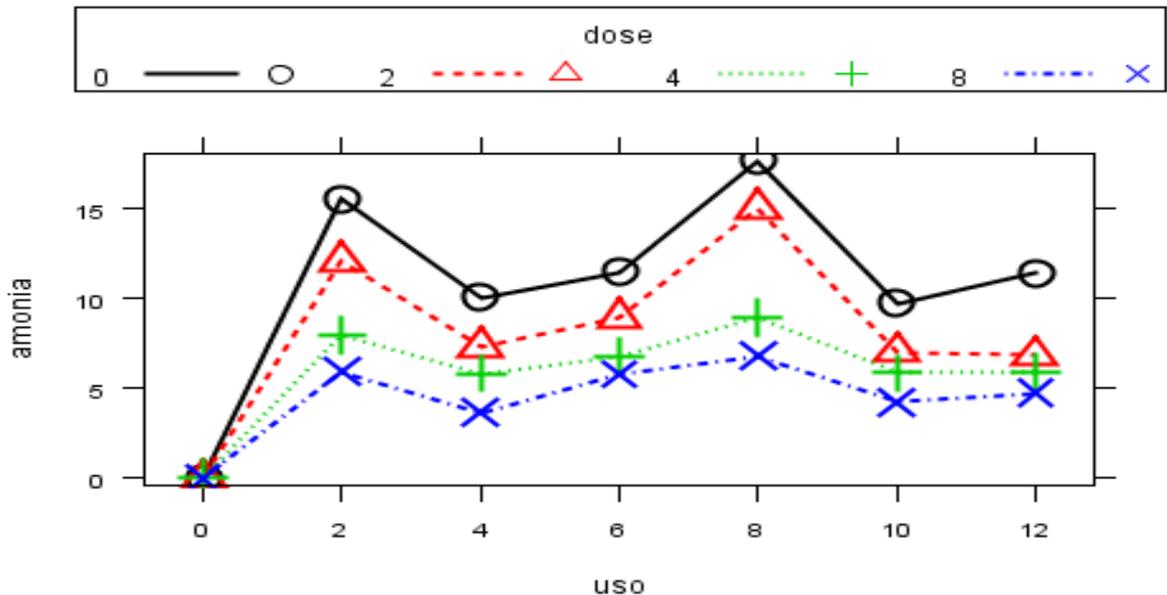


Figura 3- Análise de níveis de amônia provenientes de camas aviárias reutilizadas e tratadas com diferentes doses de um modulador biológico.

5.4 Conclusão

Há interação entre a dose do do modulador biológico e o número de reutilizações das camas de aviário sobre a contagem de bactérias na cama aviária.

Maiores doses do modulador provoca inibição mais rápida dos micro-organismos não desejados.

É possível utilizar doses menores do modulador e atingir níveis similares de eficácia na redução de bactérias patogênicas em avaliações microbiológicas realizadas 72h após a inoculação do produto especialmente em camas com maior número de reutilizações. Há uma elevação brusca do pH até a quarta reutilização da cama com tendência posterior de manter-se estável entre 8,5 e 9,0 até o 12º reuso.

O uso do modulador em maiores doses reduz a emissão de amônia para o meio.

6. Conclusões gerais

Se mantido os padrões sanitários adequados das camas de aviário reutilizadas assim como o manejo correto da mesma, torna-se viável a reutilização dos materiais de cama de aviário por vários lotes.

As camas de aviário devem ser devidamente manejadas a fim de proporcionar conforto e bem estar às aves, garantindo resultados satisfatórios com redução dos custos produtivos o que é possibilitado pelo maior número de reutilizações das camas de aviário e uso dos tratamentos como óxido de cálcio, enlunamento e CaO e modulador biológico durante o vazio sanitário.

Referências

ALIAKBARPOUR, H. R., M. CHAMANI, G. RAHIMI, A. A. SADEGHI, D. QUJIEQ. The Bacillus subtilis and lactic acid bacteria probiotics influences intestinal mucin gene expression, histomorphology and growth performance in broilers. Asian Australas. **Jounal of Animal Science**, v. 25 p. 1285-1293, 2012.

AHMED, S. T.; ISLAM, M.; MUN, H. S.; SIM, H. J.; KIM, Y.; YANG, C. Effects of Bacillus amyloliquefaciens as a probiotic strain on growth performance, cecal microflora and fecal noxious gas emissions of broiler checkens. **Poultry Science**, v. 93, p. 1963-1971, 2014.

