



**COLEGIO DE POSTGRADUADOS**

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

**CAMPUS MONTECILLO**

**POSTGRADO EN RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD**

**GANADERÍA**

**IDENTIFICACIÓN GENÉTICA DE *Pediococcus acidilactici* DE FLUIDO RUMINAL Y EFECTO DE DOS IONÓFOROS EN SU ACTIVIDAD FERMENTATIVA**

**ALEJANDRO LEY DE COSS**

**T E S I S**

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**DOCTOR EN CIENCIAS**


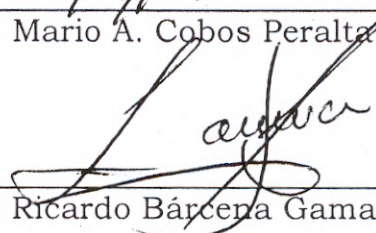

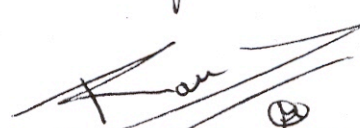
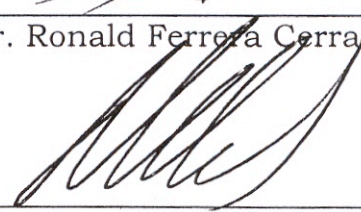
**MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO**

**2008**

**La presente tesis titulada: IDENTIFICACIÓN GENÉTICA DE *Pediococcus acidilactici* DE FLUIDO RUMINAL Y EFECTO DE DOS IONÓFOROS EN SU ACTIVIDAD FERMENTATIVA**, realizada por el alumno: **ALEJANDRO LEY DE COSS**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**DOCTOR EN CIENCIAS  
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD  
GANADERÍA**

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO	 _____
	Dr. Mario A. Cobos Peralta
ASESOR	 _____
	Dr. Ricardo Bárcena Gama
ASESOR	 _____
	Dr. Sergio S. González Muñoz
ASESOR	 _____
	Dr. Ronald Ferrera Cerrato
ASESOR	 _____
	Dr. Miguel A. Martínez Damián

Montecillo, Texcoco Estado de México, Noviembre de 2008

IDENTIFICACIÓN GENÉTICA DE *Pediococcus acidilactici* DE FLUIDO  
RUMINAL Y EFECTO DE DOS IONÓFOROS EN SU ACTIVIDAD  
FERMENTATIVA

Alejandro Ley de Coss, Dr.

Colegio de Postgraduados, 2008

Se aisló una bacteria de ovinos con acidosis ruminal usando medios selectivos para el crecimiento de bacterias productoras de ácido láctico. La bacteria fue identificada genéticamente usando una secuencia parcial de 800 nucleótidos del gen ARNr 16S obtenida por el método de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para evaluar *in vitro* el efecto de los ionóforos monensina y lasalocida en la actividad metabólica de la bacteria se usó una dosis de 30 y 40 g ton<sup>-1</sup> de Rumensin (monensina) y Bovatec (lasalocida). Tubos de cultivo con 9 mL de medio de cultivo anaerobio y 0.1 g de una dieta para ovinos alta en carbohidratos de fácil fermentación fueron inoculados con una concentración de 10<sup>8</sup> bacterias mL<sup>-1</sup> de medio de cultivo. A las 24, 48 y 72 h de incubación se midió: pH, AGV (acetato, propionato y butirato), lactato y DIVMS. La bacteria ruminal aislada resulto un coco Gram positivo de 1.5 a 2 µm de diámetro, en pares o cadenas de cuatro células, catalasa negativo sin motilidad. De acuerdo al análisis del 16S rARN, la bacteria pertenece a la especie *Pediococcus acidilactici* con un 99% de semejanza. Después de 24,48 y 72 h de incubación la concentración de lactato y la DIVMS fue menor (P<0.05), y la concentración de AGV y el pH fue mayor (P<0.05) con la adición de monensina o lasalocida con respecto a los tratamientos sin ionóforos. Los ionóforos también disminuyeron el crecimiento de *P. acidilactici* a las 3 y 6 h de incubación. Debido a la semejanza morfológica y metabólica entre *P. acidilactici* y *Streptococcus bovis*, se sugiere realizar estudios enfocados a determinar la importancia de *P. acidilactici* en la incidencia y control de la acidosis ruminal.

**Palabras clave:** Bacterias ruminales, *Pediococcus acidilactici*, ionóforos.

GENETIC IDENTIFICATION OF *Pediococcus acidilactici* FROM RUMEN FLUID  
AND EFFECT OF TWO IONOPHORES ON ITS FERMENTATIVE ACTIVITY

Alejandro Ley de Coss, Dr.

Postgraduate College, 2008

A bacterium from lambs with rumen acidosis was isolated using selective media for growth of lactic acid-producing bacteria. This bacterium was genetically identified comparing a 800 nucleotides gen fragment of its RNAr 16S obtained by the polymerase chain reaction method (PCR). The effect of monensin and lasalocid ionophores on the bacterium metabolic activity was evaluated *in vitro* with 30 and 40 g ton<sup>-1</sup> doses of Rumensin (monensin) and Bovatec (lasalocid). Culture tubes containing 9mL of anaerobic culture medium and 0.1 g of a lamb's diet with high content of fast fermentable carbohydrates were inoculated with 10<sup>8</sup> bacteria mL<sup>-1</sup> of culture medium. The pH, VFA (acetate, propionate and butyrate), lactate and IVDMD were measured after 24, 48 and 72 h of incubation. The isolated rumen bacterium was a Gram positive coccus, 1.5 -2.0 µm in diameter, occurs in pairs and tetrads, catalase negative and nonmotile. According with the 16S rRNA analysis, this bacterium belongs to the specie *Pediococcus acidilactici* with 99% of nucleotide homology. Lactate concentration and IVDMD were lower (P<0.05), and VFA concentration and pH were higher (P<0.05) with monensin or lasalocid addition than without them after 24, 48 and 72 h of incubation. The ionophores also decreased the growth of *P. acidilactici* after 3 and 6 h of incubation. Considering the morphology and metabolic similarities between *P. acidilactici* and *Streptococcus bovis*, it is suggested to do studies focused on the role of *P. acidilactici* on the incidence and control of rumen acidosis.

**Key words:** Rumen bacteria, *Pediococcus acidilactici*, ionophores.

## **DEDICATORIA**

### **A QUIENES AMO POR TENER UNA PARTICIPACIÓN IMPORTANTE EN MI VIDA:**

#### **A mis hijos:**

Alejandra Ley Arce y Edie Ley Arce

#### **A mi esposa:**

Consepcion Arce Espino

#### **A mis padres:**

Sr. Edie Ley Cruz y Sra. Sonia de Coss Nucamendi

#### **A mis hermanos:**

Marcos, Gladis, B. Juani. Lupita y Edi.

#### **A todos mis amigos.**

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico para obtener el grado de Doctor en Ciencias. Becario No. 164981.

Al CONACyT-SAGARPA por el financiamiento, de esta investigación a través del proyecto No. 1149 intitulado “Tratamiento de acidosis ruminal subclínica (ARS) en ganado lechero y de carne mediante el uso de un bacteriófago específico contra *Streptococcus bovis*” a cargo del Dr. Mario A. Cobos Peralta.

Al Colegio de Postgraduados, especialmente al Posgrado de Recursos Genéticos y Productividad-Ganadería Campus Montecillo, por haber permitido realizar mis estudios de postgrado.

Al Dr. Mario A. Cobos Peralta por compartir su experiencia, amistad, apoyo y dedicación para la culminación de esta investigación.

Al Dr. Sergio S. González Muñoz por sus sabios consejos, comprensión y muy valiosas sugerencias para el buen desarrollo de esta investigación.

A la Dra. Ninfa Ramírez Durán por su amistad, apoyo y dedicación en la parte de biología molecular e identificación de la bacteria aislada, además por sus valiosas sugerencias para culminar esta investigación.

Al Dr. Ricardo Bárcena Gama por su amistad, apoyo y valiosas sugerencias para culminar esta investigación.

Al Dr. Ronald Ferrera Cerrato por sus valiosas sugerencias hacia esta investigación.

Al Dr. Miguel Angel Martínez Damián por sus valiosas sugerencias hacia esta investigación.

