

## Avaliação *in vitro* da atividade inibitória de *Lactobacillus* spp., isolados do inglúvio e cecos de aves sobre *Salmonella*

[In vitro evaluation of the inhibitory activity of *Lactobacillus* spp. isolated from crop and ceca of chickens against *Salmonella* serotypes]

M.R. Barros<sup>1</sup>, R.L. Andreatti Filho<sup>1</sup>, E.T. Lima<sup>1</sup>, J.A. Crocci<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP  
Distrito de Rubião Júnior  
18618-000 – Botucatu, SP

<sup>2</sup>Instituto de Biociências - UNESP – Botucatu, SP

### RESUMO

Inglúvios e cecos de reprodutoras comerciais de frangos de corte foram utilizados para o isolamento de *Lactobacillus* spp. As estirpes isoladas foram caracterizadas como Gram-positivo, catalase negativo, produtoras de gás em glicose, não produtoras de H<sub>2</sub>S em *triple sugar iron* e identificadas pela reação em cadeia da polimerase como *Lactobacillus reuteri* e *Lactobacillus salivarius*. A utilização da técnica *spot-on-the-lawn* para avaliação da inibição *in vitro* permitiu a análise de vários microrganismos simultaneamente. Todas as estirpes isoladas inibiram *in vitro* *S. Enteritidis* fagotipo 4, *S. Enteritidis* fagotipo 28, *S. Typhimurium*, *S. Pullorum*, *S. Agona*, *S. Anatum*, *S. Dublin* e *S. Senftenberg*.

Palavras-chave: reprodutora de frango de corte, identificação, *Lactobacillus*, *Salmonella*, PCR

### ABSTRACT

*Crops and ceca of commercial broiler breeders were used for the isolation of Lactobacillus spp. The isolated samples were characterized by Gram positive staining, negative catalase test, production of gas from glucose, negative for H<sub>2</sub>S production from triple sugar iron, and were identified by the polymerase chain reaction as Lactobacillus reuteri and Lactobacillus salivarius. The use of the spot-on-the-lawn technique, with modifications, for the evaluation of the in vitro inhibition made it possible the simultaneous analysis of several microorganisms. All the crop and ceca isolated microorganisms presented an in vitro inhibitory effect against strains of Salmonella Enteritidis fagotype 4, S. Enteritidis fagotype 28, S. Typhimurium, S. Pullorum, S. Agona, S. Anatum, S. Dublin, and S. Senftenberg.*

Keywords: broiler breeder, identification, *Lactobacillus*, *Salmonella*, PCR

### INTRODUÇÃO

Vários gêneros e estirpes bacterianas compõem a microbiota normal do trato respiratório, inglúvio e cecos de aves, evidenciando entre essas, sempre a presença benéfica do gênero *Lactobacillus* spp. (Kawaguchi et al., 1991; Sarra et al., 1992), competindo contra a colonização por patógenos e, consequentemente, reduzindo a contaminação de produtos alimentares avícolas (Garriga et al., 1998).

Substâncias antimicrobianas como bacteriocinas, ácidos orgânicos e peróxido de hidrogênio (Cocconcelli, 1993), produzidas por bactérias presentes na microbiota intestinal, especialmente *Lactobacillus* spp., inibem a colonização de várias bactérias (Chaves et al., 1999) e apresentam poder de ação contra outras bactérias Gram-positivo e algumas Gram-negativo (Blackburn et al., 1989). O inglúvio e os cecos são os principais locais de colonização por *Salmonella* spp. em aves (Impey et al., 1984), é importante o estudo de *Lactobacillus* spp.,

---

Recebido em 21 de setembro de 2007

Aceito em 18 de maio de 2009

E-mail: merciarbpe@yahoo.com.br

comumente encontrados nesses segmentos e seu efeito protetor contra *Salmonella* spp.

