



# *Lactobacillus* spp. del tracto intestinal de *Gallus gallus* con potencial probiótico

## *Lactobacillus* spp. of *Gallus gallus* intestinal-tract with probiotic potential

Icela Rodríguez Haro<sup>1</sup>, Marco Salazar Castillo<sup>2</sup> y Eduard Villalobos Infante<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Bacteriología, Departamento de Microbiología y Parasitología. <sup>2</sup>Laboratorio de Bromatología, Departamento de Química Biológica y Fisiología Animal. <sup>3</sup>Exalumno de la Escuela AP de Microbiología y Parasitología. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo. Perú.

### RESUMEN

Con el propósito de aislar *Lactobacillus* con potencial probiótico se examinaron 20 muestras de las regiones del íleon, ciego y colon de pollos de corral de 10 a 15 días de nacidos. Se aislaron 23 cultivos con morfología de las colonias compatibles con *Lactobacillus*, de los cuales 14 fueron identificados por sus características morfológicas, tintoriales y bioquímicas como pertenecientes al género *Lactobacillus*. Se realizaron pruebas in vitro para determinar su potencial probiótico que consistieron en: crecimiento en medios hostiles (caldo MRS acidificado a pH 3.5 y 2.5 y caldo MRS con 0.3% de sales biliares), pruebas de virulencia (actividad de gelatinasa y hemolítica), coagulación de la leche y actividad antimicrobiana contra *Salmonella enterica* ATTC 14028. Se encontraron 10 cultivos de *Lactobacillus* spp con potencial probiótico in vitro manifestando crecimiento en medios hostiles, no presentaron actividad de gelatinasa ni hemolítica, coagularon la leche y presentaron actividad antimicrobiana contra el patógeno de prueba. Se concluye que el tracto intestinal de pollos constituye una fuente natural importante de *Lactobacillus* spp. con potencial probiótico.

**Palabras clave:** *Lactobacillus*, probióticos, tracto intestinal, *Gallus gallus*

### ABSTRACT

*Lactobacillus* with probiotic potential was isolated of 20 samples of the intestinal regions of the ileum, caecum and colon of range of chickens, aged 10 to 15 days. Twenty three cultures were isolated with morphology of the compatible colonies with *Lactobacillus*, of which 14 were identified by their morphological, dye and biochemical characteristics as belonging to the gender *Lactobacillus*. They were carried out tests in vitro to determine their probiotic potential that consisted in: growth in hostile means (broth MRS acidified to pH 3.5 and 2.5 and broth MRS with 0.3% of bile salts), tests of virulence (gelatinase and hemolytic activity), clotting of the milk and antimicrobial activity against *Salmonella enterica* ATTC 14028. Ten cultivations of *Lactobacillus* spp were found with probiotic potential in vitro manifesting growth in hostile means, they didn't present gelatinase activity neither hemolytic, they coagulated the milk and presented antimicrobial activity against the test pathogen. In conclusion the intestinal tract of chickens constitutes an important natural source of *Lactobacillus* spp with probiotic potential.

**Keywords:** *Lactobacillus*, probiotics, intestinal tract, chicken

### INTRODUCCIÓN

Los probióticos son definidos como un suplemento alimenticio que beneficia la salud del hospedero. Generalmente es considerado que éstos llevan a cabo un mejoramiento en el balance microbial. Sin embargo cada vez es más claro el beneficio que estos tienen en la salud vía inmunidad. El tracto gastrointestinal cumple varias funciones tales como la absorción y digestión de nutrientes. Una de estas es que el intestino es hospedero de una compleja mezcla de microbios, estos son parte de nuestra microflora los cuales juegan un papel importante en la salud. *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* son una fuerte asociación que mantiene el balance microbial de los intestinos <sup>1</sup>.

Gran parte del sistema inmune está dedicado a proteger el tracto gastrointestinal, por eso existen sistemas adicionales que protegen el sistema digestivo. Un elemento clave en la defensa del sistema digestivo es la microflora endógena. Las bacterias benéficas compiten con los patógenos por los sitios de adhesión y por nutrientes, es por ello que se necesita de nuevos enfoques para limitar la concentración de patógenos en el tracto gastrointestinal <sup>2</sup>.

Cuando nacen los polluelos su intestino prácticamente está estéril, desarrollándose su flora intestinal durante las primeras semanas de vida, donde predominan bacterias del género *Lactobacillus*, *Enterococcus* y *Bacillus*, esta flora autóctona es específica y está determinada por las condiciones físicas y químicas existentes en su aparato digestivo. Por esta razón es importante el uso de probióticos para desarrollar en el ave una colonización microbiológica efectiva del tracto digestivo <sup>3</sup>.

Las vías digestivas de las aves así como las de los mamíferos, albergan una flora microbiológica fuerte. Este ecosistema digestivo está en equilibrio y permanece normalmente constante durante toda la vida de un animal adulto. Pero este equilibrio se puede perturbar, cuando el ave sufre agresiones: estrés, desequilibrios nutricionales, vacunaciones, suministro masivo de antibióticos y sustancias que perturban el valor del pH del intestino. Entonces, los factores que perturban el equilibrio de la flora intestinal, tienen una repercusión en la salud del animal <sup>4,5</sup>.

Existen al menos 400 especies bacterianas en el GTI, de los cuales se conocen solamente el 15 % de ellas. Esta flora, participa activamente de todos los fenómenos digestivos, nutricionales y sanitarios de las aves. Debe existir permanentemente un equilibrio entre el tipo de flora que se genera, la integridad de la mucosa intestinal y la dieta de los animales. Si se rompe este equilibrio, puede llevar a una lesión o enfermedad <sup>6</sup>.