## CONTENIDO

	<b>Página</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISIÓN DE LITERATURA.....</b>	<b>4</b>
2.1. Microbiología ruminal .....	4
2.2. Bacterias productoras de ácido láctico en el rumen .....	5
2.3. Características de <i>Streptococcus bovis</i> .....	6
2.4. Bacterias que utilizan ácido láctico en el rumen .....	7
2.5. Características de <i>Pediococcus</i> spp. y <i>Pediococcus acidilactici</i> .....	8
2.6. Usos de <i>Pediococcus acidilactici</i> .....	12
2.7. Aspectos filogenéticos de <i>Pediococcus acidilactici</i> .....	13
2.8. Identificación de microorganismos mediante la secuenciación del gen ARNr 16S .....	13
2.9. Fermentación de carbohidratos por <i>Pediococcus acidilactici</i> .....	14
2.10. Aislamiento y medios de cultivo de <i>Pediococcus acidilactici</i> .....	14
2.11. Tratamientos para el control de acidosis ruminal .....	17
2.12. Uso de ionóforos en rumiantes .....	19
2.13. Sensibilidad de <i>Pediococcus acidilactici</i> a diferentes antibióticos ...	21
<b>3. OBJETIVO GENERAL.....</b>	<b>24</b>
3.1. Objetivos particulares .....	24
<b>4. HIPÓTESIS.....</b>	<b>25</b>
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>26</b>
5.1. Ubicación del estudio .....	26
5.2. Aislamiento de <i>Pediococcus acidilactici</i> .....	26
5.2.1. Obtención del cultivo bacteriano .....	26
5.2.2. Crecimiento del cultivo en medio líquido .....	26
5.2.3. Aislamiento del cultivo en medio sólido .....	28
5.2.4. Conservación del cultivo axénico.....	30
5.3. Evaluación y caracterización del liofilizado .....	31
5.3.1. Tiempo óptimo de hidratación del liofilizado .....	32
5.3.2. Viabilidad de la bacteria ruminal liofilizada .....	32

5.3.3. Curva de crecimiento bacteriano mediante conteo directo y absorbancia .....	32
5.4. Identificación de la bacteria aislada mediante la secuenciación de gen ARNr 16S.....	33
5.4.1. Activación de la cepa.....	33
5.4.2. Extracción y purificación del ADN.....	34
5.4.3. Amplificación del gen ARNr 16S.....	35
5.4.4. Análisis filogenético e identificación de la cepa .....	35
5.5. Evaluación de dos ionóforos en la actividad fermentativa de <i>Pediococcus acidilactici</i> .....	36
5.5.1. Preparación del inóculo bacteriano.....	36
5.5.2. Tratamientos evaluados .....	36
5.5.3. Concentración bacteriana inicial del inóculo .....	37
5.5.4. Variables evaluadas .....	37
5.5.4.1. Degradación <i>in vitro</i> de materia seca (DIVMS).....	37
5.5.4.2. Concentración de ácidos grasos volátiles (AGV) .....	38
5.5.4.3. Concentración de nitrógeno amoniacal (NH <sub>4</sub> ).....	39
5.5.4.4. Concentración de ácido láctico.....	39
5.5.4.5. Variables microbiológicas.....	40
5.5.4.5.1. Concentración de bacterias totales (BT) .....	40
5.5.4.5.2. Concentración de bacterias celulolíticas (BC) .....	40
5.5.4.5.3. Bacterias productoras de ácido láctico (BAL).....	41
5.6. Diseño y análisis estadístico.....	42
<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>44</b>
6.1. Cultivo bacteriano aislado .....	44
6.2. Tiempo óptimo de rehidratación del liofilizado .....	44
6.3. Curva de crecimiento bacteriano .....	46
6.4. Amplificación del gen ARNr 16S y análisis filogenético de la cepa aislada .....	49
6.5. Caracterización metabólica de <i>Pediococcus acidilactici</i> .....	53
6.5.1. Degradación <i>in vitro</i> de la materia seca .....	53



6.5.2.	Concentración de ácidos grasos volátiles .....	55
6.5.3.	Concentración de nitrógeno amoniacal.....	59
6.5.4.	Concentración de ácido láctico .....	60
6.6.	Variables microbiológicas .....	62
6.6.1.	Concentración de bacterias totales.....	62
6.6.2.	Concentración de bacterias ácido lácticas .....	63
6.6.3.	Concentración de bacterias celulolíticas .....	65
<b>7.</b>	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>67</b>
<b>8.</b>	<b>LITERATURA CITADA.....</b>	<b>69</b>

## INDICE DE CUADROS

		<b>Página</b>
<b>Cuadro 1.</b>	Características fenotípicas de algunas especies de <i>Pediococcus</i> spp.....	10
<b>Cuadro 2.</b>	Características fenotípicas de <i>Pediococcus acidilactici</i> .	11
<b>Cuadro 3.</b>	Tipo de crecimiento de bacterias productoras de ácido láctico (BAL) en diferentes medios de cultivo.....	15
<b>Cuadro 4.</b>	Condiciones de crecimiento de diferentes especies del género <i>Pediococcus</i> .....	17
<b>Cuadro 5.</b>	Susceptibilidad a diferentes antibióticos de 36 cepas de <i>Pediococcus</i> spp.....	23
<b>Cuadro 6.</b>	Dieta a evaluar.....	27
<b>Cuadro 7.</b>	Fórmula del medio de cultivo líquido (caldo Estreptocel, Dioxon; EE. UU.).....	28
<b>Cuadro 8.</b>	Fórmula del medio de cultivo sólido (agar Estreptocel, Merck; EE. UU.).....	29
<b>Cuadro 9.</b>	Medio para dilución de los cultivo de BAL aislados.....	30
<b>Cuadro 10.</b>	Medio de cultivo líquido (G-FR) para el crecimiento de la bacteria ruminal aislada.....	31
<b>Cuadro 11.</b>	Composición del medio de cultivo base (GCA-FR) para crecimiento y supervivencia de bacterias totales y celulolíticas.....	41
<b>Cuadro 12.</b>	Medio de cultivo MRS (Merck; EE. UU.) para el cultivo de bacterias productoras de ácido láctico.....	42
<b>Cuadro 13.</b>	Concentración de <i>Pediococcus acidilactici</i> en el liofilizado (técnica de NMP).....	45
<b>Cuadro 14.</b>	Concentración de <i>Pediococcus acidilactici</i> mediante el conteo en la cámara Petroff-Hausser y un espectrofotómetro UV-VIS.....	47

<b>Cuadro 15</b>	Porcentaje de semejanza de la bacteria ruminal aislada con el género <i>Pediococcus</i> .....	49
<b>Cuadro 16.</b>	Degradación <i>in vitro</i> de la materia seca (DIVMS; %), pH del medio de cultivo de una dieta alta en concentrado (85%) con y sin la adición de ionóforos.....	54
<b>Cuadro 17.</b>	Concentración (mM L <sup>-1</sup> ) de acético, propiónico, butírico y AGV totales.....	57
<b>Cuadro 18.</b>	Concentración (%) de ácido acético, propiónico y butírico a las 72 h de incubación.....	58
<b>Cuadro 19.</b>	Concentración (mg dL <sup>-1</sup> ) de nitrógeno amoniacal.....	59
<b>Cuadro 20.</b>	Concentración (µg mL <sup>-1</sup> ) de ácido láctico.....	61
<b>Cuadro 21.</b>	Concentración de bacterias totales (BT).....	63
<b>Cuadro 22.</b>	Concentración de bacterias ácido lácticas (BAL).....	64
<b>Cuadro 23.</b>	Concentración de bacterias celulolíticas (BC).....	66

## INDICE DE FIGURAS

	<b>Página</b>
<b>Figura 1.</b> Curva de crecimiento de <i>Pediococcus acidilactici</i> .....	48
<b>Figura 2.</b> Productos de la amplificación del gen ARNr 16S de la bacteria ruminal aislada (a, b y c).....	49
<b>Figura 3.</b> Arbol filogenético para la cepa de <i>Pediococcus acidilactici</i> .....	50

## 1. INTRODUCCIÓN

El rumen es un órgano colonizado por una compleja y variada comunidad de especies bacterianas, las cuales se han clasificado tradicionalmente mediante el estudio de caracteres morfológicos (forma celular, características de la membrana) y fisiológicos (necesidades de nutrientes). Para realizar estos estudios es indispensable el aislamiento en medios de cultivo generales y selectivos. Sin embargo, aunque existen medios de cultivo para aislar selectivamente a diferentes microorganismos del rumen, algunas especies de bacterias no han podido ser cultivadas y aisladas debido a la falta de conocimiento de los nutrientes que requieren dichos microorganismos (Krause y Russell, 1996). Hay métodos de aislamiento e identificación de bacterias basados en características morfológicas y bioquímicas (p. ej. API20 Estrep), pero las técnicas moleculares son más confiables para clasificar microorganismos dado que la metodología está basada en diferencias filogenéticas (Madigan *et al.*, 2003).