AHN, K. K.; RICHARD, T. L.; GLANVILLE, T. D. Laboratory determination of compost physical parameters for modeling of airflow characteristics. **Waste Management**, v. 28 p. 660-670, 2008.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALITICAL CHEMISTS – AOAC. **Official Methods of Analysis**. 11.ed. Washington, D.C. 1970. 1015p.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL (ABPA). **Relatório Anual 2015**. Disponível em: abpa-br.com.br/ Acesso em: 24 novembro, 2016.

ÁVILA, V. S.; COSTA, C. A. F.; FIGUEIREDO, E. A. P.; ROSA, P.S.; OLIVEIRA, U.; ABREU, M.N.A. Materiais alternativos, em substituição à maravalha como cama de frangos. Concórdia: **Embrapa Suínos e Aves**. 2007. Disponível em: < http://www.cnpsa.embrapa.br/sgc/sgc_publicacoes/publicacao_n4v84n9g.pdf > Acesso em: 29 de nov. de 2016.

AVILA, V. S.; OLIVEIRA, U.; FIGUEIREDO, E. A.; COSTA, C. A. F.; ABREU, V. M. N.; ROSA, P.S. Avaliação de materiais alternativos em substituição à maravalha como cama de aviário. **Revista Brasileira Zootecnia**. v. 37, p. 273-277, 2008.

ABRIOUEL, H.; FRANZ, C.; NABIL, O.; GÁLVEZ, A. Diversity and applications of Bacillus bacteriocins. **FEMS Microbiology Review**, v. 35, p. 201-232, 2011.

BABKO, A. K.; PILIPENKO, A. T. **Photometric analysis: Methods of determining non metals**. Moscow: Mirr. 1976. p.8-16.

BARKER, K. J.; PURSWELL, J. L.; DAVIS, J. D.; PARKER, J. D.; KIDD, H. M.; MCDANIEL, M.T.; KIESS, A.S. Distribution of Bacteria at Different Poultry Litter Depths Internatio. **Journal of Poultry Science**, v.9, p. 10-13, 2010.

BOLAN, N. S.; CHUASAVATHI, T.; CHUASAVATHI, B.; SESHADRI, M. J.; SZOGI, A.A.; ROTHROCK JR.; PANNEERSELVAM, P. Uses and management of poultry litter. **World's Poultry Science Journal**, v.66, p. 673-698, 2010.

BARUZZI, F.; QUINTIERI, L.; MOREA, M.; CAPUTO, L. Antimicrobial compounds produced by Bacillus spp. and applications in food. **Science against microbial pathogens: Communicating Current research and technological advances** (Ed. A. M. Vilas). City, Spain. v. 1, p. 1102-1111, 2011.

BENABDELJELIL, K.; AYACHI, A. Evaluation of alternative litter materials for poultry. **Journal Applied Poultry Research**, v. 5, p.203-209, 1996.

BERNHART, M.; FASINA, O. Moisture effect on the storage, handling and flow properties of poultry litter. **Waste Management**, v. 29, p.1392-1398, 2008.

BOTTONE, Edward Jones. Bacillus cereus, a volatile human pathogen. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 23, p. 382-398, 2010.

BORDIGNON, Leonardo André Fialkowisk. **Efeitos de condicionadores químicos sobre a qualidade da cama de frango**. 2013. 66f. Dissertação (Mestrado em Produção animal) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. Dois Vizinhos, 2013.

BRITO, B. G.; TAGLIARI, K. C. Efeito da utilização de Impact p na ocorrência de celulite em frangos de corte. **Hora Veterinária**, v. 26, p.13-20, 2007.

BROUCEK, J.; CERMAK, B. Emission of harmful gases from poultry farms and possibilities of their reduction. **Ekologia**, v. 34, p.89–100, 2015.

CAETANO, T.; KRAWCZYK, J.; MOSKER, E.; SUSSMUTH, R.; MENDO, S. Heterologous Expression, Biosynthesis, and Mutagenesis of Type II Lantibiotics from *Bacillus licheniformis* in *Escherichia coli*. **Chemistry & Biology**, v.78 p. 90-100, 2011.