Trabalhos pioneiros que relatam os efeitos benéficos de bactérias intestinais em galinhas abriram as investigações sobre o tema. Nurmi e Rantala (1973) demonstraram que a microbiota de aves adultas normais apresenta efeito protetor contra a infecção por *Salmonella* spp., em pintos. Miyamoto et al. (2000) investigaram *Lactobacillus* quantitativa e qualitativamente na cloaca e na vagina de aves e sua habilidade para inibir o crescimento de *Salmonella* Enteritidis. Observaram além da predominância de *L. acidophilus*, *L. salivarius* e *L. fermentum*, que *Lactobacillus* isolados da cloaca e da vagina também inibiram *in vitro* o crescimento de *S. Enteritidis*. Kizerwetter-Swida e Binek (2005) relataram que *Lactobacillus* inibiram *in vitro* bactérias enteropatogênicas como *Clostridium perfringens*, e o consideraram como potencial probiótico para controlar a enterite necrótica em aves.

A importância das espécies de *Lactobacillus* nos processos industriais ou na saúde humana e animal tem estimulado estudos de genética molecular para identificar espécies desse gênero (Chagnaud et al., 2001), e o desenvolvimento de métodos baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR) tem aberto possibilidades para identificação precisa e rápida das bactérias acidoláticas.

Os objetivos do presente trabalho foram isolar *Lactobacillus* spp. do ingluvío e cecos de galinhas e avaliar a atividade inibitória *in vitro* contra estirpes de *Salmonella*.

## MATERIAL E MÉTODOS

As aves utilizadas, a coleta das amostras (ingluvío e cecos), o isolamento e a identificação de *Lactobacillus* por meio de provas bioquímicas e da reação em cadeia da polimerase (PCR) foram apresentados por Barros et al., 2009. Os iniciadores utilizados na PCR estão descritos na Tab. 1.

Tabela 1. Iniciadores estirpe-específicos utilizados na reação em cadeia de polimerase para identificação de *Lactobacillus*

Estirpe	Iniciador (5' – 3')	Amplicon
<i>L. fermentum</i>	<i>Fer3</i> : ACTAACTTGACTGATCTACGA <i>Fer4</i> : TTCACTGCTCAAGTAATCATC	192pb
<i>L. reuteri</i>	<i>Reu1</i> : CAGACAATCTTTGATTGTTTAG <i>Reu4</i> : GCTTGTTGGTTTGGGCTCTTC	303pb
<i>L. salivarius</i>	<i>Sall</i> : AATCGCTAAACTCATAACCT <i>Sal2</i> : CACTCTCTTTGGCTAATCTT	411pb

(Song et al., 2000)

Para o multiplex PCR, realizou-se o perfil de termociclagem com os iniciadores *Fer3*, *Fer4*, *Reu1*, *Reu4*, *Sall* e *Sal2*, sendo a reação composta por tampão para PCR 1x, 2,50mM de cloreto de magnésio, 0,20mM de dNTPs, 0,4µM de cada iniciador, 1,25U de Taq DNA polimerase e 2µL de DNA a 0,1µg/µL em 25µL de reação, e perfil de termociclagem 94°C-5min (1x); 94°C-1min, 57°C-30s, 72°C-1min (40x); 72°C-7min (1x). Em seguida, o produto da PCR foi avaliado por meio de eletroforese em gel de agarose contendo 2% de brometo de etídio e marcadores de peso molecular de 50pb ou 100pb.

Foram utilizadas estirpes de *Salmonella* (*S. Enteritidis* fagotipo 4, *S. Enteritidis* fagotipo 28, *S. Typhimurium*, *S. Pullorum*, *S. Agona*, *S.*

*Anatum*, *S. Dublin* e *S. Senftenberg*) isoladas de vísceras de galinhas, sorotipadas pelo Instituto Adolfo Lutz-SP e mantidas na bacterioteca do serviço de ornitopatologia da FMVZ- UNESP-Botucatu. Cada estirpe de *Salmonella* mantida em ágar nutriente foi suspensa em 10mL de caldo infusão cérebro coração (BHI) e incubado aerobicamente a 37°C por 24 horas. Após esse período, cada estirpe foi semeada em ágar verde brilhante (AVB), seguindo a mesma metodologia citada acima.

