

Artículo de investigación

Aislamiento de *Lactobacillus reuteri* de pollos con potencial efecto probiótico

Isolation of *Lactobacillus reuteri* from chickens with probiotic potential effect

Mónica Z. Alonso^{1*}, María Cecilia García¹, Yosef D. Huberman², Nora L. Padola³, Analía Etcheverría³¹Laboratorio de Fisiología Celular, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNCPBA, Pinto 399, Tandil, Argentina.²Laboratorio de Bacteriología, Producción Animal, INTA EEA Balcarce, Ruta 226 Km 73.5, Balcarce (07620), Argentina.³Laboratorio de Inmunoquímica y Biotecnología, Facultad de Ciencias Veterinarias, CIVETAN-CONICET-CICPBA-UNCPBA, Pinto 399 Tandil, Argentina

*e-mail: mزالonso@vet.unicen.edu.ar

(Recibido: 14 de septiembre 2023; aceptado 12 de junio 2024)

RESUMEN

Existen numerosos microorganismos con capacidades probióticas, siendo las bacterias ácido lácticas (BAL) del género *Lactobacillus* las que se encuentran presentes en el tracto gastrointestinal (TGI) de los animales. Hay información sobre el uso de probióticos provenientes de distintas especies animales o aislados en otros países que han presentado una baja eficiencia en la producción avícola en Argentina. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue aislar y caracterizar BAL del género *Lactobacillus* provenientes de intestinos de pollos parrilleros y evaluar su capacidad probiótica. Se procesaron 36 muestras de íleon de pollos y se realizó la caracterización fenotípica de las cepas aisladas mediante pruebas bioquímicas básicas como la morfología de colonias, tinción de Gram, prueba de la catalasa, reducción de nitrato y capacidad fermentativa. Posteriormente, se evaluaron las capacidades probióticas como el crecimiento a diferentes temperaturas, tolerancia a sales biliares, crecimiento a distintos pH y actividad antimicrobiana. Los resultados obtenidos demostraron que una cepa presentó características fenotípicas correspondientes con el género *Lactobacillus*, capacidad probiótica frente a condiciones gástricas simuladas y actividad antimicrobiana. Finalmente, esta cepa fue caracterizada genotípicamente como *Lactobacillus reuteri* por PCR.

Palabras clave: *Lactobacillus reuteri*; pollos; aislamiento; probiótico

INTRODUCCIÓN

Un probiótico se define como “un microorganismo vivo que ingerido en cantidades adecuadas confiere un beneficio al huésped”¹. Dentro de este grupo, existen numerosos microorganismos, siendo las bacterias ácido lácticas (BAL) del género *Lactobacillus* las que se encuentran presentes en el tracto gastrointestinal (TGI)

ABSTRACT

There are numerous microorganisms exhibiting probiotic capabilities, with lactic acid bacteria (BAL) of the *Lactobacillus* genus being present in the gastrointestinal tract of animals. Information on the use of probiotics from different animal species or isolated in other countries has shown low efficiency in poultry production in Argentina. Therefore, the objective of this work was to isolate and characterize *Lactobacillus* species from the intestine of broiler chickens and evaluate their probiotic capacity. Thirty-six chicken ileum samples were processed and the isolated strains underwent phenotypic characterization using basic biochemical tests including: colony morphology, Gram stain, catalase test, nitrate reduction and fermentative capacity. Subsequently, the probiotic capacities were evaluated such as: growth at different temperatures, tolerance to bile salts, growth at different pH and antimicrobial activity. It was found that one strain presented phenotypic characteristics corresponding to the genus *Lactobacillus*, probiotic capacity against simulated gastric conditions, and antimicrobial activity. Finally, this strain was genotypically characterized as *Lactobacillus reuteri* by PCR.

Key words: *Lactobacillus reuteri*, chickens, isolation, probiotic.

de los animales domésticos, incluidas las aves²⁻⁴. Entre los beneficios se destacan su uso como promotores de crecimiento, la estimulación de la inmunidad, la producción de sustancias antimicrobianas y el mejoramiento de la homeostasis de la microbiota del TGI^{5,6}.