CHADWICK, Dave. Emission of ammonia, nitrous oxide and methane from cattle manure heaps: effect of compaction and covering. **Atmospheric Environment**, v. 9, p. 787-799, 2005.

CHEN, Z.; DIAO, J.; DHARMASENA, M.; IONITA, C.; JIANG, X.; RIECK, J. Thermal inactivation of desiccation-adapted *Salmonella* spp. in aged chicken litter. **Applied Environment Microbiology**, v. 79, 7013-7020, 2013.

CHEN, Z.; WANG, H.; JIANG, X. Developing a two-step heat treatment for inactivating desiccation adapted *Salmonella* spp in aged chicken litter. **Foodborne Pathogens Disease**, v 12, p.104–109, 2015.

CHERNAKI-LEFFER, A. M.; BIESDORF, S. M.; ALMEIDA, L. M.; LEFFER, E. V. B.; VIGNE, F. Isolamento de Enterobactérias e *Alphitobius diaperinus* em cama de aviários no oeste do Estado do Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 4, p. 243-247, 2002.

CHINIVASAGAM, H. N.; REDDING, M.; RUNGE, G.; BLACKALL, P. J. Presence and incidence of food-borne pathogens in Australian chicken litter. **British Poultry Science**, 51 p. 311-318, 2010.

CHINIVASAGAM, H. N.; TRAN, T.; BLACKALL, P. J. Impact of the Australian litter re-use practice on *Salmonella* in the broiler farming environment. **Food Research Environment**, v. 45, p. 891-896, 2012.

COLLETT, Stephen. Nutrition and wet litter problems in poultry. **Animal Feed Science Technology**, v.173, p.65–75, 2012.

COOK, A.; ODUMERU, J.; LEE, S. et al. *Campylobacter*, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, verotoxigenic *Escherichia coli*, and *Escherichia coli* prevalence, enumeration, and subtypes on retail chicken breasts with and without skin. **Journal Food Protection**, v. 75, p.34-40, 2012.

CRUZ, D. P.; OTUTUMI, L. K.; JUNIOR, R. P.; CERVANTES, R. P.; MEZALIRA, T. S.; GERÔNIMO, E. Performance, carcass yield and litter quality of broilers raised on litters treated with microorganisms. **Ciência animal. Brasileira**, v. 14, p.41-48, 2013.

DAI PRÁ, Marcos Antonio; ROLL, Victor Fernando Buttow. **Cama de Aviário: utilização, reutilização e destino**. 1. ed. Porto Alegre, RS: Manas, LTDA, 2012. 85p.

DAI PRÁ, M. A.; CORREA, E. K.; ROLL, V. B.; XAVIER, E. G.; LOPES, D. C. N.; LOURENÇO, F. F.; ZANUSSO, J. T.; ROLL, A. P. Uso de cal virgem para o controle de *Salmonella* spp. e *Clostridium* spp. em camas de aviário. **Ciência Rural**, v. 39, p. 1189 -1194, 2009.

DRESCHER, K.; NADELL, C.; STONE, H.; WINGREEN, N.; BASSLER, B. Solutions to the public goods dilemma in bacterial biofilms. **Current Biology**, v.24, p.50–55, 2014.

DUMAS, M. D.; POLSON, S. W.; RITTER, D.; RAVEL, J.; GELB, J.; WOMMAC, K. E. Impacts of poultry house environment on poultry litter bacterial community composition. **PLoS One**, v. 6, n. 9, p. 1-12, 2011.

EL KADER, N. A.; ROBIN, P.; PAILLAT, J. M.; LETERME, P. Turning, compacting and the addition of water as factors affecting gaseous emissions in farm manure composting. **Bioresource Technology**, v. 98, p.2619-2628, 2007.

FERREIRA, H. A.; OLIVEIRA, M. C.; TRALDI, A. B. Efeito de condicionadores químicos na cama de frango sobre o desempenho de frangos de corte. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinaria Zootecnico**, v. 56, p. 542-546, 2004.

FIORENTIN, Laurimar. **Reutilização da cama na criação de frangos e as implicações de ordem bacteriológica na saúde humana e animal**. Embrapa Suínos e Aves. Concórdia, SC, 2005.

FLEMMING H. C.; WINGENDER, J.; SZEWZYK, U.; STEINBERG, P.; RICE, S.C.; KJELLEBERG, S. Biofilms: an emergent form of bacterial life. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, p. 563-575, 2016.