O cultivo para inibição foi realizado de acordo com a técnica *spot-on-the-lawn* (Lewus et al., 1991; Santos, 1993), com modificações. As estirpes de *Lactobacillus* foram semeadas em caldo MRS em condições de microaerofilia a

37°C por 24 horas. Após esse período, o caldo MRS foi semeado em placas de Petri contendo aproximadamente 15mL de ágar MRS, mediante inoculação em pontos. Foram obtidas quatro repetições para cada estirpe, provenientes do inglúvio e cecos, com as mesmas condições de incubação citadas acima.

Concomitantemente, cada estirpe de *Salmonella* foi semeada em caldo BHI e incubada em aerobiose durante 12 horas a 37°C. Foram realizadas diluições decimais seriadas para determinar a UFC/mL de cada *Salmonella*. Após a incubação, foram transferidos 100µL da cultura com *Salmonella* para tubos contendo 5mL de BHI, seguida de homogeneização e transferência de 1mL para novo tubo contendo 5mL de BHI. Em seguida, 750µL dessa última solução foram transferidos para novo tubo contendo 15mL de BHI acrescido de 0,87% de ágar ágar, previamente preparado e mantido em banheira a 45°C.

Cada estirpe de *Salmonella* acrescentada ao ágar foi dispensada sobre as placas cultivadas anteriormente com as espécies de *Lactobacillus reuteri* e *L. salivarius* provenientes do inglúvio e cecos de galinhas. Após a completa solidificação da camada superior, as placas foram incubadas a 37°C por 24 horas.

A inibição do crescimento de cada estirpe de *Salmonella* por *L. reuteri* e *L. salivarius* foi avaliada pelo diâmetro final da área de inibição, correspondendo à diferença entre o halo de inibição total e o diâmetro da colônia (Chateau et al., 1993).

Em relação ao diâmetro do halo, foi utilizada a análise de variância em blocos com aplicação do teste Tukey para comparação de médias, para estudos de: estirpes de *Salmonella* e segmentos (inglúvio e cecos) (ZAR, 1996).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

As estirpes isoladas Gram-positivo, catalase negativa, produtoras de gás de glicose e não produtoras de H<sub>2</sub>S em TSI foram consideradas

como pertencentes ao gênero *Lactobacillus* e identificadas por meio da PCR como *L. reuteri* e *L. salivarius* (Barros et al., 2009). Foram selecionadas 16 estirpes de cada espécie de *Lactobacillus* de acordo com o órgão de isolamento (Tab. 2), totalizando 64 amostras testadas frente às oito estirpes de *Salmonella* com 10<sup>7</sup> UFC/mL.

Tabela 2. *Lactobacillus* isolados do inglúvio e cecos de galinhas.

Órgão	<i>Lactobacillus</i>	PCR
Inglúvio	<i>reuteri/salivarius</i>	16/16
Ceco	<i>reuteri/salivarius</i>	16/16

A atividade antimicrobiana *in vitro* de *L. reuteri* frente às estirpes de *Salmonella* foi demonstrada pelos halos de inibição (Fig. 1). As medidas dos halos de inibição, promovidos por *L. reuteri* isolado de inglúvio, frente às estirpes de *Salmonella* não diferiram entre si. Para os isolados de cecos, as medidas dos halos de inibição para *S. Typhimurium* e *S. Agona* diferiram em relação a *S. Anatum*. Em relação a *S. Anatum*, as medidas dos halos de inibição diferiram entre os isolados de *Lactobacillus* de inglúvio e de ceco (Tab. 3).

*L. salivarius* apresentou atividade antimicrobiana *in vitro* frente às estirpes de *Salmonella* (Fig. 2). As medidas dos halos de inibição de *L. salivarius* isolados do inglúvio apresentaram diferença significativa para *S. Agona* e *S. Senftenberg* em relação a *S. Dublin*. Para os isolados dos cecos, as medidas dos halos de inibição contra *S. Enteritidis* PT28, *S. Agona* e *S. Senftenberg* diferiram em relação a *S. Anatum*. A média de inibição para *S. Enteritidis* diferiu entre os isolados de *L. salivarius* de inglúvio e de cecos (Tab. 4).