En un estudio usando un probiótico obtenido a partir del epitelio de la mucosa del ciego de pollos libres de patógenos de la *Salmonella*. El probiótico utilizado fue destacado como una biota acción del controlador o inhibidor de microorganismos patógenos, las aves mostraron un mejor desempeño en comparación con los tratamientos de control. En general, independientemente de los tratamientos empleados en este experimento, se produjo mejores tasas de crecimiento de las aves en relación a la línea estándar que se utiliza <sup>7,8</sup>.

Los probióticos son productos naturales que utilizados como promotores del crecimiento en los animales permiten obtener mayores rendimientos, más elevada resistencia inmunológica y reducida cantidad de patógenos en el tracto gastrointestinal (TGI). Estas bacterias representadas por *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaris*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium infantis* y otros microorganismos beneficiosos, son la primera línea de defensa del cuerpo contra los microorganismos potencialmente dañinos que se inhalan o se ingieren <sup>4</sup>.

El papel más importante de las bacterias probióticas es actuar en resistencia en contra de la colonización de agentes exógenos, patógenos potenciales. *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* son bacterias Gram positivas productoras de ácido láctico, constituyentes de una gran parte de la microflora intestinal en animales. Por un microorganismo patógeno en acción actúa un probiótico, si este no es tóxico o causa enfermedad el probiótico debe ser capaz de resistir los ácidos y la bilis, así como el proceso de digestión del estómago del animal, el individuo que es capaz de establecerse y colonizar los intestinos; es cuando el probiótico establece la habilidad de inhibir el crecimiento de los patógenos.

Son muchas las bacterias y levaduras que se pueden usar de forma beneficiosa para mantener una flora digestiva sana y en equilibrio. Los microorganismos más usados son *Lactobacillus sp*, *Sreptococcus faecium*, *Bacillus subtilis*, *B. cereus*, *B. licheniformis*, *B. stearothermophyllus* y *Saccharomyces cerevisiae*. Los *Lactobacillus* crecen rápidamente en el intestino son quizás los más conocidos, se trata de bacterias que pueden transformar la lactosa en ácido láctico. Este aumento de ácido láctico disminuye el pH intestinal a unos niveles tan bajos así como disminuye la supervivencia de microorganismos como *E. coli*, *Salmonellas* entre otros <sup>4</sup>.

El ácido láctico que producen las bacterias del género *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* ayudan a controlar las bacterias patógenas como *Salmonellas*, *E. coli*, enteritis, al establecer un pH bajo <sup>9</sup>. Los probióticos producen ácido láctico y ácido acético los cuales crean una alteración del pH que funcionan como un antiséptico del sistema digestivo y al mismo tiempo minimiza la proliferación de microorganismos patógenos, al competir por nutrientes y alojamiento en las paredes intestinales <sup>10</sup>.

Los lactobacilos crecen bien en medios ligeramente ácidos, con pH inicial de 6,4 - 4,5. La mayoría de las cepas de *Lactobacillus* son principalmente aerotolerantes; su crecimiento óptimo se alcanza bajo condiciones microaerófilicas o anaeróbicas. La mayor parte de los lactobacilos son mesófilos (30

- 40°C), con un límite superior de 40°C. Aunque su rango de temperaturas para el crecimiento oscila entre 2 y 53°C. Los miembros de este género transforman la glucosa y las hexosas aldehídicas similares, los carbohidratos que producen estos azúcares simples y los alcoholes polihidroxílicos en ácido láctico por homofermentación o bien, en ácido láctico y otros productos finales adicionales como ácido acético, etanol, dióxido de carbono, ácido fórmico y ácido succínico <sup>11</sup>. *L. acidophilus* es una bacteria gram positiva dominante en el intestino delgado, donde se produce la mayor parte de la digestión, mientras que *Bifidobacterium bifidum* reside en el intestino grueso donde se procesan los desechos para ser evacuados<sup>10</sup>.

Los productos de exclusión competitiva BROILACT, AVIGARD y AVIFREE entre otros, se destacan por su demostrada eficiencia probiótica en las crianzas avícolas. Dichas mezclas están formadas, fundamentalmente, por bacterias ácido lácticas<sup>12,13</sup>. Las diferentes cepas de *Lactobacillus* han demostrado proteger a los pollos de patógenos como *Salmonella spp.* y tener un efecto protector sobre la carne de pollo cruda contra la *Listeria monocytogenes* y *S. enteritidis*. Una reducción de la enteritis necrótica por *C. perfringens* se hizo evidente tras la administración de *L. johnsonii* FI978531.

Cada vez es mayor el uso de probióticos en la avicultura, en general, la razón de esto hay que buscarla en el amplio abanico de ventajas que ofrece su uso. Debido a que los probióticos son de origen natural, seguros, generalmente estable, no producen efectos acumulativos y provienen del tracto intestinal de la misma especie animal para las cuales van a ser usadas <sup>15,16</sup>.

Los documentos revisados hacen referencia a trabajos realizados en diferentes países las cuales están ajustados a sus realidades tanto ecológicas como sociales, sin embargo no se ha encontrado referencias de trabajos que se hallan ejecutado en nuestro país al respecto, razón por la cual surge el propósito y la necesidad de buscar continuamente cepas probióticas autóctonas, mejor adaptadas a las necesidades nacionales y con características específicas que contribuyan al mejoramiento de la sanidad animal regional y del Perú. Por ello resultó la pregunta ¿Presenta el tracto intestinal de *Gallus gallus* “pollo” de corral *Lactobacillus spp.* con potencial probiótico. Debido a que se ha logrado aislar probióticos a partir de productos lácteos, flora intestinal del ser humano y animales sanos, se afirma que sí será posible encontrar *Lactobacillus spp.* con potencial probiótico del tracto intestinal de pollos de corral.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Material biológico

Tracto intestinal de pollos de 20 ejemplares de pollo de 10 a 15 días de nacidos, alimentados con una dieta sin antibiótico y sacrificados por asfixia. De estas aves se extrajeron el intestino delgado (íleon) y el intestino grueso (el ciego y el colon) y se colectó un fragmento de cada uno de estos órganos<sup>15</sup>.