FRANÇA, L. G. F.; TINÔCO, I. F. F.; MENDES, M. A. S. A.; COELHO, D. J. R. Caracterização de fatores que influenciam a emissão de amônia pelos dejetos de galinhas poedeiras e proposição de um score para o potencial máximo de emissão. XLIII Congresso Brasileiro de Engenharia Agrícola. **Anais...** Campo Grande: CONBEA 2014.

GAY, S. W.; KNOWLTON, K. F. Ammonia emissions and animal agriculture. **Biological Systems Engineering Publication**, v. 442, p.1-5, 2009.

GANDHAPUDI, S. K.; COYNE, M. S.; D'ANGELO, E. M.; MATOCHA, C. Potential nitrification in alum-treated soil slurries amended with poultry manure. **Bioresource Technology**, v.97, 664–670, 2006.

GARRIDO, M. N.; SKJERVHEIM, M.; OPPEGAARD, H.; SORUM, H. Acidified litter benefits the intestinal flora balance of broiler chickens. **Applied Environmental Microbiology**, v. 70, p. 5208-5213, 2004.

GENG, W.; CAO, M.; SONG, C.; XIE, L.; LIU, L.; YANG, C.; FENG, J.; ZHANG, W.; JIN, Y.; DU, Y.; WANG, S. Complete genome sequence of *Bacillus amyloliquefaciens* LL3, which exhibits glutamic acid-independent production of poly- γ -glutamic acid.

Journal of Bacteriology, v. 193, p. 3393-3394, 2011.

GUO, R.; LI, G.; JIANG, T.; SCHUCHARDT, F.; CHEN, T.; ZHAO, Y.; SHEN, Y.

Effect of aeration rate, C/N ratio and moisture content on the stability and maturity of compost. **Bioresource Technology**, v.112, p.171-178, 2012.

HAHN, L.; PADILHA, M. T. S.; PADILHA, J. C. F.; POLI, A. E.; RIEFF, J. C. F.

Persistência de patógenos e do antibiótico salinomicina em pilhas de compostagem de cama de aviário. **Archivos Zootecnia**, v. 61, n. 234, p. 279-285, 2012.

HAMMAMI, I.; RHOUMA, A.; JAOUADI, B.; REBAI, A.; NESME, X. Optimization and biochemical characterization of a bacteriocin from a newly isolated *Bacillus subtilis* strain 14B for biocontrol of *Agrobacterium* spp. strains. **Letters in Applied**

Microbiology, v.48, p.253-260, 2009.

HE, L.; LILI, W.; CHEN, W.; LIU, Y. Production and partial characterization of bacteriocin-like pepitdes by *Bacillus licheniformis* ZJU12. **Microbiological**

Research, v. 161 p. 321-326, 2006.

HERNANDES, R.; CAZETTA, J. O. Método simples e acessível para determinar

amônia liberada pela cama aviária. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, p.824-829, 2001.

HERZNER, A. M.; DISCHINGER, J.; SZEKAT, C.; JOSTEN, M.; SCHMITZ, S.;

YAKELEBA, A.; REINARTZ, R.; JANSEN, A.; SAHL., H.G.; PIEL, J.; BIERHAUM, G. Expression of the Lantibiotic Mersacidin in *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. **PLoS**

One, v.6, p. 1-8, 2011.

HILLS, P.; MANNING, C.E.; RIDGE, Y.; BROCKLEHURST, T. Water availability and the survival of *Salmonella typhimurium* in porous systems. **International Journal of**

Food Microbiology, v. 36, p.187-198, 1997.

JAYARAMAN, S.; THANGAVEL, G.; KURIAN, H.; MANI, M.; MUKKALIL, R.; CHIRAKKAL, H. *Bacillus subtilis* PB6 improves intestinal health of broiler chickens challenged with *Clostridium perfringens*-induced necrotic enteritis. **Poultry Science**, v. 92, 370-374, 2013.

JIANG, T.; SCHUCHARDT, F.; LI, G. X.; GUO, R.; LUO, Y. M. Gaseous emission during the composting of pig feces. **Chemical**, v. 90, p.1545-1551, 2013.

JOLANUM, B.; TOWPRAYOON, S.; CHIEMCHAI SRI, C. Aeration improvement in fed batch composting of vegetable and fruit wastes. **Environmental Progress**, v. 27, p.250-256, 2008.