Las bacterias del género *Lactobacillus* se caracterizan por ser bacilos largos y extendidos o muy cortos (coco-

bacilos), inmóviles, Gram positivas, negativas a catalasa y nitrato. Sus colonias son de medianas a pequeñas, convexas, de bordes enteros, opacas y sin pigmentación. Sus requerimientos nutricionales son complejos incluyendo: carbohidratos, aminoácidos, vitaminas y nucleótidos. Transforman la glucosa y otras hexosas en ácido láctico por homofermentación; o en ácido láctico y otros productos adicionales (ácido acético o dióxido de carbono) por heterofermentación. Estas bacterias crecen bajo condiciones microaerofílicas o anaeróbicas con una temperatura que oscila entre los 5 y 53 °C y pueden multiplicarse en medios ligeramente ácidos^{7,8}.

Para que un microorganismo sea considerado probiótico debe cumplir ciertos requisitos como: resistir las condiciones gástricas, inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos, colonizar el intestino, ser inocuo para el animal y estable para su almacenamiento³.

En el año 2006, la Unión Europea prohibió el uso de antibióticos en dosis subterapéuticas como promotores de crecimiento en animales de granja, aunque no todos los países del mundo han adoptado esta medida. La administración de dosis subterapéuticas ha generado el aumento de la resistencia a antimicrobianos cuando deben ser utilizados en forma terapéutica y una mayor incidencia de enfermedades en aves⁹. En Argentina, a partir del año 2019, el SENASA prohibió el uso de antibióticos en alimentos elaborados para animales, de acuerdo con las recomendaciones internacionales, mediante la resolución 1119/18. Por lo tanto, surge la necesidad de buscar nuevas herramientas para reemplazarlos y el uso de los probióticos es una de ellas. Jha y col.⁶ reportan que la utilización de los probióticos ha mejorado diferentes aspectos como: el rendimiento del crecimiento, la digestibilidad en el TGI, la histomorfología intestinal y la inmunidad mediante la modificación de la microbiota. Resultados similares han sido reportados en nuestro país por Blajman y col.⁵, así como también la actividad antibacteriana contra patógenos. Sin embargo, existe evidencia sobre el uso de probióticos importados o provenientes de distintas especies animales que han presentado una baja eficiencia en la producción avícola¹⁰. Esto podría deberse a que una cepa aislada de una especie animal, no necesariamente coloniza el mismo sitio de otra especie. Por lo tanto, la especificidad de especie animal es un factor importante para determinar la colonización y la adhesión *in vivo* en el TGI de este tipo de microorganismos^{7,8}. Teniendo en cuenta lo mencionado, el objetivo de este trabajo fue aislar y caracterizar bacterias ácido lácticas del género *Lactobacillus* provenientes de intestino de pollos parrilleros del partido de Tandil y evaluar su capacidad probiótica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se trabajó con el íleon obtenido en condiciones asépticas de 36 pollos línea Cobb 500® de diferentes edades (24 de 6 días y 12 de 53 días), provenientes de una granja del partido de Tandil, que habían sido anteriormente sacrificados para otro estudio. Posteriormente, se realizó un hisopado del interior de dicha porción del intestino y se colocó en 5 mL de caldo MRS (Britania®, Buenos Aires, Argentina). Se incubó a 37 °C durante 48 h en condiciones de microaerofilia. Luego se tomó una alícuota del cultivo (1 mL) y se almacenó a -80 °C con glicerol al 30 %.

Una ansada del cultivo congelado de las 36 muestras de pollos de distintas edades se sembró en una placa con agar MRS y se incubó de forma similar. Según la morfología se seleccionaron 12 colonias que presentaron

bordes regulares, blancas, circulares, cremosas, convexas y translúcidas^{11,12}. Posteriormente, se efectuó la caracterización fenotípica a cada una de las colonias seleccionadas mediante pruebas bioquímicas básicas, tinción de Gram, prueba de la catalasa, reducción de nitrato y capacidad fermentativa (Tabla 1).

Aquellas cepas que presentaron características fenotípicas correspondientes al género *Lactobacillus*, fueron seleccionadas para evaluar las capacidades probióticas: crecimiento a diferentes temperaturas, tolerancia a sales biliares, crecimiento a distintos pH y actividad antimicrobiana. Para ello, cada una de ellas se reactivó en 5 mL de caldo MRS incubado a 37 °C por 48 h en microaerofilia.