### Enriquecimiento de la muestra

Las muestras colectadas fueron sembradas en medio de enriquecimiento - caldo Man Rogosa Sharpe (MRS) <sup>17</sup>, luego se incubó a 37°C por 12 horas en condiciones de microaerofilia por el método de la vela <sup>18</sup>.

### Aislamiento de *Lactobacillus spp.*

Se realizaron diluciones de la muestra hasta 10<sup>-3</sup> en solución salina fisiológica peptonada estéril, en las cuales se sembraron por estría en agar Man Rogosa Sharpe (MRS) <sup>17</sup> a pH 5.5, se incubó por 48 horas a 37°C en atmósfera de microaerobiosis entre 5 - 8% de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) por el método de la vela.

### Selección e identificación preliminar de *Lactobacillus spp.*

Se realizó teniendo como base las características morfológicas de las colonias, morfológicas individuales y tintoreales de las bacterias, para ello se sembró los cultivos puros en agar MRS inclinado. Luego, de cada cultivo puro se realizaron las tinciones Gram, Ziehl-Neelsen y Wirtz, prueba de la catalasa con peróxido de hidrógeno al 3%, prueba de oxidasa y prueba de movilidad <sup>17</sup>.

### Identificación bioquímica de *Lactobacillus spp.*

Los cultivos puros fueron sometidos a las siguientes pruebas bioquímicas: producción de ácido y gas a partir de la glucosa, formación de H<sub>2</sub>S, producción de indol, movilidad, y prueba de oxidación-fermentación, fermentación de la glucosa que están indicadas en el Bergey's Manual of Determinative Bacteriology <sup>17</sup>.

### Producción de ácido y gas a partir de glucosa

Los cultivos puros fueron sembrados en caldo base MRS con glucosa 1%, indicador púrpura de bromocresol y campanas Durham <sup>18</sup>, se incubó a 37°C por 24 – 48 horas; el cambio de color del medio de púrpura a amarillo y la presencia de gas se tomó como una reacción positiva.

#### **Producción de sulfuro de hidrógeno, indol y movilidad**

Los cultivos puros fueron sembrados en el medio Movilidad- Indol- Ácido Sulhídrico (SIM) <sup>17</sup>, se incubó a 37°C por 24 horas y las lecturas se realizaron por la presencia del color negro, reacción al reactivo de Kovac y turbidez.

#### **Fermentación de la glucosa**

Los cultivos puros fueron sembrados en el medio de Oxidación-Fermentación (O/F) según Hugh y Leifson suplementado con glucosa <sup>17</sup>, se incubó a 37°C por 24 horas y las lecturas se realizaron por el viraje del indicador.

#### **Pruebas para determinar el potencial probiótico in vitro de *Lactobacillus* spp:**

- **Crecimiento en pH ácido**

Los cultivos puros, previamente estandarizados a una concentración igual al tubo N° 0,5 de Mac Farland ( $1,5 \times 10^8$  bact/mL), fueron sembrados en caldo MRS a pH 3,0, se incubó a 37°C por 4h y 24h en microaerobiosis. Luego, se realizó recuentos de las unidades formadoras de colonia por mililitro (ufc/mL) en agar MRS. Se consideró como prueba positiva al pH ácido, a aquellos cultivos que mostraran más del 50% de sobrevivencia a éstas condiciones extremas.

- **Crecimiento en sales biliares**

Los cultivos puros previamente estandarizados a la concentración igual al tubo N° 0,5 de Mac Farland ( $1,5 \times 10^8$  bact/mL), fueron cultivados en caldo MRS con 0,3% de sales biliares, se incubó por 4 y 24 h a 37°C en condiciones de microaerobiosis. Luego, se realizaron recuentos de las unidades formadoras de colonia por mililitro (ufc/mL) en agar MRS. Se consideró como prueba positiva de las sales biliares, a aquellos cultivos que mostraran más del 50% de sobrevivencia a éstas condiciones extremas.

#### **Pruebas para determinar factores de virulencia**

- **Actividad gelatinasa**

Los cultivos puros fueron sembrados en medio Gelatina Nutritiva <sup>17</sup>, se incubaron a 37°C por 24 hs en microaerobiosis. Luego se realizó la lectura colocando los cultivos en refrigeración (5°C) por 2 horas y se observará si se produce licuefacción.

- **Producción de hemolisinas**

Los cultivos puros fueron sembrados por estría en agar Sangre de carnero al 5% <sup>17</sup> y se incubó a 37°C por 48h en condiciones de microaerobiosis. Luego se realizó la lectura observando la presencia de hemólisis.

- **Prueba de capacidad de coagulación de la leche**

Los cultivos puros fueron sembrados en leche estéril, se incubó a 37°C. La lectura se realizó observándose la formación de un coágulo uniforme a partir de las 4 horas <sup>18</sup>.

- **Actividad antimicrobiana**

Se realizó por el método de difusión en agar <sup>18</sup>. Para ello se utilizaron placas Petri conteniendo el medio Brain Heart Infusion (BHI) con agar al 1%, sobre este medio se sembró 70 µL de *Salmonella enterica* ATCC 14028 (bacteria de prueba, previamente estandarizada a una concentración igual al tubo N° 0,5 de Mac Farland -  $1,5 \times 10^8$  bact/mL), contenido en 8mL de BHI + agar al 0,8%, se secaron las placas y se llevaron a refrigeración (5°C) por 30 minutos y luego se practicaron hoyos de 5mm de diámetro en la superficie del medio.