JURICOVA, H.; VIDENSKA, P.; LUKAE, M.; FALDYNOVA, M.; BABAK, V.; HAVLICKOVA, H.; SISAK, F.; RYCHLIK, I. Influence of *Salmonella enteric* Serovar Enteritidis infection on the development of the cecum microbiota in newly hatched chicks. **Applied and Environmental Microbiology**, v.79, p. 745-747, 2012.

KIM, J.; DIAO, J.; SHEPHERD, M. W. JR.; SINGH, R.; HERINGA, S. D.; GONG, C.; JIANG, X. Validating thermal inactivation of *Salmonella* spp. in fresh and aged chicken litter. **Applied and Environmental Microbiology**, v, 78, p.1302–1307, 2012.

KWAK, W. S.; HUH, J. W.; MCCASKEY, T. A. Effect of processing time on enteric bacteria survival and on temperature and chemical composition of broiler poultry litter processed by two methods. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 1529 – 1536, 2005.

LARRISON, E. L.; BYRD, J. A.; DAVIS, M. A. Effects of litter amendments on broiler growth characteristics and *Salmonella* colonization in the crop and cecum. **Journal Applied Poultry Research**, v.19, p.132-136, 2010.

LAVERGNE, T. K.; STEPHENS, M. F.; SCHIELLINGER, D. **In-house pasteurization of broiler litter**. [Louisiana]: Louisiana State University Agricultural Center, p.16, 2006.

LEE, K.; LILLEHOJ, H. S.; SIRAGUSA, G. R. Direct-fed microbials and their impact on the intestinal microflora and immune system of chickens. **Japan Poultry Science Association** v. 47 p. 106-114, 2010.

LEI, X.; PIAO, X.; RU, Y.; ZHANG, H.; PERON, A. Effect of *Bacillus amyloliquefaciens*-based direct-fed microbial on performance, nutrient utilization, intestinal morphology and cecal microflora in broiler chickens. **Journal of Animal Science**, v. 28, 239-246, 2015.

LI, S. P.; ZHAO, X. J.; WANG, J. Y. Synergy of Astragalus polysaccharides and probiotics (*Lactobacillus* and *Bacillus cereus*) on immunity and intestinal microbiota in chicks. **Poultry Science**, v. 88, p. 519-525, 2009.

LINE, J. E.; BAILEY, J. S. Effect of on-farm litter acidification treatments on *Campylobacter* and *Salmonella* populations in commercial broiler houses in Northeast Georgia. **Poultry Science**, v.85, p. 1529-1534, 2006.

LIMA, K. A. O.; MOURA, D. J.; CARVALHO, T. M. R.; BUENO, L. G. F.; VERCELLINO, R. A. Ammonia emissions in tunnel-ventilated broiler houses. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v.13, p. 265-270, 2011.

LOCH, F. C.; OLIVEIRA, M. C.; SILVA, D. Quality of poultry litter submitted to different treatments in five consecutive flocks. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.40, p. 1025-1-30, 2011.

LOURENÇO, M. C.; KURITZA, L. N.; WESTPHAL, P.; MIGLINO, L. B.; PICKLER, L.; KRAIESKI, A. L.; SANTIN, E. Uso de probiótico sobre a ativação de células T e controle de *Salmonella* Minnesota em frangos de corte. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 33, p. 11-14, 2013.

LOPES ASSIS, R.C.; DIAS LUNS, F. E.; CURY, M.C. Desinfecção com amônia quaternária associada à fermentação não potencializa o controle de coccidiose em cama de frango. **Ciência Rural**, v. 43, n.8, p. 1459-1463, 2013.

LOPES, M.; ROLL, V. F. B.; LEITE, F. L. et al. Quicklime treatment and stirring of different poultry litter substrates for reducing pathogenic bacteria counts. **Poultry Science**, v. 92, p.638-644, 2013.

LOPES, M., LEITE, F. L.; VALENTE, S. B.; HERES, T.; DAI PRÁ, M. A.; XAVIER, E. G.; ROLL, V. F. B. An assessment of the effectiveness of four in-house treatments to reduce the bacterial levels in poultry litter. **Poultry Science**, v. 94, p. 2094-2098, 2015.