A administração de microrganismos da microbiota intestinal de aves pode determinar alguma proteção de galinhas contra a colonização por alguns patógenos, como *Salmonella* spp. (Nurmi e Rantala, 1973; Andreatti Filho et al., 1997; 1998).

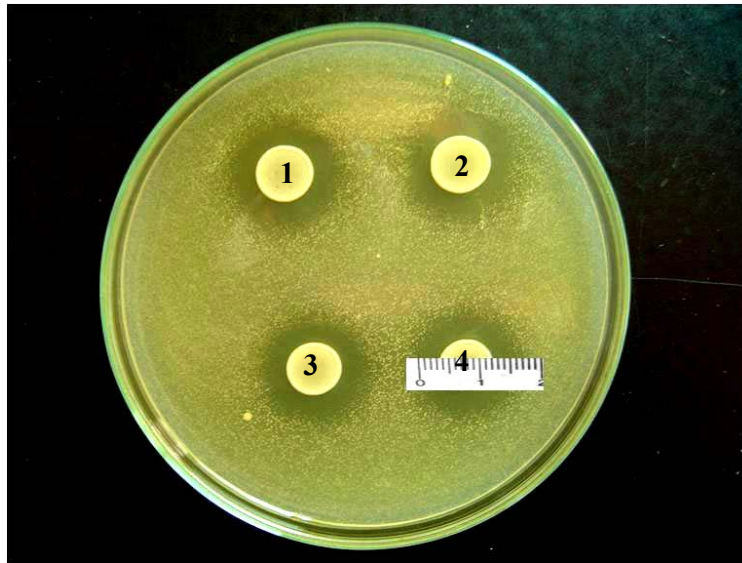


Figura 1. Atividade antimicrobiana de *Lactobacillus reuteri* (1, 2, 3 e 4) sobre *Salmonella* Pullorum, isolada de vísceras de galinhas, demonstrada pelos halos de inibição (cm) por meio da técnica *spot-on-the-lawn* (Lewus et al., 1991; Santos, 1993)

Tabela 3. Halos (cm) de inibição formados por *Lactobacillus reuteri*, isolados de ingluvío (I) e ceco (C) de galinhas, frente às estirpes de *Salmonella*

	Estirpes de <i>Salmonella</i>							
	Enteritidis PT4	Enteritidis PT28	Typhimurium	Pullorum	Agona	Anatum	Dublin	Senftenberg
I	0,85Aa	0,92Aa	1,05Aa	0,80Aa	0,96Aa	0,95Aa	0,86Aa	0,96Aa
C	0,79ABa	0,98ABa	1,08Aa	0,89Aba	1,07Aa	0,63Bb	0,76ABa	0,87ABa

Valores seguidos por letras distintas maiúsculas na linha ou minúsculas na coluna diferem entre si ( $P < 0,05$ ).



Figura 2. Atividade antimicrobiana de *Lactobacillus salivarius* (1, 2, 3 e 4) sobre *Salmonella* Typhimurium, isolada de vísceras de galinhas, demonstrada pelos halos de inibição (cm) por meio da técnica *spot-on-the-lawn* (Lewus et al., 1991; Santos, 1993).

Tabela 4. Halos (cm) de inibição formados por *Lactobacillus salivarius*, isolados de ingluvío (I) e cecos (C) de galinhas frente às estirpes de *Salmonella*

		Estirpes de <i>Salmonella</i>							
		Enteritidis PT4	Enteritidis PT28	Typhimurium	Pullorum	Agona	Anatum	Dublin	Senftenberg
I		0,74ABa	0,80ABa	0,84ABa	0,80ABa	1,10Aa	0,86ABa	0,50Ba	0,90Aa
C		0,94ABb	1,04ACb	0,92ABa	0,84ABa	1,02ACa	0,55Ba	0,60BCa	1,07Aa

Valores seguidos por letras distintas maiúsculas na linha ou minúsculas na coluna diferem entre si (P<0,05).