Crecimiento a diferentes temperaturas: una alícuota de 300 µL del cultivo reactivado se colocó en tubos con 3 mL de caldo MRS y se incubó a tres temperaturas diferentes (20 °C, 37 °C y 45 °C) durante 24 h en condiciones de microaerofilia^{4,13}.

Tolerancia a sales biliares: se tomó una alícuota de 300 µL del cultivo y se colocó en tubos con 3 mL de caldo MRS con una concentración de sales biliares al 15 % (N° 3 Britania®) e incubó a 37 °C durante 24 h en condiciones de microaerofilia¹³.

Crecimiento a distintos pH: se colocó una alícuota de 300 µL del cultivo reactivado de cada cepa en 3 mL de caldo MRS con HCl 1N ajustado a diferentes valores de pH: 1, 2, 4, 5 y 6,5. Se incubaron a 37 °C durante 24 h en condiciones de microaerofilia^{4,13}.

Para determinar la viabilidad se realizó una siembra de cada cultivo en agar MRS e incubó durante 48 h a 37 °C en condiciones de microaerofilia. Para determinar la turbidez se consideraron valores de DO menores a 1 (sin turbidez) y mayores a 1 (turbidez).

Actividad antimicrobiana: se realizó según la metodología descrita por Schillinger y Lucke¹⁴. Cada cepa del género *Lactobacillus* se enfrentó con cultivos puros de las cepas *Salmonella* Enteritidis INTA 360 y de *S. gallinarum* biovar *gallinarum* INTA 91 aportadas por el Laboratorio de Bacteriología de INTA EEA Balcarce. Las cepas de *Salmonella* se suspendieron en solución salina con una turbidez de 1 de la escala de McFarland, fueron sembradas masivamente en agar Trypticase de soya (TSA) y una vez solidificado se realizaron pocillos en el agar.

Las cepas de *Lactobacillus* se reactivaron en caldo MRS durante 48 h a 37 °C en condiciones de microaerofilia. Una alícuota del cultivo bacteriano (CB), se centrifugó a 10.000 rpm durante 15 minutos para obtener el sobrenadante libre de células (SLC). Posteriormente, se agregó una alícuota de 100 µL del CB y del SLC en un pocillo y las placas se incubaron a 37 °C durante 24 h en condiciones de aerobiosis. El ensayo se realizó por duplicado para cada cepa.

Caracterización genotípica: el aislamiento presuntivo de *Lactobacillus* fue identificado genéticamente mediante la técnica PCR monoplex para determinación del género *Lactobacillus* spp.¹⁵ y PCR multiplex para las especies *L. casei*, *L. acidophilus*, *L. delbrueckii*, *L. reuteri*, *L. plantarum* y *L. rhamnosus*¹⁶. La extracción de ADN se realizó a partir de 1 mL de cultivo de cada aislamiento individual en caldo MRS a 37 °C durante 24 h. Luego, se utilizó el kit de extracción de ADN para bacterias Gram positivas (Wizard Genomic DNA Purification® Promega).

Tabla 1. Características fenotípicas y pruebas bioquímicas básicas de colonias aisladas a partir de muestras de íleon de pollos de distintas edades.

Colonia	Edad (días)	Catalasa	Gram	Nitratos	Morfología de colonias	Morfología al microscopio
1	6	-	+	-	Blancas, cremosas, convexas	Bacilos pequeños
1.1	6	-	+	-	Translúcidas	Bacilos pequeños
2	6	-	+	-	Blancas, cremosas, convexas	Bacilos cortos
3	6	-	+	-	Blancas, cremosas, convexas	Bacilos cortos
4	53	-	+	-	Blancas, cremosas, convexas translúcidas	Cocos con halo
4.1	53	-	+	-	Blancas, cremosas, convexas, bordes indefinidos	Cocos
5	6	-	+	-	Translúcidas	Bacilos largos/ Bacilos cortos
5.1	6	-	+	-	Blancas, cremosas, convexas	Bacilos/ Cocos en cadena
6	6	-	+	-	Blancas, cremosas, convexas	Bacilos cortos
7	6	-	+	-	Blancas, cremosas, convexas	Bacilos cortos unidos/ Cocos
8	53	-	+	-	Translúcidas	Bacilos cortos unidos/ Cocos
9	6	-	+	-	Blancas, cremosas, convexas	Bacilos
10	6	-	+	-	Blancas, cremosas, convexas	Cocos
11	6	-	+	-	Blancas, cremosas, convexas	Cocobacilos
12	53	-	+	-	Blancas, cremosas, convexas	Bacilos