Algunas técnicas moleculares utilizadas para la detección, identificación y clasificación de microorganismos están basadas en la secuenciación del gen ARNr 16S. Aunque la identificación se puede lograr secuenciando el total de ADN bacteriano, en los estudios de filogenia se puede identificar un microorganismo al secuenciar únicamente el gen ARNr 16S, por poseer secuencias nucleotídicas compuestas por regiones alternadas de alta y baja variabilidad que se han mantenido uniformes a lo largo de la evolución y que permiten identificar microorganismos mediante análisis filogenéticos (Madigan *et al.*, 2003).

También existen marcadores moleculares alternativos, el gen del ARNr 16S es el más utilizado debido a que es una molécula presente en todas las procariotas, su estructura y función ha permanecido constante durante

millones de años (se calcula un cambio entre 1 y 2% cada 50 millones de años). Así las alteraciones en la secuencia reflejan cambios aleatorios, pero con la suficiente variabilidad para determinar no solamente las diferencias entre los microorganismos más lejanos, sino también entre los más próximos; además, las secuencias nucleotídicas constantes del gen presentan la ventaja de proporcionar un sitio de iniciación adecuado para la elongación de los iniciadores (Valadez y Kahl. 2000). El uso de esta técnica con iniciadores universales, PCR y programas que facilitan la caracterización e identificación filogenética permitirá demostrar el amplio y variado ecosistema microbiológico que habita el rumen.

En el rumen existe una concentración de  $10^{10}$  a  $10^{11}$  bacterias  $\text{mL}^{-1}$  de fluido ruminal las cuales pueden estar adheridas a partículas de alimento, a la pared del rumen y en la fase líquida. Hay representantes de todas las morfologías de bacterias (bastones, filamentos, cocos, cocobacilos, estreptococos, espiroquetas y treponemas), las cuales se encuentran de forma simple, en cadenas o formando colonias; con características específicas de tinción (Gram positiva o Gram negativa), habilidad de crecimiento en condiciones aeróbicas o anaeróbicas y con especialización en la fermentación de ciertos productos (amilosa, celulosa, hemicelulosa, proteína, urea, metanogénicas, utilizadoras de amonio, lípidos, ácidos orgánicos) y bacterias productoras de ácido láctico (BAL; Cobos, 2007).

En particular, las BAL como *Streptococcus lactis*, *S. thermophilus*, *Lactobacillus* spp., *Pediococcus acidilactici* y *Enterococcus* spp. se utilizan en la industria lechera para la producción de yogurt y queso (Klare *et al.*, 2005). Este grupo de BAL incluye la especie *Streptococcus bovis*, la cual también se asocia con problemas metabólicos como la acidosis ruminal. Los microorganismos productores de ácido láctico se caracterizan por producir acidez (baja de pH) en los productos o al ambiente donde se desarrollan. Esta condición resulta en algunos casos, como en la industria lechera y en la

producción de ensilado, favorable a la calidad de sus productos; sin embargo, en rumiantes alimentados con elevadas cantidades de carbohidratos de fácil fermentación, esta alta disponibilidad de carbohidratos permite el desarrollo de BAL, las cuales producen ácido láctico y la acidificación del contenido ruminal, provocando una disminución en la actividad metabólica de otras bacterias ruminales, pérdidas económicas elevadas y en situaciones extremas la muerte del animal (Ipharraguerre y Clark, 2003). En general, la acidosis ruminal subclínica se atribuye a un crecimiento excesivo de la bacteria ruminal *S. bovis* (Russell *et al.*, 1987; Owens *et al.*, 1998;), pero es posible que otras BAL (*Lactobacillus* spp. y *Enterococcus* spp.) participen en la generación anormal de ácido láctico en rumen (Nocek *et al.*, 2000). El aislamiento e identificación de estos microorganismos permitirá ampliar el conocimiento acerca de las bacterias ruminales que pueden causar acidosis ruminal en ganado lechero y de engorda alimentados con dietas que contienen elevadas concentraciones de carbohidratos de fácil fermentación.

## **2. REVISIÓN DE LITERATURA**

### **2.1. Microbiología ruminal**

El rumen es un ecosistema natural con alta diversidad microbiana con 24 géneros y 63 especies de bacterias (Yokoyama y Johnson, 1993; Dehority, 2003), 30 géneros de protozoarios y cinco de hongos anaerobios (Williams y Coleman, 1992; Orpin, 1974). Los principales microorganismos son las bacterias con una concentración de  $10^{10}$  a  $10^{12}$  células  $\text{mL}^{-1}$  de fluido ruminal. La mayoría de estas bacterias son anaerobias estrictas y Gram negativas, aunque también existen algunas bacterias anaerobias facultativas (tolerantes a la presencia de oxígeno). La morfología de las bacterias ruminales es variada (cocos, cocobacilos, bacilos, filamentos, espiroquetas, espiroformes y treponemas) y según la degradación que efectúan en el rumen se clasifican en amilolíticas, celulolíticas, hemicelulolíticas, proteolíticas, ureolíticas, metanogénicas, utilizadoras de amoníaco, de lípidos y de ácidos orgánicos (Cobos, 2007).

Los microorganismos anaeróbicos del rumen obtienen su energía metabólica a partir de la fermentación de carbohidratos y de esqueletos carbonados de otras moléculas (p. ej. aminoácidos). Los productos finales de la degradación incluyen, principalmente, ácidos grasos volátiles (acético, propiónico y butírico, isobutirato e isovalerato), ácidos orgánicos (p. ej. lactato), metano ( $\text{CH}_4$ ), bióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) y nitrógeno amoniacal ( $\text{NH}_4$ ) (Yokoyama y Johnson, 1993; Dehority, 2003). El metabolismo ruminal de los carbohidratos trae como consecuencia una reducción en la disponibilidad de glucosa para cubrir las demandas del animal; por ello, el proceso de glucogénesis es vital para los rumiantes (Jarrige, 1990; Fahey y Berger, 1993), así como la absorción de los ácidos grasos volátiles (AGV) los cuales aportan 70 a 80% de los requerimientos energéticos del rumiante (Calsamiglia y Ferret, 2002). Los AGV son absorbidos a través de la pared



ruminal y su tasa de absorción está influenciada por el pH ruminal; a un pH ruminal de 6.8 la cantidad total de AGV producidos y absorbidos es proporcional a la cantidad de materia orgánica fermentada en el rumen, y por consiguiente a la cantidad de masa microbiana producida (Huber, 1976; Jarrige, 1990). Pero cuando aumenta la cantidad de carbohidratos de fácil fermentación en la dieta se produce un cambio en el tipo de fermentación microbiana que resulta en un aumento en la producción de ácido láctico (Al Jassim *et al.*, 2003). En condiciones normales de alimentación la concentración de ácido láctico en rumen es mínima ( $<7 \text{ mM L}^{-1}$ ), lo que permite mantener el pH ruminal entre 6.2 y 6.8 (Jarrige, 1990; Owens *et al.*, 1998; Ipharraguerre y Clark, 2003); cuando el pH ruminal es menor a 6.2 la absorción de AGV disminuye (Ghorbani *et al.*, 2002). Como resultado del aumento en la concentración de ácido láctico y de la acumulación de AGV en rumen, se produce la acidosis ruminal.