LUCCA, W.; CECCHIN, R.; TIMBOLA, E.; GRANDIN, J.; LUCCA, M.S. Efeito de diferentes tratamentos químicos em cama para aves de corte. **Revista Agroambiental**, v.4, n.1, p. 25-31, 2012.

MACKLIN, K. S.; HESS, J. B.; BILGILI, S. F.; NORTON, R. A. Effects of in-house composting of litter on bacterial levels. **Journal Applied Poultry Research**, v.15, p.531–537, 2006.

MACKLIN, K. S.; HESS, J. B.; BILGILI, S. F. In-house windrow composting and its effects on foodborne pathogens. **Journal Applied Poultry Research**, v. 17, p.121–127, 2008.

MEDA, B.; HASSOUNA, M.; AUBERT, C.; ROBIN, P. Influence of rearing conditions and manure management practices on ammonia and greenhouse gas emissions from poultry houses. **World's Poultry Science Journal**, v. 67, p. 441-456, 2011.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2013. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/aves>.

MAGUIRE, R. O.; HESTERBERG, D.; GERNAT, A.; ANDERSON, K.; WINELAND, M.; GRIMES, J. Liming poultry manures to decrease soluble phosphorus and suppress the bacteria population. **Journal of Environment Quality**, v35, 849–857, 2006.

MEDA, B.; HASSOUNA, M.; AUBERT, C.; ROBIN, P. Influence of rearing conditions and manure management practices on ammonia and greenhouse gas emissions from poultry houses. **Worlds Poultry Science Journal**, v. 67, p 441-456, 2011.

MUNIZ, E.; MESA, D.; CUASPA, R.; SOUZA, R.; ALEXANDER, M.; SANTIN, E. Presence of *Salmonella* spp. in reused broiler litter. **Revista Colombiana de Ciências Pecuarias**, v. 27, p. 12-17 2014.

NADELL, C. D.; KNUT, D.; FOSTER, K. R. Spatial structure, cooperation and competition in biofilms. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, p. 589-600, 2016.

OLIVEIRA, M. C.; FERREIRA, H. A.; CANCHERINI, L.C. Efeitos de condicionadores químicos sobre a qualidade da cama de frango. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinaria e Zootecnia**, v.56, p. 536-541, 2004.

OVIEDO, R. E. Tecnologias para mitigar o impacto ambiental da produção de frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia** v. 3, p. 239-252, 2008.

ONGENA, M.; JOURDAN, E.; ADAM, A.; PAQUOT, M.; BRANS, A.; JORIS, B.; ARPIGNY, J.L.; THONART, P. Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. **Environmental Microbiology**, v.9, p.1084-1090, 2007.

ONI, R.; SHARMA, M.; MICALLEF, S.; BUCHANAN, R. The effect of UV radiation on survival of *Salmonella enterica* in dried manure dust. In **Proceedings of the International Association for Food Protection Annual Meeting**, Charlotte, NC, USA, 30 July 2013.

PAGAZAURTUNDU, A.; WARRISS, P. D., Measurements of footpad dermatitis in broiler chickens at processing plants. **The Veterinary Record**, v. 158, p. 679-682, 2006.

PALHARES, J.C.P.; KUNZ, A. (Ed.). **Manejo ambiental na avicultura**. Concórdia: Embrapa Suínos e Aves. Documentos,v.149, p. 125-152, 2011.

PAN, D.; YU, Z. Intestinal microbiome of poultry and its interaction with host and diet. *Gut. Microbes.* 5, 108–119, 2014.

PEREIRA, M. L. 2009. **Manejo adequado garante a reutilização de cama aviária como Prática segura.** Disponível em:

<http://www.embrapa.br/imprensa/noticias/2009/maio/3a_semana/manejo_adequado_garante_a_reutilizacao_de_cama_aviaria_como_pratica_segura> Acesso em: 10 jun. 2012.

POPE. M. J.; CHERRY, T. E. An evaluation of presence of pathogens on broilers raised on Poultry Litter Treatment® - treated litter. **Poultry Science**, 79 1351-1355, 2000.

QUINN, P. J.; CARTER, M.E.; MARKEY, B.; CARTER, G. R. **Clinical Microbiology Reviews**, p.137- 143, 1994.