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De cada muestra de íleon sembrada en agar MRS se observaron diferentes morfologías de colonias. En general, las colonias fueron blancas, circulares, cremosas, convexas y presentaron bordes regulares, aunque también se observó la presencia de algunas colonias translúcidas y solo una presentó bordes indefinidos. Al microscopio se observaron bacilos y cocobacilos. Todas fueron Gram positivas, catalasa negativas, nitrato negativas y homofermentativas (Tabla 1). Estos resultados son similares a los encontrados en otros trabajos^{4,17}, en los cuales se obtuvieron colonias con similares características en muestras de intestino de pollos.

Una vez realizada la caracterización fenotípica de todas las colonias analizadas, se seleccionaron cinco colonias (2, 3, 6, 9 y 12) que presentaron morfología característica del género *Lactobacillus* para evaluar las capacidades probióticas. Se observó que estas cinco colonias crecieron a 20 °C y 37 °C, mientras que solo la colonia N° 6 demostró viabilidad a las tres temperaturas utilizadas en este ensayo (Tabla 2). Rondon y col.⁴ no obtuvieron crecimiento a 15 °C, mientras que Lara Mantilla y Burgos Portacio¹³ observaron crecimiento a 43 °C. Estos datos remarcan la importancia de que la temperatura es un factor que puede afectar la supervivencia de los microorganismos en futuros

ensayos *in vivo* ya que la temperatura corporal normal de los pollos es de 40- 42 °C.

El 80 % (4/5) de las cepas toleraron una concentración de sales biliares de 15 % en concordancia con otros trabajos^{7,13,18} en los cuales se obtuvieron colonias resistentes a la misma concentración de sales biliares (Tabla 2). Sin embargo, Wang y col.¹⁹ reportaron aislamientos resistentes a mayores concentraciones de sales biliares (30 y 50 %).

En cuanto al crecimiento a diferentes pH se observó que a pH 1 y pH 2 no hubo crecimiento en caldo ni en placa, excepto la colonia N° 6 que presentó viabilidad a pH 2. Para verificar la muestra se realizó una coloración de Gram. En los pH 4, 5 y 6,5 se observó crecimiento de todas las cepas tanto en caldo como en placa, excepto la colonia N° 9 que sólo creció a pH 5 en caldo y en placa (Tabla 3). Nuestros resultados coinciden con los de Gutiérrez Ramírez³, Rondon y col.⁴, Lara Mantilla y Burgos Portacio¹³ y Wang y col.¹⁹ quienes obtuvieron cepas que presentaron tolerancia a pH ácidos. Este dato es importante ya que le permitiría sobrevivir a las condiciones gástricas así como también garantizar la llegada en mayor número a los sitios de colonización⁸. Wang y col.¹⁹ también reportaron que a pH 4,0–6,0 el crecimiento de todos los aislamientos no se vio afectado; sin embargo, el crecimiento disminuyó significativamente cuando el pH fue menor a 4.

La colonia N° 6 fue seleccionada como candidata

Tabla 2. Crecimiento a diferentes temperaturas y en sales biliares 15 % de las colonias aisladas a partir de muestras de íleon de pollo.

Colonia	Crecimiento a diferentes temperaturas en caldo y en placa						Crecimiento en sales biliares 15%	
	Caldo MRS			Placa MRS			Caldo MRS	Placa MRS
	20°C	37°C	45°C	20°C	37°C	45°C		
2	S/T	T	S/T	C	C	S/C	T	C
3	T	T	T	C	C	S/C	T	C
6	S/T	T	T	C	C	C	T	C
9	T	T	T	C	C	S/C	T	S/C
12	T	T	T	C	C	S/C	T	C

S/T: sin turbidez; T: turbidez; S/C: sin crecimiento; C: crecimiento.