Los cultivos de *Lactobacillus* spp fueron sembrados en caldo MRS por 12 horas a 37°C, se centrifugaron y los sobrenadantes fueron ajustados a un pH entre 6,5 y 7,0; se filtró y se tomó de cada uno, alícuotas de 50 µL colocándolas en los respectivos hoyos. Se incubaron a 37°C por 18 - 24 horas y la lectura se realizó midiendo el diámetro de los halos de inhibición del crecimiento de la bacteria de prueba en milímetros (mm).

El control positivo de inhibición de crecimiento se realizará con solución de fenol al 40 % y el control negativo con suero salino estéril.

Los *Lactobacillus* spp con potencial probiótico, aislados del tracto intestinal de *G. gallus* "pollo", fueron aquellos cultivos de *Lactobacillus* spp que sobrevivieron a la acidez de pHs 2,5 y 3,5; sales biliares al 0,3%; no producen gelatinasa ni hemolisinas, presentan capacidad de

coagulación de la leche y una actividad antimicrobiana con un halo de inhibición igual o mayor de 8 mm.

### **Conservación de los cultivos puros**

Los cultivos puros fueron sembrados en agar MRS inclinado, se incubaron a 37°C por 16 a 48 horas en condiciones de microaerobiosis, luego se rotularon y se sometieron a refrigeración a menos 10°C para su conservación.

### **Control de calidad**

- **Control de esterilidad de los medios de cultivo.**

Los medios de cultivo usados en el presente trabajo, fueron autoclavados a 121°C por 15 minutos a 15 libras de presión. El control del proceso de esterilización se realizó usando la cinta para control de vapor húmedo 3M, después del proceso de esterilización los medios fueron servidos en condiciones de asepsia en placas Petri estériles, luego se seleccionaron de 2 o 3 placas al azar y se incubaron a 37°C por 24 horas, para el control de esterilidad de los medios preparados.

- **Control de eficiencia de los medios de cultivo.**

Se realizó sembrando cepas de *Lactobacillus acidophilus* – *Lactobacillus bulgaricus* - Vacuna GEL NB Probiótica, Normalizador Biológico de la Flora Intestinal - Laboratorios LMB H. COLICHÓN, dichas cepas después de ser sembradas, manifestaron crecimiento óptimo en los medios de cultivo empleados.

## **RESULTADOS**

La Tabla 1 muestra a 23 cultivos con características morfológicas y tintoriales de *Lactobacillus* spp aislados del tracto intestinal *de* pollo; la morfología de las colonias fue diversa, circulares de borde regular de aspecto cremoso o seco, algunas puntiformes. En la morfología individual se observaron bacilos y cocos, Gram positivos y negativos y todos fueron inmóviles, no esporulados y ácido alcohol sensibles.

La Tabla 2 muestra a 14 cultivos con características bioquímicas de cultivos de *Lactobacillus* spp. Todos los cultivos fueron catalasa, oxidasa, producción de indol y H<sub>2</sub>S negativos, fermentan la glucosa y producen ácido y 9 cultivos producen gas.

La Tabla 3 muestra que los 14 cultivos *Lactobacillus* spp. crecen en medios hostiles de cultivos en pH 2,5 y 3,5 a las 4 y 24 horas de incubación y en sales biliares al 0,3% tanto a las 4 como a las 24 horas de incubación.

La Tabla N° 4 muestra 10 cultivos de *Lactobacillus* spp. que no tienen virulencia, 4 cultivos presentaron actividad hemolítica y todos los cultivos de *Lactobacillus* spp tienen la capacidad de coagular la leche.

La Figura 1 muestra la actividad antimicrobiana de 10 cultivos de *Lactobacillus* spp. contra *Salmonella entérica* ATCC 14028, donde se observa que todos presentan diferente actividad antimicrobiana con halos de inhibición de crecimiento que van desde 6,6 hasta 13,2 mm respectivamente. También se puede observar que los cultivos que presentaron mayor actividad antimicrobiana corresponden a *Lactobacillus* spp Lb- 04, Lb- 7, Lb- 28 y Lb- 09 con 13,2; 12,8; 12,6 y 12,4 mm de diámetro de inhibición respectivamente.

La Tabla 5, muestra el número y porcentaje de cultivos de *Lactobacillus* spp con potencial probiótico seleccionados en base a la sobrevivencia a la acidez de pH 2,5 y 3,5; a las sales biliares al 0,3%; a la no producción de gelatinasa ni hemolisinas y a la actividad antimicrobiana contra *Salmonella enterica* ATCC14028 con un halo de inhibición igual o mayor de 8 mm, habiéndose aislado 10 cultivos de *Lactobacillus* spp con potencial probiótico que corresponde al 71,50% del total de cultivos de *Lactobacillus* spp aislados.

**Tabla 1:** Características morfológicas y tintoriales de cultivos de *Lactobacillus spp* aislados del tracto intestinal de *Gallus gallus* “pollo”.

Cultivo puro N°	Características morfológicas					
	Colonia	Individual			Tintoriales	
		Forma	Movilidad	Esporas	Gram	BAAR
1	Regular cremosa, convexa	bacilo	-	-	+	-
2	Regular cremosa, convexa	bacilo	-	-	+	-
4	Regular puntiforme, convexa	bacilo	-	-	+	-
6	Regular cremosa, convexa	bacilo	-	-	+	-
7	Regular cremosa, convexa	bacilo	-	-	+	-
8	Regular cremosa, convexa	bacilo	-	-	+	-
9	Regular cremosa, convexa	bacilo	-	-	+	-
10	Regular cremosa, convexa	bacilo	-	-	+	-
11	Regular cremosa, convexa	bacilo	-	-	+	-
13	Regular cremosa, convexa	bacilo	-	-	+	-
14	Regular cremosa, convexa	bacilo	-	-	+	-
16	Regular cremosa, convexa	bacilo	-	-	+	-
17	Regular cremosa, convexa	bacilo	-	-	+	-
18	Regular cremosa convexa	bacilo	-	-	+	-
21	Regular cremosa, convexa	bacilo	-	-	+	-
22	Regular cremosa, convexa	bacilo	-	-	+	-
23	Regular seca, convexa	bacilo	-	-	+	-
24	Regular seca, convexa	bacilo	-	-	+	-
27	Regular seca, convexa	bacilo	-	-	+	-
28	Regular cremosa, convexa	bacilo	-	-	+	-
31	Regular cremosa, convexa	bacilo	-	-	+	-
33	Regular cremosa, convexa	bacilo	-	-	+	-
34	Regular cremosa, convexa	bacilo	-	-	+	-