## **2.2. Bacterias productoras de ácido láctico en el rumen**

Mientras que dietas altas en fibra permiten el desarrollo de bacterias celulolíticas y hemicelulolíticas, dietas con bajas cantidades de fibra y alto contenido de carbohidratos de fácil degradación estimulan el crecimiento de bacterias amilolíticas: *S. bovis*, *Prevotella ruminicola*, *Bacteroides amylophilus*, *Butyrivibrio fibrisolvens* y *Eubacterium* sp., que normalmente producen AGV usando almidón u otra fuente de carbohidratos (Huntington y Britton, 1978; Beauchemin *et al.*, 2003). Sin embargo, cuando el contenido de carbohidratos dentro del rumen es elevado se aumenta la producción de AGV y lactato. El lactato también es producido por otras bacterias amilolíticas menos eficientes como *Ruminococcus* sp., *Succinivibrio dextrinosolvens* y *Lachnospira multiparus* (Hungate, 1969; Yokoyama y Johnson, 1993).

Cuando la velocidad de producción de AGV y lactato excede la absorción, el pH del rumen se reduce a 6.2, que favorece el rápido crecimiento de otras bacterias *S. bovis*, *Lactobacillus* spp que fermentan los carbohidratos a ácido láctico (Al Jassim *et al.*, 2003). En general se considera que *S. bovis* es la causante de la acidosis ruminal subclínica, mientras que bacterias del género *Lactobacillus* dominan la microflora del rumen una vez que se establece la fermentación láctica, reduciendo aun más el pH entre 5.0 y 5.5, lo que resulta en una acidosis ruminal crónica que puede ser mortal para el rumiante (Huntington, 1996; Wallace, 1996).

### **2.3. Características de *Streptococcus bovis***

Es una bacteria Gram-positiva, catalasa negativo, sin motilidad, ovoide o coco, con una longitud de 0.5 a 1.5  $\mu\text{m}$ , anaerobia facultativa, aunque se han encontrado especies o cepas anaerobias estrictas y aerotolerantes. Tiene una capacidad de crecimiento acelerado, duplicando su población de 21 hasta 27 min. Algunos de los substratos que fermentan son: almidón, maltosa, sucrosa, glucosa, fructosa, galactosa, manosa, lactosa, produciendo en su mayor parte lactato, aunque también produce acetato, formato, etanol y  $\text{CO}_2$ ; este último es estimulador para su crecimiento. También *S. bovis* tiene la capacidad de utilizar celulodextrinas derivadas de celulosa cristalina, por lo cual puede sobrevivir en rumiantes alimentados solo con forraje. El peptidoglicano de su pared celular contiene ácido glutámico, lisina, alanina, treonina y serina, pero no tiene ácido diaminopimélico (DAPA) (Hardie, 1986; Madigan *et al.*, 2003), aunque Stewart y Bryant (1988) reportaron seis cepas de *S. bovis* que contenían DAPA en su pared celular. Puede crecer utilizando amonio como única fuente de nitrógeno, pero crece rápidamente cuando tiene péptidos, aminoácidos y algunas vitaminas. La biotina, la prolina, la tiamina y la arginina son esenciales para su crecimiento, pero con un variado requerimiento de aminoácidos entre cepas. Además *S. bovis* posee susceptibilidad a la penicilina y puede sobrevivir a temperatura máxima de

60 °C y mínima de 22 °C, mientras que la temperatura óptima para su crecimiento es 37 °C, aunque algunas cepas requieren 45 °C (Hardie, 1986; Stewart y Bryant, 1988; 1993; Madigan *et al.*, 2003). *S. bovis* es importantes debido a la función que desempeña en el desarrollo de acidosis láctica en rumiantes alimentados con dietas altas en almidón. Es una bacteria que normalmente habita en el rumen a concentraciones de  $10^7$  mL<sup>-1</sup> en dietas a base de forraje, sin embargo, cuando se proporciona altas cantidades de carbohidratos de fácil fermentación (>40%) su concentración aumenta hasta  $10^{10}$  bacterias mL<sup>-1</sup> (Martin y Russell, 1987).

#### **2.4. Bacterias que utilizan ácido láctico en el rumen**

La concentración normal de ácido láctico en el rumen es 7 mM L<sup>-1</sup> y es metabolizado por *Vibrio succinogenes*, *Megasphaera elsdenii*, *Selenomonas ruminantium* y *Anaerovibrio lipolítica*, que lo usan como fuente de energía para su crecimiento (Russell, 1998; Owens *et al.*, 1998; Ipharraguerre y Clark, 2003). También se ha reportado esta característica metabólica en las especies *Veillonella alcalescens* y *Propionibacterium acnes* (Therion *et al.*, 1982). El metabolismo de estas bacterias utilizadoras de ácido láctico permite explicar la baja concentración de este ácido en el rumen y su nulidad para reducir el pH en el rumen de animales sanos. Sin embargo, si la producción de ácido láctico (producto del metabolismo de las BAL) en el rumen es mayor a la capacidad de las bacterias que lo usan, el pH ruminal se acidifica a 5.5 o menos. La reducción del pH ruminal resulta en un cambio en la microflora ruminal que se caracteriza por una reducción en la población de bacterias sensibles a pH ácido y que normalmente habitan el rumen (Ipharraguerre y Clark, 2003) y un aumento en la concentración de BAL como *S. bovis*, *Lactobacillus* sp., *Enterococcus* sp. y *Lactococcus* sp. (Burrin y Britton, 1986).

Russell (1998) reporta que una alta concentración de almidones en la dieta permite el crecimiento de *M. elsdenii*, bacteria capaz de utilizar el lactato producido por BAL. Lo anterior sucede naturalmente hasta el límite donde la producción de ácido láctico no excede la capacidad de utilización de *M. elsdenii*; sin embargo, hay un efecto negativo en dicha capacidad a medida que el pH ruminal desciende. El mismo autor reporta que cuando el pH ruminal es 5.2 la bacteria *M. elsdenii* tiene cierta capacidad para transformar el ácido láctico en propionato, pero cuando el pH llega a 5.1 se nulifica su actividad metabólica sobre el lactato. Hay una interacción conocida como alimentación cruzada, donde, las bacterias amilolíticas que degradan carbohidratos no estructurales (*S. bovis*, *Prevotella ruminicola*, *Bacteroides amylophilus*, *Butyrivibrio fibrisolvens* y *Eubacterium sp.*) y bacterias celulolíticas (*Fibrobacter succinogenes* y *Ruminococcus albus*) se interrelacionan de la siguiente manera: 1) el primer grupo (amilolíticas) hidroliza el almidón mediante la enzima alfa-amilasa produciendo acetato, CO<sub>2</sub> y lactato (ácido orgánico) como productos finales de su metabolismo, mientras que las celulolíticas se adhieren a la fibra hidrolizando celulosa liberando unidades de glucosa, la cual al ser fermentada para producir ATP, libera ácidos orgánicos como el succínico; 2) Los ácidos orgánicos (succínico y láctico) producidos por ambos grupos son utilizados, aparte de *M. elsdenii*, por *Vibrio succinogenes*, *Selenomonas ruminantium* y *Anaerovibrio lipolítica* como principal fuente de energía para su metabolismo; 3) el metabolismo de estas bacterias utilizadoras de ácidos orgánicos es la pauta para explicar la baja concentración de estos ácidos orgánicos, evitando la disminución del pH en el rumen de animales sanos (Cotta, 1992; Yokoyama y Johnson, 1993; Cobos, 2007).

## **2.5. Características de *Pediococcus* spp. y *Pediococcus acidilactici***

*Pediococcus* spp. son BAL homofermentativas, Gram-positivas, sin motilidad, no forman esporas, catalasa negativos, anaerobios facultativos de la familia

*Streptococcaceae* y son utilizados en la biotecnología y en la industria alimenticia (Sarma y Mohanty, 1998). Las bacterias de este género son catalasa y oxidasa negativas, usualmente no acidifican o cuajan la leche, no proteolíticas, no forman indol, no reducen nitritos, no hidrolizan el hipurato de sodio y no son patógenas de plantas y animales (Garmyn *et al.*, 1995; Leisner *et al.*, 1999). El porcentaje molar G + C en el ADN está dentro del intervalo de 34-42 °C. En el género *Pediococcus* las bacterias son esféricas, nunca alongadas, la división celular ocurre alternativamente en dos planos formando tétradas, sin embargo siempre están presentes en pares y raramente crecen como células simples o formando cadenas (Garvie, 1986).