RESENDE, F. M. S. **Análises físico-químicas e virucidas da fermentação com cobertura e sem amontoamento da cama de aves.** 2010. Dissertação de Mestrado. Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

RITZ, C.W.; FAIRCHILD, B.D.; LACY, M.P. **Litter quality and broiler performance.** Cooperative Extension Service-The University of Georgia College of Agricultural and Environmental Sciences. Bulletin,1267, 2009.

ROLL, V. F. B.; DAI PRÁ, M. A.; ROLL, A. P. Research on salmonella in broiler litter reused for up to 14 consecutive flocks. **Poultry Science**, v. 90, p. 2257–2262, 2011.

ROLL, V. F. B.; LOPES, L. L.; GONÇALVES, F. M.; ANCIUTI, M.; LEITE, F. L.; CORRÊA, E. K.; XAVIER, E. G. X. Condição microbiológica de cama tratada com Impact P® em matrizes de frangos de corte. **Ciência Rural**, v. 38, p. 2650-2653, 2008.

ROBERTS, B. N.; BAILEY, R. H.; MCLAUGHLIN, M. R.; MILES, D. M.; BROOKS, J.P. Spatial and temporal analysis of microbial populations in production broiler house litter in the southeastern United States. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 22, p. 759-770, 2013.

RUIZ, V.; RUIZ, D.; GERNAT, A. G.; GRIMES, J. L.; MURILLO, J. G.; WINELAND, M. J.; ANDERSON, K. E.; MAGUIRE, R. O. The effect of quicklime (CaO) on litter condition and broiler performance. **Poultry Science**, v. 87, p. 823-827, 2008.

ROTHROCK, M. J.; COOK, K. L.; WARREN, J. G.; SISTANI, K. The effect of alum addition on microbial communities in poultry Litter. **Poultry Science**, v, 87, 1493-1503, 2008.

SANTOS, E. C.; COTTA, J. T. B.; MUNIZ, J. A.; FONSECA, R. A.; TORRES, D. M. Avaliação de alguns materiais usados como cama sobre o desempenho de frangos de corte. **Ciencia e Agrotecnologia**, v. 24, p.1024-1030, 2000.

SANTOS, T. M. B.; LUCAS Jr. J.; SAKOMURA, M. K. Efeitos de densidade populacional e da reutilização da cama sobre o desempenho de frangos de corte e produção de cama. **Revista Portuguesa de Ciência Veterinária**, v. 100, p.45-52, 2005.

SANTOS, F. G.; ESCOSTEGUY, P. A. V.; RODRIGUES, L. B. Qualidade de esterco de ave poedeira submetido a dois tipos de tratamentos de compostagem. **Revista Brasileira Engenharia Agrícola Ambiental**, v.14, n10, p. 1101-1108, 2010.

SANTOS, M. J. B.; SAMAY, A. M. A. T.; SILVA, D. A. T.; RABELLO, C. B. V.; TORRES, T. R.; SANTOS, P. A.; CAMELO, L. C .L. Manejo e tratamento de cama durante a criação de aves. **Revista Eletrônica Nutritime**, v. 9, n. 3, p.1801-1815, 2012.

SILVA, V. S.; VOSS, D.; COLDEBELLA, A.; BOSSETI, N.; AVILA, V.S. Efeito de tratamentos sobre a carga bacteriana de cama de aviário reutilizada em frango de corte. Concórdia: **Embrapa Suínos e aves**. 2007. Disponível em:

<http://www.cnpqa.embrapa.br/sgc/sgc_publicacoes/publicacao_k1b2010q.pdf>
Acesso em: 9 maio. 2016.

SILVA, V. S. Estratégias para reutilização de cama de aviário. In: **Conferência Facta de Ciência e Tecnologia Avícola**, SP, Anais. Santos: FACTA, Santos, SP. Anais. Santos: FACTA, 2011.

SONG, J.; XIAO, K. Y. L.; KE, L. F.; JIAO, C. H.; HU, Q. Y.; DIAO, B.; SHI, X. T. ZHOU. Effect of a probiotic mixture on intestinal microflora, morphology, and barrier integrity of broilers subjected to heat stress. **Poultry Science**, v. 93, p. 581-588, 2014.

STRINGFELLOW, K.; CALDWELL, D.; LEE, J.; BYRD, A.; CAREY, J.; KESSLER, K.; MCREYNOLDS, J.; BELL, A.; STIPANOVIC, J.; FARNELL, M. Pasteurization of chicken litter with steam and quicklime to reduce *Salmonella* Typhimurium. **Journal Applied Poultry Research**, v.19, p. 380-386, 2010.