Miyamoto et al. (2000) observaram, além da predominância de *L. acidophilus*, *L. salivarius* e *L. fermentum*, que *Lactobacillus* isolados da cloaca e da vagina também inibiram *in vitro* o crescimento de *S. Enteritidis*. Neste trabalho, *L. salivarius* do ingluvío e cecos apresentaram diferença significativa de inibição frente a *S. Enteritidis* (Tab. 4). *L. reuteri*, entre os isolados dos cecos, apresentou diferença significativa entre as médias dos halos de inibição referentes a *S. Typhimurium* e *S. Agona* em relação a *S. Anatum* (Tab. 3).

Chateau et al. (1993) avaliaram a atividade inibitória *in vitro* de *L. fermentum*, *L. rhamnosus*, *L. plantarum*, *L. acidophilus* e *L. pseudoplantarum*, presentes em dois probióticos, frente à *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella*. Os *Lactobacillus* foram mais eficientes contra as estirpes de *Salmonella*, sendo um dos probióticos mais eficiente contra *S. Typhimurium*, e o outro contra *S. Enteritidis*.

Considera-se importante identificar as estirpes de *Lactobacillus* spp., presentes no ecossistema microbiano e determinar quais apresentam efeito protetor (Song et al., 2000).

Os resultados obtidos demonstraram que todas as estirpes de *L. reuteri* e *L. salivarius*, provenientes do ingluvío e cecos de aves, inibiram *in vitro* os sorovares de *Salmonella* estudados (*S. Enteritidis* fagotipo 4, *S. Enteritidis* fagotipo 28, *S. Typhimurium*, *S. Pullorum*, *S. Agona*, *S. Anatum*, *S. Dublin* e *S. Senftenberg*).

A PCR foi uma ferramenta importante na identificação das amostras isoladas de aves, detectando *L. reuteri* e *L. salivarius*, assemelha-se ao observado por Klaenhammer (1995) que, dentre as espécies de *Lactobacillus* em aves, estão presentes *L. reuteri* e *L. salivarius*, identificadas por meio da homologia DNA-DNA.

## CONCLUSÕES

As estirpes de *L. reuteri* e *L. salivarius* isoladas do ingluvío e cecos de galinhas foram capazes de inibir *in vitro* *S. Enteritidis* fagotipo 4, *S. Enteritidis* fagotipo 28, *S. Typhimurium*, *S. Pullorum*, *S. Agona*, *S. Anatum*, *S. Dublin* e *S. Senftenberg*. A técnica *spot-on-the-lawn* permitiu a realização de vários testes simultaneamente. A utilização da PCR foi precisa e rápida na identificação das estirpes de *Lactobacillus*.

## AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDREATTI FILHO, R.L.; SILVA, E.N.; CURI, P.R. Ácidos orgânicos e microbiota cecal anaeróbica no controle da infecção experimental de frangos por *Salmonella typhimurium* e *Salmonella enteritidis*. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.49, p.661-672, 1997.
- ANDREATTI FILHO, R.L.; SILVA, E.N.; CURI, P.R. Control of experimental infection of broilers by *Salmonella Enteritidis* and *S. Typhimurium* with the use of organic composites and anaerobic cecal microflora. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON FOOD-BORNE SALMONELLA IN POULTRY, 1998, Baltimore. *Proceedings...* Baltimore: American Association of Avian Pathology, 1998.
- BARROS, M.R.; ANDREATTI FILHO, R.L.; OLIVEIRA, D.E. et al. Comparação entre método bioquímico e reação em cadeia da polimerase para identificação *Lactobacillus* spp. isolados de aves. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.61, p.319-325, 2009.