En medio de cultivo sólido las colonias tienen un tamaño de 1.0 a 2.5 mm de diámetro, lisas, redondas y color blanco grisáceo. En medios de cultivo líquido usualmente tienen una turbidez uniforme, todas las especies crecen a 30 °C pero el intervalo de temperatura óptima de crecimiento es 25 a 40 °C. Los *Pediococcus* spp. son quimiorganótrofos y requieren medios de cultivo enriquecidos con factores de crecimiento, aminoácidos y carbohidratos. Todas las especies requieren ácido nicotínico, ácido pantoténico y biotina, pero ninguna especie requiere tiamina, *p*-aminobenzoico y cobalamina (De Man *et al.*, 1960; El- Baradei *et al.*, 2007).

*P. acidilactici* pertenece al género *Pediococcus*, el cual es un grupo de bacterias homofermentativas con características ecológicas, morfológicas y fisiológicas similar a la de los estreptococos productores de ácido láctico. Sin embargo, los *Pediococcus* sp. puede diferenciarse de los Estreptococos por su incapacidad para reaccionar con el antisuero para *Streptococcus* sp. y por la forma de división (González y Kunka, 1983; 1987). En condiciones anaerobias el género *Pediococcus* fermenta la glucosa por la vía Embden-Meyerhof produciendo piruvato y posteriormente DL o L-(+) lactato sin producir gas, catalizada por las enzimas; dependientes de NADH, la L-(+) lactato deshidrogenasa (L-LDH) y la D-(-)-LDH (Deibel *et al.*, 1960; González

y Kunka, 1983; 1987; Kunene *et al.*, 2000). En el Cuadro 1 se presentan varias características fenotípicas de especies del género *Pediococcus*.

**Cuadro 1. Características fenotípicas de algunas especies de *Pediococcus* spp.**

Característica	<i>P. damnosus</i>	<i>P. parvullus</i>	<i>P. inopinatus</i>	<i>P. dextrinicus</i>	<i>P. pentosaceus</i>	<i>P. acidilactici</i>	<i>P. halophilus</i>	<i>P. urinaequei</i>
Crecimiento a 45 °C	-	-	-	-	D	+	-	-
Crecimiento a pH 7.0	-	+	+	+	+	+	+	+
Crecimiento a pH 4.5	+	+	ND	-	+	ND	-	-
Crecimiento en 10% NaCl	-	-	-	-	D	-	+	-
Producción de catalasa	-	-	ND	-	+	+	-	-
Hidrólisis de arginina	-	-	-	-	+	+	-	-
Producción de ácido desde								
Arabinosa	-	-	-	-	+	d	+	d
Ribosa	-	-	-	-	+	+	+	ND
Xilosa	-	-	-	-	D	+	-	d
Ramnosa	-	-	-	-	D	d	-	ND
Lactosa	-	-	+	d	D	d	-	d
Maltosa	d	+	+	+	+	-	+	+
Sucrosa	d	-	D	d	-	-	+	+
Trealosa	+	d	+	-	+	d	+	+
Maltotriosa	d	d	D	+	-	-	+	ND
Dextrina	-	-	D	+	-	-	-	+
Almidón	-	-	-	+	-	-	-	-
Glicerol	-	-	-	-	-	-	+	-
Manitol	-	-	-	-	-	-	-	d
Sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	-
Arbutina	d	ND	ND	ND	+	ND	ND	ND
$\alpha$ -Metilglucosamida	d	d	D	+	-	-	+	ND
Formación de lactato	DL	DL	DL	L(+)	DL	DL	DL	L(+)

Garvie (1986) +, 90% o mas de las cepas son positivos; -, 90% o mas de las cepas son negativos; d, 11-89% de las cepas son positivas; ND, no determinado.

En el Cuadro 2 se presentan características fenotípicas de la especie *P. acidilactici*.

**Cuadro 2. Características fenotípicas de *Pediococcus acidilactici*.**

<b>Prueba bioquímica</b>	<b>Resultado</b>
Acidificación de	
Glucosa	+
Arabinosa	+
Ribosa	+
Xilosa	+
Ramnosa	+
Lactosa	-
Maltosa	-
Sucrosa	-
Almidón	-
Manitol	-
Sorbitol	-
Hidrólisis de hipurato	+
Desanimación de arginina	+
Reacción de Voges-Proskauer	-
Reacción Bilis-esculina	+
Reacción Pirrolidonilarilamidasa	-
Reacción con Leucina	+
aminopeptidasa	
$\gamma$ -Galactocidasas	+
Fosfatasa alcalina	-
Reacción nitrato	-
Hidrólisis con urea	-
Motilidad	-
Crecimiento en 6.5% NaCl	+

(González y Kunka, 1983; Golledge *et al.*, 1990); +, positivo; -, negativo.

Diferentes pruebas de confirmación bioquímica confirman que *P. acidilactici* no produce CO<sub>2</sub> a partir de carbohidratos como la glucosa, arabinosa, ribosa, y xilosa, da una reacción positiva al suero para estreptococos tipo D, bilis-esculina y leucina aminopeptidasa. Tiene capacidad de crecer a 45 °C, cuando la concentración de NaCl es 6.5%. La bacteria no crece en maltosa y manitol (Golledge *et al.*, 1990).

## **2.6. Usos de *Pediococcus acidilactici***

La importancia de *P. acidilactici* en la industria alimenticia está relacionada, al usar diferentes cepas como cultivo iniciador en la fermentación de leche, carne y productos vegetales (Mora *et al.*, 2000). También en producción de cerveza, en procesos de pigmentación y acidificación (Leisner *et al.*, 1999), y para aumentar la vida en anaquel de productos fermentados debido a la producción de ácido láctico y secreción de bacteriocinas por *P. acidilactici* (Stiles, 1996).

En el proceso de ensilaje la adición de *P. acidilactici* favorece un rápido proceso fermentativo, acumulación de ácido láctico, reducción del pH y eliminación de bacterias patógenas (McDonald *et al.*, 1991; Cai *et al.*, 1999). Además, *P. acidilactici* crece a temperatura mayor de 50°C, la cuales se presentan en el proceso de ensilaje (Duchaine *et al.*, 1995). Cuando la concentración de lactobacilos es de 10<sup>3</sup> UFC g<sup>-1</sup> de forraje y el número de otras bacterias es 10<sup>5</sup> UFC g<sup>-1</sup> forraje se obtiene un ensilado de baja calidad, lo cual, no sucede cuando se incluye *P. acidilactici* a la misma concentración de los lactobacilos (Cai *et al.*, 1999). Otra ventaja de *P. acidilactici* sobre *Lactobacillus* sp. es la mayor cantidad de ácido láctico e inhibe el crecimiento de bacterias aerobias, además, cuando aumenta la temperatura (≥ 45 °C) el crecimiento de los lactobacilos es inhibido lo cual no sucede con *P. acidilactici* (McDonald *et al.*, 1991; Plengvidhya *et al.*, 2007). Por tanto, se



recomienda utilizar *P. acidilactici* para acelerar la disminución de pH y controlar el crecimiento de bacterias negativas.

### **2.7. Aspectos filogenéticos de *Pediococcus acidilactici***

Collins *et al.* (1990) y Mora *et al.* (2000) indican una relación filogenética entre diferentes especies del género *Pediococcus* con otros géneros de BAL como *Aerococcus* spp. Collins *et al.* (1990) reportaron que *Pediococcus* spp. tiene relación filogenética heterogénea; por ejemplo, las especies *P. acidilactici*, *P. damnosus*, *P. parvulus*, *P. pentosaceus* tienen menos relación con *Aerococcus viridans* o *A. urinaequi*, que con *P. urinaequi* la cual tiene, filogenéticamente, más relación con *A. viridans* y con *A. urinaequi* de acuerdo con el análisis de la secuencia del gen ARNr 16S y por hibridación ADN-ADN (Felis *et al.*, 2005). También, se ha publicado una interacción genética cercana con BAL mediante la comparación de secuencias del gen ARNr 16S (1500 nucleótidos) y el análisis filogenético de *P. acidilactici*. Al secuenciar el gen ARNr 16S y ADN de géneros: *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella* y *Lactococcus* se concluyó que existe una cercana similitud en el genoma formando un grupo de bacterias filogenéticamente coherente que permite separarlas como un grupo inter especies de bacterias con un intervalo de similitud de 97 a 99% (Cai *et al.*, 1999; Ennahar *et al.*, 2003).