-: reacción negativa; +: reacción positiva; BAAR: Bacilo ácido alcohol resistente

## DISCUSIÓN

Las colonias seleccionadas para la identificación de *Lactobacillus spp* fueron aquellas de bordes regulares, blancas sin pigmentos, circulares, cremosas, convexas y con márgenes enteros, coincidiendo con la descripción del género *Lactobacillus*. Algunas de las colonias aisladas presentaron morfología de los *Lactobacillus* contenidos en la ampolla comercial GEL NB.

Durante muchas décadas la diferenciación entre géneros se ha basado en las características fenotípicas. El género *Lactobacillus* se observa generalmente como bacilos Gram positivos, no esporulados y ácido alcohol sensibles (Tabla 1); sin embargo la morfología celular dentro del mismo género varía mucho ya que pueden presentarse formas bacilares largas, cortas, rectas, ligeramente curvadas o cocobacilares dependiendo de las especies y subespecies.

Con los cultivos aislados, a fin de procurar identificar si pertenecían al género *Lactobacillus*, se realizaron las pruebas bioquímicas indicadas en la metodología. Se encontró que casi todos los cultivos presentaron las características propias del género *Lactobacillus*, es decir: producción positiva de ácido a partir de glucosa y lactosa, catalasa y oxidasa negativos, producción de indol, gas y sulfuro de hidrógeno negativos<sup>19-20</sup> (Tabla 2). La producción de H<sub>2</sub>S son usualmente negativos a excepción de algunas especies.

Teniendo en cuenta el efecto de diversos valores de pH sobre el crecimiento de los cultivos de *Lactobacillus* aislados, se estudiaron condiciones de acidez que simulaban las condiciones del tracto digestivo en aves. Los resultados obtenidos en este trabajo revelan que todos los cultivos de *Lactobacillus* aislados (14) resistieron a las condiciones extremas de pH 2,5 y 3,5 durante 4 y 24 horas (Tabla 3) lo cual permite afirmar que dichos cultivos podrían pasar a través del estómago al intestino, completamente viables. Esta capacidad de resistir o tolerar el pH ácido no está claramente dilucidada y es atribuida a la probable presencia de un gradiente constante entre el pH extracelular y el citoplasmático de las bacterias. Se ha encontrado que cultivos de *Lactobacillus* aislados de leche

**Tabla 2:** Características Bioquímicas de cultivos de *Lactobacillus* spp. aislados del tracto intestinal de *Gallus gallus* "pollo".

Cultivo puro N°	Características bioquímicas						
	Oxidasa	Catalasa	Acidez	Gas	H <sub>2</sub> S	Indol	O/F- Glucosa
1	-	-	+	+	-	-	Fermentativo
2	-	-	+	+	-	-	Fermentativo
4	-	-	+	-	-	-	Fermentativo
6	-	-	+	+	-	-	Fermentativo
7	-	-	+	-	-	-	Fermentativo
8	-	-	+	-	-	-	Fermentativo
9	-	-	+	-	-	-	Fermentativo
10	-	-	+	-	-	-	Fermentativo
11	-	-	+	+	-	-	Fermentativo
13	-	-	+	+	-	-	Fermentativo
14	-	-	+	-	-	-	Fermentativo
16	-	-	+	+	-	-	Fermentativo
17	-	-	+	+	-	-	Fermentativo
18	-	-	+	-	-	-	Fermentativo
21	-	-	+	-	-	-	Fermentativo
22	-	-	+	-	-	-	Fermentativo
23	-	-	+	-	-	-	Fermentativo
24	-	-	+	+	-	-	Fermentativo
27	-	-	+	-	-	-	Fermentativo
28	-	-	+	-	-	-	Fermentativo
31	-	-	+	+	-	-	Fermentativo
33	-	-	+	-	-	-	Fermentativo
34	-	-	+	-	-	-	Fermentativo

- : reacción negativa; + : reacción positiva; O/F : Oxidativo/fermentativo

**Tabla 3:** Características Probióticas: Crecimiento en medios hostiles de cultivos de *Lactobacillus* spp. aislados del tracto intestinal de *Gallus gallus* "pollo".