Tabla 3. Crecimiento a distintos pH de las colonias aisladas a partir de muestras de íleon de pollo.

Colonia	Caldo MRS pH					Placa MRS pH				
	1	2	4	5	6,5	1	2	4	5	6,5
2	S/T	S/T	T	S/T	S/T	S/C	S/C	C	S/C	C
3	S/T	S/T	T	T	T	S/C	S/C	C	C	C
6	S/T	S/T	T	S/T	T	S/C	1 colonia	C	C	C
9	S/T	S/T	S/T	T	S/T	S/C	S/C	S/C	C	S/C
12	S/T	S/T	T	T	T	S/C	S/C	C	C	C

S/T: sin turbidez; T: turbidez; S/C: sin crecimiento; C: crecimiento.

para realizar la prueba de actividad antimicrobiana y caracterización genotípica, ya que fue la única que presentó tolerancia a diferentes temperaturas, concentraciones de sales biliares y ácidas *in vitro*. En consecuencia, esta cepa presentó actividad antagónica contra *Salmonella* Enteritidis y *S. gallinarum* biovar *gallinarum* tanto el CB como el SLC. Los halos de inhibición del CB fueron de 16 mm para las dos serovariedades de *Salmonella*, mientras que en el caso de los SLC se observaron halos de 18 mm en ambos casos. Estos datos coinciden con los reportados por Sánchez y Tromps²⁰, quienes observaron que cepas de *Lactobacillus* aisladas de leche presentaron halos de inhibición similares para *Salmonella* Typhimurium. Si bien no se analizó el mecanismo de acción de la cepa contra las bacterias patógenas, podría estar relacionado con la producción de reuterina, que es un

potente antimicrobiano².

Mediante la prueba de PCR, la colonia N° 6 fue caracterizada como *Lactobacillus reuteri*. Wang y col.¹⁹ y Greppi y col.² reportan que esta especie es la más abundante en el tracto gastrointestinal de los pollos. Sin embargo, en el presente trabajo con pollos de diferentes edades y por ende de diferente maduración intestinal, solo se encontró una colonia que pudo ser identificada como *L. reuteri*.

El presente trabajo describe el aislamiento y la caracterización geno-fenotípica de una cepa de *Lactobacillus reuteri* con capacidad probiótica *in vitro* frente a condiciones gástricas simuladas como así también la actividad antimicrobiana contra *Salmonella* Enteritidis y *S. gallinarum* biovar *gallinarum*. Estos resultados tienen gran impacto y valor agregado porque aportan conocimientos en medicina veterinaria

sobre el uso de una cepa probiótica como posible herramienta para el reemplazo del uso de antibióticos que se usan como promotores de crecimiento en la producción avícola, así como también para proteger la salud de las aves contra estas dos serovariedades de *Salmonella*. Sería necesario realizar estudios *in vivo* para evaluar la adherencia al intestino de la cepa, así

como también la producción de reuterina, que es un potente sistema antimicrobiano.