### **2.8. Identificación de microorganismos mediante la secuenciación del gen ARNr 16S**

El gen ARNr 16S es un polirribonucleótido de 1500 nucleótidos ubicado en el ADN (16S ADNr) que al ser amplificado y secuenciado mediante técnicas de biología molecular (PCR) se puede obtener información para construir el árbol filogenético que permite identificar un microorganismo. Por sus características bioquímicas y su secuencia de nucleótidos, el gen ARNr 16S

forma una estructura secundaria caracterizada con segmentos de doble cadena, alternando con regiones de cadenas sencillas; así también este gen procede de la subunidad pequeña del ribosoma (30S) se caracteriza por: 1) tener regiones comunes conservadas; 2) tener regiones de variación que se concentran en zonas específicas (Valadez y Kahl, 2000). Las regiones alternadas de alta y baja variabilidad que se han conservado durante la evolución contiene información de eventos evolutivos que permiten diferenciar e identificar filogenéticamente a los microorganismos (Valadez y Kahl, 2000; Madigan *et al.*, 2003).

### **2.9. Fermentación de carbohidratos por *Pediococcus acidilactici***

*P. acidilactici* metaboliza L-arabinosa, D-ribosa, D-xilosa, D-glucosa, D-fructosa, galactosa, D-manosa, ramnosa, celobiosa, salicina y trealosa (Cai *et al.*, 1999; Mora *et al.*, 2000); mientras que no puede metabolizar inositol, maltosa y lactosa (Thomas *et al.*, 1985; Caldwell *et al.*, 1996; Mora *et al.*, 2000). Se han insertado plásmidos pPN-1 a *P. acidilactici* con la finalidad de habilitarla en el uso de lactosa y reducir el pH del medio. Cuando la bacteria modificada genéticamente puede metabolizar caseína, tiene potencial para sustituir a *Streptococcus thermophilus* en la industria del queso (Mora *et al.*, 2000). *P. acidilactici* crece en medios de cultivo con diferentes carbohidratos (Cuadro 1 y 2). La glucosa y otros carbohidratos son metabolizados por la ruta de Embden-Meyerhof produciendo 2 moles de DL o L (+) lactato sin la producción de gas (Garvie, 1986).

### **2.10. Aislamiento y medios de cultivo de *Pediococcus acidilactici***

El género *Pediococcus* tolera antisépticos y una concentración de NaCl de 7.5%; esto permite usar acetato de talio y cristal violeta para inhibir el crecimiento de bacterias Gram-negativas (Golledge *et al.*, 1990; Garvie, 1986), sin embargo, *P. acidilactici* y *P. pentosaceus* crecen en medio de

cultivo selectivo para *Lactobacillus* (Klare *et al.*, 2005). El aislamiento diferencial entre *P. pentosaceus* y *P. acidilactici* se basa en la capacidad de fermentar carbohidratos específicos; mientras *P. acidilactici* no crece en medios de cultivo con maltosa o sucrosa, tiene la habilidad de crecer en medio con cisteína-tripticosa y con arabinosa, en el cual no crece *P. pentosaceus* (Riebel y Washington, 1990). Se han usado medios de cultivo para bacterias productoras de ácido láctico (BAL) de los géneros *Lactobacillus* y *Pediococcus* (Cuadro 3).

**Cuadro 3. Tipo de crecimiento de bacterias productoras de ácido láctico (BAL) en diferentes medios de cultivo.**

Microorganismo	Crecimiento después de la incubación (37 °C, 24 h)										
	MRS	CAMHB	CAMHB + Vitox	CAMHB + 5% LHB <sup>b</sup>	CAMHB (50%) + MRS (50%) <sup>c</sup>	CAMHB (90%) + MRS (10%)	LSM: ITS (90%) + MRS (10%)				
	A <sup>a</sup>	A	B	A	B	A	B	A	B	A <sup>a</sup>	A <sup>a</sup>
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	+	-	(+)	+	+	(+)	(+)	-	-	+	+
<i>L. johnsonii</i>	+	-	(+)	+	+	-	(+)	+	+	+	+
<i>L. paracasei</i>	+	-	(+)	+	+	(+)	+	-	-	+	+
<i>L. plantarum</i>	+	(+)	+	+	+	(+)	+	+	+	+	+
<i>L. reuteri</i>	+	-	(+)	(+)	+	-	+	+	+	+	+
<i>L. rhamnosus</i>	+	-	(+)	+	+	(+)	+	+	+	+	+
<i>Lactococcus lactis</i>	+	+	+	+	+	(+)	+	+	+	+	+
<i>Pediococcus acidilactici</i>	+	(+)	+	+	+	(+)	+	-	+	+	+
<i>P. pentosaceus</i>	+	+	+	-	-	(+)	+	+	+	+	+

Klare *et al.* (2005). **MRS**, medio de cultivo Man-Rogosa-Sharpe agar; **CAMHB**, medio de cultivo Mueller-Hinton; **Vitox**, suplemento para enriquecer medio de cultivo (factores de crecimiento); **LHB**, suplemento lisado de sangre de caballo (5%), **LSM**, suplemento de L-cisteína; **ITS**, medio de cultivo agar Iso-Senitest; **A**, condiciones de aerobias; **B**, 5% de CO<sub>2</sub>; **+**, crecimiento; **(+)**, débil crecimiento; **-**, nulo crecimiento; <sup>a</sup> idénticos resultados con 5% de CO<sub>2</sub>; <sup>b</sup>, idéntico crecimiento con CAMHB + 2.5 LHB; <sup>c</sup>, idéntico crecimiento con CAMHB (75%) y MRS (25%).

De acuerdo con Klare *et al.* (2005), *P. acidilactici* tuvo un crecimiento catalogado de débil a fuerte (Cuadro 3) en la mayoría de los medios de cultivo evaluados con excepción de los medios de cultivo CAMHB (50%) + MRS (50%) en condiciones aerobias. En este estudio se demostró la capacidad de *P. acidilactici* de crecer en condiciones aerobias y anaerobias en el medio MRS. Se ha reportado crecimiento de *P. acidilactici* en medios de cultivo TGE (Trypticase Peptona-Glucosa-Extracto de levadura) a 37 °C por 20 h; sin embargo, no hubo crecimiento de la bacteria en medios de cultivo que tenían triptona de caseína (Osmanagaoglu *et al.*, 1998).

Las cepas de *Pediococcus* son conservadas por liofilizado (en medios de cultivo que contienen suero de caballo y 7.5% de glucosa) al final de la fase de crecimiento exponencial y el inicio de la fase estacionaria (Deibel *et al.*, 1960). Garvie (1986) indica que las condiciones de crecimiento son indispensables para mantener la viabilidad de la bacteria durante 3 o 4 meses a 4 °C en medio de cultivo con suero de leche con 1.0% de glucosa, extracto de levadura 0.3 % y carbonato de calcio 1.0%.

El-Baradei *et al.* (2007) señalan que *Pediococcus* spp pueden ser aisladas por su tolerancia a temperatura, pH del medio y concentración de NaCl (Cuadro 4). La leche no puede ser usado como sustrato en medios de cultivo para *Pediococcus* spp., ya que ésta no metaboliza lactosa, además de que requieren de factores de crecimiento no disponibles en este sustrato. Aunque *Pediococcus* spp. metaboliza monosacáridos (glucosa), la capacidad para metabolizar pentosas es limitada para *P. pentosaceus*, *P. acidilactici*, *P. urinae* y *P. halophilus* (Cuadro 1). Aunque, la ruta metabólica para la fermentación de la glucosa por *Pediococcus* spp, indicada arriba, es conocida, para algunas cepas de *Pediococcus* se ha reportado la presencia de aldolasas y diferentes formas de la enzima lactato deshidrogenasa (London *et al.*, 1968; Garvie 1986).