SHEPHERD, E. M.; FAIRCHILD, B. D. Footpad dermatitis in poultry - a review. **Poultry Science**, v, 89, p. 2043–2051, 2010.

SUPRIYATI, T.; HARYATI, T.; SUSANTI, T.; SUSANA, I.W.R. Nutritional value os rice bran fermented by *Bacillus amyloliquefaciens* and humic substances and its utilization as a feed ingrediente for broiler chickens. **Asian Australas Journal of Animal Science**. v. 28, n. 2, p. 231-238, 2015.

TEO, A. Y.; TAN, H. M. Effect of *Bacillus subtilis* PB6 (CLOSTAT) on broilers infected with a pathogenic strain of *Escherichia coli*. **Journal Applied Poultry Research**, v, 15, p.229–235, 2006.

TERZICH, M.; POPE, M. J.; CHERRY, T. E.; HOLLINGER, J. Survey of pathogens in poultry litter in the United States. **Journal of Applied Poultry Research**, v.9, n.2, p.287-291, 2000.

TUYTTENS, F.; VANHONACKERW, F.; VERBEKE, W. Broiler production in Flanders, Belgium: Current situation and producers' opinions about animal welfare. **World's Poultry Science Journal**, v, 70, p.343– 354, 2014.

UBA. **Relatório Anual**. União Brasileira de Avicultura, v. São Paulo, n. 20, p. 109 2013.

WADUD, S. A.; MICHAELSEN, E. G.; PARCSI, G.; ZEMB, O.; STUETZ, R.; MANEFIELD, M. Bacterial and fungal community composition over time in chicken litter with high or low moisture content. **British Poultry Science**. v. 53, n.5, p. 561-569, 2012.

WERLE, G.; LOVATO, M.; WILSMANN, C. G.; GAZONI, F. G.; CHAVES, B. W.; BRUSTOLIN, J. M. Avaliação microbiológica da cama de frangos de corte tratada com Ecodryaves. **Anais...** 25ª Jornada Acadêmica Integrada.UFSM, 2010.

WILKINSON, K. G.; TEE, E.; TOMKINS, R. B.; HEPWORTH, G.; PREMIER, R. Effect of heating and aging of poultry litter on the persistence of enteric bacteria. **Poultry Science**, v. 90, p. 10–18, 2011.

WILLIAMS, L. K.; SAIT, L. C.; COGAN, T. A.; JORGENSEN, F.; GROGONOTHOMAS, R.; HUMPHREY, T. J. Enrichment culture can bias the isolation of *Campylobacter* subtypes. **Epidemiology & Infection**, Cambridge, v. 140, 1227-1235. 2012.

WANGEN, D.R.B.; PENA, P. R. A.; CAMARGO, A.P.F.; SANTOS, M. S.; PIRES, M. R. Emprego de inoculante à base de microrganismos na compostagem de cama de aviário, **Enciclopédia biosfera**, v. 9, p. 1268, 2013.

WAGENBERG, C. P. A.; VAN, F. M.; BROUWER, R.; HOSTE M.L. RAU. Comparative analysis of EU standards in food safety, environment, animal welfare and other non-trade concerns with some selected countries, 2012. **European Union**, LEI Wageningen UR.

WU, B. Q.; ZHANG, T.; GUO, L.Q.; LIN, J. P. Effect of *Bacillus subtilis* KD1 on broiler intestinal flora. **Poultry Science**, v. 90, p. 2493-2499, 2011.

VALENTE, B. S.; XAVIER, E. G.; MORSELLI, T. B. A. G.; JAHNKE, D. S.; BRUM JR., B. DE. S.; CABRERA, B. R.; MORAES, P. DE O.; LOPES, D. C. N. Fatores que afetam o desenvolvimento da compostagem de resíduos orgânicos. **Revista Archivos de Zootecnia**, v. 58, p.59-85, 2009.

VICENTE, J. L.; HIGGINS. S. E.; HARGIS, B. M. et al. Effect of Poultry Guard litter amendment on horizontal transmission of *Salmonella enteritidis* in broiler chicks. **International Journal Poultry Science**, v. 6, p.314-317, 2007.