Conflictos de interés

Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

REFERENCIAS

1. FAO. Probióticos en los alimentos. Propiedades saludables y nutricionales y directrices para la evaluación. ESTUDIO FAO ALIMENTACIÓN Y NUTRICIÓN. 2006.
2. Greppi A, Asare PT, Schwab C, Zemp N, Stephan R, Lacroix C. Aislamiento y análisis genómico comparativo de *Lactobacillus reuteri* productor de reuterina del tracto gastrointestinal del pollo. *Front Microbiol* 2020; 4; 11:1166.
3. Gutiérrez Ramírez LA, Montoya OI, Vélez Zea JM. Probióticos: una alternativa de producción limpia y de remplazo a los antibióticos promotores de crecimiento en la alimentación animal. *Prod + Limpia* 2013; 8: 135–146.
4. Rondón AJ, Samaniego LM, Bocourt R, Rodríguez S, Milián G, Ranilla MJ, Laurencio M, Pérez M. Aislamiento, identificación y caracterización parcial de las propiedades probióticas de cepas de *Lactobacillus* sp. procedentes del tracto gastrointestinal de pollos de ceba. *Cienc y Tecnol Aliment* 2008; 6: 56–63.
5. Blajman JE, Zbrun MV, Astesana DM, Berisvil AP, Scharpen AR, Fusari ML y col. Probióticos en pollos parrilleros: Una estrategia para los modelos productivos intensivos. *Rev Argent Microbiol* 2015; 47: 360–367.
6. Jha R, Das R, Oak S, Mishra P. Probióticos (microbios de alimentación directa) en la nutrición de las aves de corral y sus efectos sobre la utilización de nutrientes, el crecimiento y el rendimiento de la puesta, y la salud intestinal: una revisión sistemática. *Animals* 2020; 10: 1–18.
7. Ávila J, Ávila M, Tovar B, Brizuela M, Perazzo Y, Hernández H. Capacidad probiótica de cepas del género *Lactobacillus* extraídas del tracto intestinal de animales de granja. *Rev Científica* 2010; 20: 161–170.
8. Frizzo LS, Soto LP, Bertozzi E, Sequeira G, Marti LE, Rosmini MR. Evaluación *in vitro* de las capacidades probióticas microbianas orientadas al diseño de inóculos probióticos multiespecie para ser utilizados en la crianza de terneros. *FAVE Sección Ciencias Veterinarias*. 2006;5(1/2):69-81.
9. Ardoino SM, Toso RE, Alvarez, HL, Mariani EL, Cachau PD, Mancilla MV y col. Antimicrobianos como promotores de crecimiento (AGP) en alimentos balanceados para aves: uso, resistencia bacteriana, nuevas alternativas y opciones de reemplazo. *Cienc Vet* 2017; 19: 50–66.
10. Rosmini MR, Sequeira GJ, Guerrero-Legarreta I, Martí LE, Dalla-Santina R, Frizzo L y col. Producción de probióticos para animales de abasto: importancia del uso de la microbiota intestinal indígena. *Rev Mex Ing Quim* 2004; 3: 181-191.
11. Ramírez Baca P, García Cansino B, Moreno Hernández E, Ríos Carmona JM, Rodríguez Cisneros C, Vásquez Arroyo J y col. Morfología y diferenciación de colonias de tres tipos de bacterias lácticas. *Revista agraria Nueva Época*. 2009, 6: 14-18.
12. Rodríguez Haro I, Salazar Castillo M, Villalobos Infante E. *Lactobacillus spp* del tracto intestinal de *Gallus gallus* con potencial probiótico. *REBIOL* 2012, 62-72.
13. Lara Mantilla C, Burgos Portacio A. Potencial probiótico de cepas nativas para uso como aditivos en la alimentación avícola. *Rev Colomb Biotecnol* 2012; 14: 31–40.
14. Schillinger U, Lücke FK. Actividad antibacteriana de *Lactobacillus sake* aislado de la carne. *Appl. Environ Microbiol* 1989; 55: (8):1901-1906.
15. Dubernet S, Desmasure N, Gueguen M. Un método basado en PCR para la identificación de lactobacilos a nivel de género. *FEMS Microbiol Lett* 2002; 214: 271–275.
16. Kwon HS, Yang EH, Yeon SW, Kang BH, Kim TY. Identificación rápida de especies probióticas de *Lactobacillus* mediante PCR múltiple utilizando cebadores específicos de cada especie basados en la región que se extiende desde el ARNr 16S hasta el ARNr 23S. *FEMS Microbiol Lett* 2004; 239: 267–275.
17. Haro IR, Castillo MS, Infante EV. *Lactobacillus spp.* del tracto intestinal de *Gallus gallus* con potencial probiótico. *REBIOL* 2012; 2(2):62-72.
18. Zamudio KL., Zavaleta AI. Estudio del potencial probiótico de lactobacilos aislados de fuentes naturales. *Cienc Invest* 2003; 6: 30–35.
19. Wang L, Fang M, Hu Y, Yang Y, Yang M, Chen Y. Caracterización de las especies de *Lactobacillus* más abundantes en el tracto gastrointestinal de pollos y su potencial uso como probióticos para ingeniería genética. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2014; 46: 612–619.
20. Sánchez L, Tromps J. Caracterización *in vitro* de bacterias ácido lácticas con potencial probiótico. *Rev Salud Anim* 2014; 36: 124–129.



Este artículo está bajo una Licencia Creative Commons. Atribución-No Comercial-Sin Derivadas 4.0 Internacional <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es>