**Cuadro 4. Condiciones de crecimiento de diferentes especies del género *Pediococcus*.**

Característica	<i>P. damnosus</i>	<i>P. parvullus</i>	<i>P. inopinatus</i>	<i>P. dextrinicus</i>	<i>P. pentosaceus</i>	<i>P. acidilactici</i>	<i>P. halophilus</i>	<i>P. urinaequei</i>
<b>Crecimiento a</b>								
35 °C	-	+	+	+	+	+	+	+
40 °C	-	-	-	+	+	+	-	+
50 °C	-	-	-	-	-	+	-	-
<b>Crecimiento a</b>								
pH 4.2	+	+	-	-	+	+	-	-
pH 7.5	-	+	D	+	+	+	+	+
pH 8.5	-	-	-	-	d	d	+	+
<b>Crecimiento a</b>								
4 % NaCl	-	+	+	+	+	+	d	+
6.5 % NaCl	-	+	D	-	+	+	+	+
18 % NaCl	-	-	-	-	-	-	+	-

Garvie (1986); +, 90% o más de las cepas son positivos; -, 90% o más de las cepas son negativos; d, 11-89% de las cepas son positivas.

Los autores Back (1978) y Ogier *et al.* (2002) sugieren que la secuenciación de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) ayuda a diferenciar cepas de *P. halophilus*, ésta bacteria forman L-(+) lactato y trazas de D-(-) lactato mediante la enzima L-(+)-LDH, presente en su citoplasma. Otras cepas de *Pediococcus* forman DL-lactato y poseen las enzimas L-(+) y D-(-)-LDH.

### 2.11. Tratamientos para el control de acidosis ruminal

Existen diferentes métodos para controlar o reducir acidosis ruminal: 1) amortiguadores (bicarbonato de sodio, sesquicarbonato de sodio) (Cobos *et*

*al.*, 2005); 2) inclusión de arcilla de bentonita; 3) alimentos adicionados con antibióticos como la virginiamicina (Coe *et al.*, 1999; Al Jassim *et al.*, 2003) o 4) alimentos adicionados con ionóforos lasalocida sódica y monensina (Dennis y Nagaraja, 1981; Teather y Forster, 1998; Ipharraguerre y Clark, 2003); 5) inóculos bacterianos (*Megasphaera elsdenii* o *Saccharomyces cerevisiae*) (Chaucheyras *et al.*, 1995; Al Jassim *et al.*, 2003). Se han evaluado sistemas de manejo como adaptación de los rumiantes a dietas con alto (>40%) contenido de carbohidratos de fácil fermentación, buscando prevenir la incidencia de acidosis ruminal sin alterar o interrumpir la actividad metabólica fermentativa, así como, permitir una adaptación de la microflora y microfauna ruminal (Al Jassim *et al.*, 2003), además identificar bacterias responsables de la fermentación acelerada de los carbohidratos no estructurales y la producción de lactato, por ejemplo *Streptococcus bovis*, *Lactobacillus* sp. y *Enterococcus* sp. (Slyter, 1976).

Un mejor enfoque para el control de acidosis ruminal consiste en eliminar BAL (*Streptococcus* sp., *Lactobacillus* sp. y *Enterococcus* sp.); además de elaborar raciones con ingredientes que previenen la reducción del pH ruminal (Owens *et al.*, 1998; Bach, 2002; Ipharraguerre y Clark, 2003).

Ionóforos como monensina y lasalocida mejoran la eficiencia alimenticia y la ganancia de peso de los rumiantes (Burrin y Britton, 1986; Schelling, 1984). La monensina fue desarrollada como coccidiostato para la alimentación en aves, pero se descubrió que elimina BAL del rumen para controlar acidosis ruminal (Richardson *et al.*, 1976; Russell y Strobel, 1989). También se ha determinado que los ionóforos reducen la producción de metano, ácido acético y un incremento en la producción de ácido propiónico, además de reduce la degradación de proteína hacia amoníaco (Woods *et al.*, 2003). Sin embargo, Russell y Strobel (1989) indican que los ionóforos reducen la concentración de ácido láctico, aumentan la concentración de ácido acético,

propiónico y butírico, reducen el pH ruminal y afectan las poblaciones de bacterias.

Otro tipo de aditivos químicos utilizados en la nutrición animal para reducir la incidencia de acidosis son los amortiguadores de pH (p. ej. bicarbonato de sodio) y los alcalinizantes (óxido de magnesio) mientras que el alcalinizante es un compuesto capaz de aumentar el pH del medio, los amortiguadores son compuestos que tienen la capacidad de aumentar o disminuir la concentración de iones de H<sup>+</sup> libres en el fluido ruminal (Bach, 2002; Cobos *et al.*, 2005).

### **2.12. Uso de ionóforos en rumiantes**

Los ionóforos son antibióticos poliésteres carboxílicos que inhiben el crecimiento de algunas bacterias del rumen (Wallace *et al.*, 1981). Los ionóforos más usados son: la monensina y la lasalocida, estos compuestos orgánicos solubles en ácidos grasos se adhieren a metales catiónicos (K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, Ca<sup>++</sup> y Ba<sup>++</sup>) facilitando su transporte a través de la membrana celular bacteriana, alterando el metabolismo de las bacterias Gram positivas, mientras la mayoría de las bacterias Gram negativas son resistentes. (Chow *et al.*, 1994; Pinos y González, 2000). El efecto en las bacterias Gram positivas es debido a la estructura su membrana celular y a su limitada eficiencia en la síntesis de ATP. Los ionóforos aumentan el flujo de iones al citoplasma forzando a bacteria a aumentar su gasto energético para mantener el balance de iones, pH citoplasmático y la presión osmótica intracelular (Wallace *et al.*, 1981; Nagaraja y Taylor, 1987).

Wallace *et al.* (1981) y Huntington (1996) reportan que la monensina y la lasalocida (33 mg kg<sup>-1</sup> de alimento) incrementa la concentración de AGV, reduce la proporción acetato:propionato y la producción de metano. Además, reduce la concentración de bacterias celulolíticas en dietas con 52% de

alimentos concentrados en energía, aunque los mismos autores indican que las bacterias celulolíticas pueden desarrollar resistencia a los ionóforos. Otros informes indican que el crecimiento y actividad microbiana expresada como producción de ATP o digestibilidad de la MS tiene un incremento con la adición de monensina (Callaway y Martin, 1996; Lana y Russell, 1996).

Van Nevel y Demeyer (1977) mencionan mayor producción de masa microbiana (mg de N<sub>2</sub> microbiano sintetizado por 100 µmol de hexosas fermentadas) de 13 a 80.6 g de N<sub>2</sub> incorporado por kg de MO fermentada, menor concentración de ácido láctico (<4 µmol) e H<sub>2</sub> (2 µmol) y normal fermentación ruminal en dietas con monensina. Además la producción de metano fue reducida por el reducido crecimiento de bacterias metanogénicas, la producción de metano fue 70 contra 1600 µmol entre el tratamiento con monensina y el testigo. Los autores concluyen que el efecto de la monensina sobre las bacterias metanogénicas no es directo, si no por una acción inhibitoria hacia organismos que metabolizan el formato hacia CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>, lo que disminuye la concentración de los principales sustratos utilizados para la formación de metano.

Se ha evaluado el efecto de la monensina en bacterias proteolíticas, su adición a la dieta, disminuye la desaparición ruminal de la proteína, de aminoácidos y reduce la concentración de amonio (Beede y Farlin, 1977; Schelling, 1984). Dinuos *et al.* (1976); Van Nevel y Demeyer (1977), reportan que la adición de monensina no limitó el desarrollo de protozoarios ruminales.

Zinn y Borques (1993) indican que 33 ppm de monensina en dietas altas (>40%) en carbohidratos de fácil fermentación redujo la fermentación ruminal de la MO en 6.6%, pero incrementó (3.2%) la digestión posruminal de la MO. Los mismos autores determinaron una reducción en la concentración



ruminal de acetato (5.3%) y butirato (29.4%) e incremento en propionato (16.3%), este incremento ruminal de propionato causó una reducción en la producción de metano, aunque concluyen que hubo un aumento de 2.7% en EM de la dieta (Van Nevel y Demeyer, 1977; Zinn y Borques, 1993), sin embargo, no siempre se detectan diferencias entre los tratamientos (testigo versus monensina) debido a la adaptación de los microorganismos ruminales a la monensina, y a la reducción en la digestión ruminal de la FDA y del nitrógeno pero sin efecto en la eficiencia fermentativa de las bacterias (Rumpler et al., 1986; Zinn y Borques, 1993).

Weiss y Amiet (1990) mencionan que la adición de lasalocida al alimento no redujo la concentración de AGV comparado con el testigo; sin embargo, la concentración molar de acetato fue 7% menor y de propionato 30% mayor en los rumiantes que recibieron la dieta con lasalocida, mientras que el consumo de MS y ED fue menor en los rumiantes tratados con lasalocida.