- BLACKBURN, P.; POLAK, J.; GUSIK, S.A. et al. *Nisin Composition for use as enhanced broad range bactericides*. International Patent Application n. PCT/US89/02625; Int. Publ. WO89/12399. New York: Applied Microbiology, 1989.
- CHAGNAUD, P.; MACHINIS, K.; COUTTE, L.A. et al. Rapid PCR-based procedure to identify lactic acid bacteria: application to six common *Lactobacillus* species. *J. Microbiol. Methods*, v.44, p.139-48, 2001.
- CHATEAU, N.; CASTELLANOS, I.; DESCHAMIS, A.M. Distribution of pathogen inhibition in the *Lactobacillus* isolation of a commercial probiotic consortium. *J. Appl. Bacteriol.*, v.74, p.36-40, 1993.
- CHAVES, A.H.; SILVA, J.F.C.; PINHEIRO, A. et al. Isolamento de *Lactobacillus acidophilus* a partir de fezes de bezerros. *Rev. Bras. Zootec.*, v.28, p.1086-92, 1999.
- COCCONCELLI, P.S. Aspetti molecular de batteriocine prodolte da *Lactobacillus* Ann. *Microbiol. Enzimol.*, v.43, p.37-44, 1993.
- GARRIGA, M.; PASCUAL, M.; MONFORT, J.M. et al. Selection of *Lactobacilli* for chicken probiotic adjuncts. *J. Appl. Microbiol.*, v.84, p.125-132, 1998.
- IMPEY, C.S.; MEAD, G.C.; GEORGE, S.M. Evaluation of treatment with defined and undefined mixture of gut microorganisms for preventing *Salmonella* colonization in chicks and turkey poults. *Food. Microbiol.*, v.1, p.143-147, 1984.
- KAWAGUCHI, I.; HAYASHIDANI, H.; KANEKO, K. et al. Bacterial flora of the respiratory tracts in chickens with a particular reference to *Lactobacillus* species. *J. Vet. Med. Sci.*, v.54, p.261-267, 1991.
- KIZERWETT-SWIDA, M.; BINEK, M. Selection of potentially probiotic *Lactobacillus* strains towards their inhibitory activity against poultry enteropathogenic bacteria. *Pol. J. Microbiol.*, v. 54, p.287-94, 2005.
- KLAENHAMMER, T.R. Genetics of intestinal lactobacilli. *Int. Dairy J.*, v.5, p.1019-1058, 1995.
- LEWUS, C.B.; KAISER, A.; MONTIVILLE, T.J. Inhibition of Food-Borne Bacterial Pathogens by Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria Isolated from Meat. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.57, p.1683-1688, 1991.
- MIYAMOTO, T.; HORIE, T.; FUJIWARA, T. et al. *Lactobacillus* flora in the cloaca and vagina of hens and its inhibitory activity against *Salmonella* Enteritidis *In vitro*. *Poult. Sci.*, v.79, p.7-11, 2000.
- NURMI, E.; RANTALA, M. New aspects of *Salmonella* infection in broiler production. *Nature*, v.241, p.210-211, 1973.
- SANTOS, W.L.M. *Aislamiento y caracterizacion parcial de una bacteriocina producida por Pedicoccus* sp. 347, de origem carnico. 1993. 294f. Tese (Doutorado) - Universidade Complutense de Madrid, Madrid.
- SARRA, P.G.; MORELLI, L.; BOTTAZZI, V. The lactic acid microflora of fowl. In: WOOD, B.J.B. (Ed). *The lactic acid bacteria in health and diseases*. London: Elsevier, 1992. p.3-19.
- SONG, Y.L.; KATO, N.; LIU, C.X. et al. Rapid identification of 11 human intestinal *Lactobacillus* species by multiplex PCR assays using group and species-specific primers derived from the 16S-23S rRNA intergenic spacer region and its flanking 23S rRNA. *FEMS. Microbiol. Lett.*, v.187, p.167-173, 2000.
- ZAR, J.H. *Biostatistical analysis*. New Jersey: Prentice Hall, 1996. 718p.