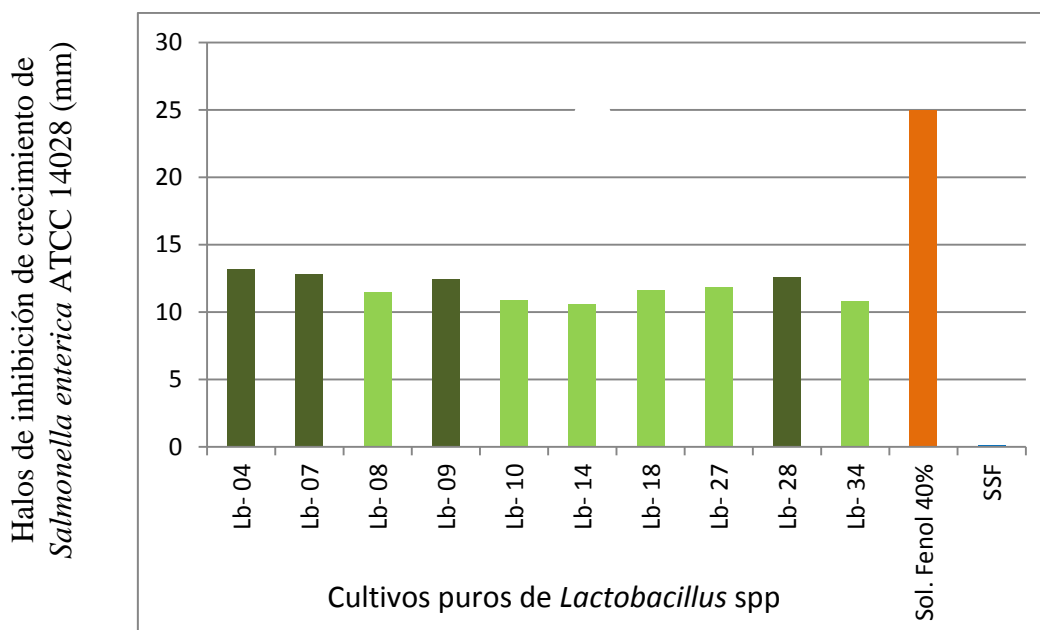
Cultivo puro N°	Crecimiento en medios hostiles					
	pH 2,5		pH 3,5		Sales biliars 0,3%	
	4 hrs.	24 hrs.	4 hrs.	24 hrs.	4 hrs.	24 hrs.
4	+	+	+	+	+	+
7	+	+	+	+	+	+
8	+	+	+	+	+	+
9	+	+	+	+	+	+
10	+	+	+	+	+	+
14	+	+	+	+	+	+
18	+	+	+	+	+	+
21	+	+	+	+	+	+
22	+	+	+	+	+	+
23	+	+	+	+	+	+
27	+	+	+	+	+	+
28	+	+	+	+	+	+
33	+	+	+	+	+	+
34	+	+	+	+	+	+

- : no crecimiento; + : crecimiento (turbidez)

**Tabla 4:** Características Probióticas: Pruebas de virulencia de cultivos de *Lactobacillus spp.* aislados del tracto intestinal de *Gallus gallus* “pollo”.

Cultivo puro N°	PRUEBAS		
	De virulencia		Capacidad de coagulación de la leche
	Gelatinasa	Actividad hemolítica	
4	-	-	+
7	-	-	+
8	-	-	+
9	-	-	+
10	-	-	+
14	-	-	+
18	-	-	+
21	-	+	+
22	-	+	+
23	-	+	+
27	-	-	+
28	-	-	+
33	-	+	+
34	-	-	+

- : reacción negativa; + : reacción positiva (hemólisis)



**Fig 1:** Actividad antimicrobiana contra *Salmonella enterica* ATCC 14028 de los sobrenadantes de cultivos de *Lactobacillus spp.* aislados del tracto intestinal de *Gallus gallus* “pollo”.

fermentada, sobrevivieron después de ser incubados in vitro en una solución a pH 3 durante 3 horas, mientras que otras cepas no lograron sobrevivir; este mismo resultado fue posteriormente confirmado en humanos, encontrándose que el 30% de *Lactobacillus* consumidos por vía oral eran luego encontrados vivos en las heces <sup>21</sup>.



**Tabla 5:** Número y porcentaje de cultivos de *Lactobacillus* spp con potencial probiótico aislados del tracto intestinal de *Gallus gallus* “pollo”.

Cultivos aislados	Nº	%
<i>Lactobacillus</i> spp con potencial probiótico	10	71,50
<i>Lactobacillus</i> spp sin potencial probiótico	4	28,50
Total	14	100,00

La resistencia a las sales biliares es una característica importante en cepas que serán denominadas probióticas <sup>22</sup>. En el presente estudio todos los cultivos evaluados demostraron tolerar y crecer en presencia de 0.3% de sales biliares durante 4 y 24 horas (Tabla 3). Se menciona que el promedio de concentración de sales biliares es alrededor de 0.3% que puede llegar hasta 2.0% durante la primera hora de digestión. Este efecto ha sido investigado por diferentes investigadores <sup>23</sup> y se cree que las BAL de los géneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* y *Streptococcus* son capaces de producir la enzima conocida como *sal biliar hidrolasa* (SBH), que cataliza la hidrólisis de las sales biliares conjugadas con glicina y taurina. Esta desconjugación pudiera ocurrir en la fase estacionaria del crecimiento bacteriano, ya que la actividad de la SBH se incrementa al disminuir el pH por producción de gran cantidad de ácidos orgánicos <sup>24</sup>. Al respecto existen opiniones encontradas, hay autores que sugieren que la presencia de esta actividad hidrolítica para las sales biliares no es deseable en una bacteria probiótica, ya que podría disminuirse la concentración de sales conjugadas a niveles por debajo de las necesarias para la óptima digestión y absorción de los lípidos. Además, las sales biliares en formas desconjugadas podrían sufrir modificaciones posteriores en el intestino y se supone que participan en procesos responsables en el desarrollo del cáncer al colon <sup>25</sup>.

De los resultados obtenidos se puede afirmar entonces, que los cultivos de *Lactobacillus* aislados, pueden resistir valores de pH de 2,5 durante 4 y 24 horas, tiempos superiores al que estarían en el estómago en condiciones normales. Al mismo tiempo, crecen bien a concentraciones de sales biliares de 0.3%, durante 4 y 24 horas; siendo estas propiedades de estrés que suelen ser empleadas en la elaboración de un producto con probióticos, puesto que son capaces de establecerse para lograr una buena colonización de la mucosa y el contenido intestinal <sup>26</sup>.

Cuando se caracteriza un organismo como probiótico, es necesario también tener en cuenta los criterios de seguridad relacionados con la virulencia y patogenicidad. Aunque no se han encontrado propiedades patógenas o virulentas en *Lactobacillus*, en ciertas condiciones, algunas cepas han sido relacionadas con efectos perjudiciales, en casos raros de bacteriemia. Es por ello, que en éstos estudios se deben considerar pruebas de factores de virulencia siendo los más usados in vitro la actividad gelatinasa y la producción de hemolisina <sup>27-28</sup>. Dentro de la actividad gelatinasa según el manual Bergey's el género *Lactobacillus* no posee tal actividad debido a que este género no es comúnmente patógeno, esto fue corroborado en el trabajo donde se puede evidenciar que todos los cultivos de *Lactobacillus* no poseen dicha actividad (Tabla 4). la gelatinasa es una metaloendopeptidasa extracelular que hidroliza la gelatina, el colágeno, la hemoglobina y ciertos péptidos bioactivos, lo que induce a considerar que podría degradar las proteínas de la matriz extracelular y, por lo tanto facilitar la invasión de los tejidos por estas bacterias, hasta la fecha los estudios epidemiológicos realizados, únicamente han sugerido la asociación entre su producción y la virulencia. En relación a la actividad hemolítica, las especies de *Lactobacillus* pueden ser  $\gamma$  o  $\alpha$ -hemolíticos y su crecimiento en Agar sangre puede variar desde colonias puntiformes, pequeñas, grandes y colonias grises <sup>29</sup>. Esta prueba permite relacionar la posible patogenicidad de las cepas ya que demuestra la presencia de antígenos somáticos y/o flagelares capaces de destruir los eritrocitos. En consecuencia las cepas potencialmente probióticas no deben presentar capacidad hemolítica <sup>17</sup>. Tras la siembra en placa de agar MRS con un 5% de sangre de carnero se encontró que 4 cultivos seleccionados eran  $\alpha$ -hemolíticos, es decir que

podrían ser hemolíticos y en consecuencia no susceptibles de ser consideradas candidatas a probióticos. (Tabla 4). Todos los cultivos de *Lactobacillus* spp aislados presentaron coagulación de la leche, lo que permite una actividad propia de éstos organismos.

Cabe indicar que la prueba biológica para estudiar la actividad antimicrobiana, constituye, habitualmente, el punto de partida e la búsqueda de bacterias probióticas productoras de bacteriocinas. Los bioensayos más empleados incluyen la prueba de difusión en agar, que está basada en la inhibición del desarrollo de un microorganismo de prueba inoculado en una placa. En el presente estudio se puede observar (Tabla 5) que de 10 cultivos de *Lactobacillus* spp seleccionados, 14 de ellos presentan importante actividad antimicrobiana contra *S. enterica* ATCC 14028. La capacidad de generar sustancias antimicrobianas juega un rol significativo en la habilidad de los probióticos para competir con la microbiota residente y modificarla beneficiosamente.

Al respecto se menciona que las propiedades antagonicas que ocurren en el intestino, entre los microorganismos que lo pueblan ocurren por diversos motivos: descenso del pH del lumen a causa de la producción de ácidos orgánicos de cadena corta, al competir por nutrientes específicos y ante la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y/o compuestos inhibidores específicos como las bacteriocinas. Si las bacterias probióticas son metabólicamente activas durante su pasaje a través del intestino, es muy probable que se produzca alguna de estas sustancias <sup>30</sup>.

Cabe resaltar que la mayor actividad antimicrobiana de los cultivos de *Lactobacillus* spp aislados corresponden a los cultivos de Lb- 04, LB- 07, Lb- 28 y Lb- 09. Estos resultados indican que la sustancia inhibitoria producida por dichos cultivos podría deberse a la acción de bacteriocinas, pues el método utilizado permite excluir el efecto de los ácidos, no obstante deberían realizarse otros ensayos para confirmar esta hipótesis.

## CONCLUSIONES

- El tracto intestinal de *Gallus gallus* “pollo” constituye una importante fuente de aislamiento de *Lactobacillus* con potencial probiótico.
- Diez (10) cultivos de *Lactobacillus* spp aislados del tracto intestinal de *Gallus gallus* “pollo”, son resistentes a la acidez (pH 2,5 y 3,5), a las sales biliares (0,3%), no producen gelatinasa ni hemolisinas, tienen capacidad de coagulación de la leche e inhiben el crecimiento de *Salmonella entérica* ATCC 14028

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Salvador F, Cruz D. Nutracéuticos. Universidad Autónoma de Chihuahua. Facultad de Zootecnia. México D.F. 2009.
2. Spring P. Glycomics: el rol de carbohidratos específicos como nuevos aditivos alimenticios. Swiss College of Agriculture. Revista Avicultura Profesional. 2004. 22,(4): 17-19p.
3. Moreno E. Probióticos y aves, Veterinaria Profesional, Islas Canarias- España. 1999. 5 p. Consultado el 25-10-2009. Disponible en <http://www.timbrado.com/artprobioticos.shtml>
4. Milian G. Empleo de probióticos a base de *Bacillus* sp y sus endosporas en la producción avícola. Instituto de Ciencia Animal. La Habana, Cuba. 2005. 16p. Consultado el 6-02-2010. Disponible en [http://www.bibliociencias.cu/gsd/collect/libros/index/assoc/HASH01b8.dir/do\\_c.pdf](http://www.bibliociencias.cu/gsd/collect/libros/index/assoc/HASH01b8.dir/do_c.pdf).
5. Duchatel J. Aparato Digestivo. Tomado de la revista "gut Flug", 2005. editada en Bélgica. Consultado el 6-02-2010. Disponible en <http://www.mispalomos.com/portal/index.php?name=Sections&req=viewarticle&artid=75&page=1>
6. Sansalone P. Conceptos sobre Alternativas no Antibióticas en aves de consumo. 2008. Listado de Memorias. Seminario AMEVEA. Lab. VENTACO S.A. Quito-Ecuador. 224 p.
7. Rossi A, Sangoi M, Padilha J. Uso de probióticos en la prevención de salmonella en pollos de engorde. Zootécnica y medicina veterinaria. Brasil.2005. Disponible en <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sciarttext&pid=S1413-70542007000400039&lng=en&nrm=iso.htm &tlng=pt>
8. Yegani M. Manipulación de la flora intestinal en aves. Universidad de Alberta, Canadá. 2010. Consultado el 02-03-2011. Disponible en [www.Manipulacion%20de%20la%20microflora%20intestinal%20de%20las%20aves.htm](http://www.Manipulacion%20de%20la%20microflora%20intestinal%20de%20las%20aves.htm)
9. Botero L. Salmonelosis y su control. Avicultura Ecuatoriana.2008. No, 128. Agroeditorial CIA. LTDA. 30 p.
10. Lastras P. Probióticos, *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium bifidum*, Suplementos nutricionales,

- Salud BIO, 2009. 12 p. Consultado el 15-12-2009. Disponible en <http://saludbio.com/articulo/suplementos/probioticos-lactobacillus-acidophilus-bifodobacterium-bifidum>
11. Samaniego L, Sosa M. *Lactobacillus* spp.: Importantes promotores de actividad probiótica, antimicrobiana y bioconservadora. Centro de Estudios Biotecnológicos. Facultad de Agronomía. Universidad de Matanzas “Camilo Cienfuegos”. Matanzas, Cuba. 2002. Consultado el 19-04-2011. <http://www.bibliociencias.cu/gsd/collect/libros/index/assoc/HASH011d/e18c5081.dir/doc.pdf>
  12. Gonzales A. Bacilos Gram Positivos, Universidad de Oviedo, España, 1997. 5 p. Consultado el 01-01-2010 <http://microral.wikispaces.com/Bacilos+Gram+positivos>
  13. Laurencio M, Pérez M, Piad R, Milián G, et al. Actividad probiótica de una mezcla de exclusión competitiva en indicadores microbiológicos en pollos de ceba. Rev Cienc Tecnol Aliment. 2005; 5:48-53.
  14. Ramírez B, Zambrano O, Ramírez Y, Rodríguez Y, et al. Evaluación del efecto probiótico del *Lactobacillus* spp. origen aviar en pollitas de inicio reemplazo de la ponedora comercial en los primeros 42 días de edad. Rev REDVET. 2005; 6 (9): 1-9.
  15. Rondón A, Samaniego L, Bocourt R, Rodríguez S, et al. Aislamiento, identificación y caracterización parcial de las propiedades probióticas de cepas de *Lactobacillus* sp. procedentes del tracto gastrointestinal de pollos de ceba. Red Cienc Tecnol Aliment 2008; 6(1): 56-63
  16. Rebollar S. Evaluación de indicadores productivos en pollos de engorda al incluir maíz y pasta de soya extrudidos y malta de cebada. [Tesis Maestral]. Colima: Programa Interinstitucional en Ciencias Pecuarias, Universidad de Colima; 2002.
  17. Macfaddin J. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. 3ª ed. Buenos Aires. Media Panamericana. 2003.
  18. Espinoza J. Aislamiento e identificación de *Lactobacillus* sp de queso fresco y caracterización in vitro con potenciales prebióticos. [Tesis pre grado]. Trujillo. Universidad Nacional de Trujillo 2009.
  19. Pérez de Rozas A, Roca M, Carabaño R, De Blas C, et al. El estudio de la diversidad intestinal por RFLP. En: XIX Curso de Especialización: Avances en Nutrición y Alimentación Animal. Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal (FEDNA). Madrid, España. 2003; pp.31-45.
  20. Mateos G, Lázaro R., Gracia M. Modificaciones nutricionales y problemática digestiva en aves. En: XVIII Curso de Especialización: Avances en Nutrición y Alimentación Animal. Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal (FEDNA). Madrid, España. 2002; pp.15-37
  21. Corcoran BM, Stanton C, Fitzgerald GF, Ross RP. Survival of Probiotic Lactobacilli in Acidic Environments Is Enhanced in the Presence of Metabolizable Sugars. App Environ Microbiol 2005; 71(6): 3060-7.
  22. Boonkumklao P, Kongthong P, Assavanig A. Acid and Bile Tolerance of Lactobacillus thermotolerans, a novel species isolated from chicken feces. Kasetsart J. (Nat. Sci.) 2006; 40: 13-17.
  23. Liang MT, Sha NP. Bile salt desconjugation ability, bile salt hydrolase activity and cholesterol coprecipitation ability of lactobacilli strains. Intern Dairy J. 2005; 15: 391-398.
  24. Marquina D, Santos A. Probióticos, prebióticos y Salud. Universidad Complutense Departamento de Microbiología III Facultad de Biología. Madrid. 2008.
  25. Salminen S, Laine M, von Wright A, Vuopio-Varkila I, et al. Development of selection criteria for probiotic strains to assess their potential in functional foods: a Nordic and European approach. Bioscience Microflora. 1996; 15: 61-70.
  26. Kun Lee Y, Salminen S. Handbook of Probiotics and Prebiotics. 2ed. New Jersey: Wiley, 2009.
  27. Rodríguez JM. Microorganismos y salud. Bacterias lácticas y bifidobacterias probióticos. Edit Complutens, S.A. 2006
  28. CMPT Critique. MO43-5 Blood cultura isolate: *Lactobacillus* species (*L. acidophilus*). 2004.
  29. Pan X, Chen F, Wu T, Tang H, Zhao Z. The acid, bile tolerance and antimicrobial property of *Lactobacillus acidophilus* NIT. Food control. 2009; 20: 598-602.
  30. Ouwehand A. C. Kirjavainen P.V., Shortt C, Salminen S. Probiotics: mechanisms and established effects. Int. Dairy J. 1999; 9: 43-52.