### **2.13. Sensibilidad de *Pediococcus acidilactici* a diferentes antibióticos**

González y Kunka (1983) reportan la sensibilidad de esta bacteria a dosis de 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de eritromicina, y de 32 y 64  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de cloranfenicol. Klare *et al.* (2005) determinaron la dosis de susceptibilidad de *P. acidilactici* a la penicilina (0.125  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), ampicilina (1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), ampicilina/sulbatan (1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), gentamicina (4-8  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), estreptomina (32-64  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), vancomicina (>256  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) y teicoplanina (>256  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Mientras que la susceptibilidad de *P. acidilactici* a una dosis de 5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de cloranfenicol, netilmicina, norfloxacin y ciprofloxacina fue indicada por Sarma y Mohanty (1998).

Tankovic *et al.* (1993) y Hummel *et al.* (2007) concluyen que hay un limitado conocimiento respecto a la resistencia de BAL a los antibióticos, debido

principalmente al gran número de géneros y especies de bacterias en este grupo, así como a la gran variedad en el espectro de resistencia. Los mismos autores indican que bacterias de los géneros *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* y *Streptococcus* son poco sensibles a los antibióticos clínicos relevantes como penicilina G, ampicilina, tetraciclina, eritromicina y cloranfenicol. Pero Zarazaga *et al.* (1999) señala resistencia de BAL a aminoglucosidos, quinolonas y glicopéptidos y que el 70% de las BAL aisladas fueron resistentes a gentamicina, estreptomina y ciprofloxacina. Hummel *et al.* (2007) determinaron que un 80% de BAL son resistentes a los aminoglucosidos, mientras Tankovic *et al.* (1993) indican que cepas *Pediococcus* son intrínsecamente resistentes a altos niveles de glicopéptidos ( $MIC_{90} > 1024 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) como vancomicina y teicoplanina. En el Cuadro 5 se presenta la dosis ( $MIC_{50}$  y  $MIC_{90}$ ) de cepas de *Pediococcus*. El imipenem fue el antibiótico B-lactámico más activo ( $MIC_{90} = 0.12 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), la penicilina G ( $MIC_{90} = 0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), amoxicilina ( $MIC_{90} = 1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) y piperacilina ( $MIC_{90} = 2 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) fueron moderadamente activos, el resto de los B-lactámicos tuvieron baja actividad; la netilmicina y la gentamicina ( $MIC_{90} = 1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) fueron los aminoglucosidos más efectivos; las cepas evaluadas de *Pediococcus* fueron susceptibles a la eritromicina, espiramicina, licomicina, clindamicina, pristinamicina factor I (una estreptomina B-tipo antibiótico) y pristinamicina complejo (factores I y II), siendo la clindamicina ( $MIC_{90} = 0.015 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) y la eritromicina ( $MIC_{90} = 0.12 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) más efectivos (Tankovic *et al.*, 1993). En el Cuadro 5 se presenta un resumen de la susceptibilidad del género *Pediococcus* a varios antibióticos.

Hay desarrollo de resistencia a antibióticos en cepas *Pediococcus* por transferencia de genes a través de plásmidos, éstos contienen información genética para la producción de bacteriocinas, de enzimas y de sustancias que degradan antibióticos (González y Kunka, 1983; Torriani *et al.*, 1987).

Cabe mencionar que no se encontraron reportes sobre la sensibilidad de *P. acidilactici* a los antibióticos monensina y lasalocida.

**Cuadro 5. Susceptibilidad a varios antibióticos de 36 cepas de *Pediococcus* spp.**

<b>Antibiótico</b>	<b>MIC* (<math>\mu\text{g mL}^{-1}</math>)<sup>Ω</sup></b>		
	<b>Rango</b>	<b>50%</b>	<b>90%</b>
Penicilina	0.25-1	0.5	0.5
Amoxilina	0.25-2	1	1
Ticarcilina	4-32	16	16
Piperacilina	0.5-2	2	2
Imipenem	0.03-0.12	0.12	0.12
Cefaclor	32-128	64	128
Cefataximina	1-8	4	8
Gentamicina	0.25-2	1	1
Netilmicina	0.25-2	0.5	1
Tobramicina	2-32	4	32
Amikacina	2-32	4	16
Eritromicina	0.06->128	0.12	0.12
Espiramicina	0.12->128	0.5	0.5
Lincomicina	0.06->128	0.5	1
Clindamicina	≤0.008-16	0.015	0.015
Pristinamicina factor I	1-16	4	8
Pristinamicina factor II	16->128	64	>128
Pristinamicina	0.25-2	0.25	1
Tetraciclina	4-128	32	64
Minociclina	1-32	8	16
Novobiocina	0.5-128	1	64
Vancomicina	512->1024	>1024	>1024
Teicoplanina	32->1024	>1024	>1024
Daptomicina	0.12-0.5	0.25	0.5
Ramoplanina	0.25-2	0.5	1
Rifampicina	0.5-8	2	4
Cloranfenicol	1-8	2	4
Ciprofloxacina	1-32	16	32

Tankovic *et al.* (1993); Diagnostic Pasterur, Marnes-la-Coquette, France; <sup>Ω</sup> 50% y 90%; MIC para 50 y 90% de las pruebas aisladas, respectivamente; \* MIC, Concentración Mínima Inhibitoria.

### **3. OBJETIVO GENERAL**

Aislar y seleccionar una bacteria ruminal productora de ácido láctico (BAL) diferente a *Streptococcus bovis* del rumen de ovinos inducidos a acidosis ruminal, así como identificarla genéticamente usando el gen ARNr 16S.

#### **3.1. Objetivos particulares**

1) Aislar una bacteria productora de ácido láctico diferente de *S. bovis* en medios de cultivo anaerobios selectivos para bacterias productoras de ácido láctico y en un medio enriquecido con glucosa.

2) Evaluar *in vitro* la sensibilidad de la bacteria aislada a los ionóforos (monensina y lasalocida) y los efectos en DIVMS, pH, concentración de acético, propiónico, butírico, ácidos grasos volátiles totales (AGV), ácido láctico y nitrógeno amoniacal.

3) Identificar la bacteria aislada mediante pruebas fenotípicas (morfología de colonias, celular y tipo de fermentación) y genéticas por medio de la amplificación y secuenciación del gen ARNr 16S.

#### **4. HIPÓTESIS**

- 1) Es posible aislar al menos una bacteria ruminal diferente a *S. bovis* en un medio selectivo para BAL, usando de fluido ruminal de ovinos con acidosis ruminal subclínica.
  
- 2) El efecto de los ionóforos lasalocida y monensina en el metabolismo de la cepa aislada es similar al reportado en otras bacterias ruminales Gram positivas.
  
- 3) Mediante la amplificación y secuenciación del gen ARNr 16S se puede identificar la cepa bacteriana aislada del rumen de ovinos.

## **5. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.1. Ubicación del estudio**

La presente investigación se desarrolló en la Granja Experimental y Laboratorio de Microbiología Ruminal del Posgrado de Recursos Genéticos y Productividad-Ganadería Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Texcoco, Estado de México. Localizado a 19° 29´ latitud N, 98° 54´ longitud W y una altitud de 2250 m.s.n.m.

### **5.2. Aislamiento de *Pediococcus acidilactici***

#### **5.2.1. Obtención del cultivo bacteriano**

Para estimular el desarrollo de bacterias formadoras de ácido láctico dos ovinos machos criollos fueron alimentados con una dieta que contenía en base seca (BS): 86% de ingredientes concentrados en energía y 11.8% de forrajes y 2.2% de mezcla mineral (Cuadro 6). Una muestra (300 mL) de líquido ruminal fue obtenida mediante una sonda esofágica y depositada en matraces Enlermeyer (500 mL capacidad) donde se aplicó flujo de CO<sub>2</sub> por 30 s; Los matraces fueron sellados con tapón de hule negro y congelados a -10 °C por 72 h. Luego fueron liofilizados por 72 h en una liofilizadora (Labconco, modelo Freezone-6; EE. UU.), a -40 °C y un vacío de 133x10<sup>-3</sup> mBar, hasta obtener un producto libre de humedad.

#### **5.2.2. Crecimiento del cultivo en medio líquido**

Para el primer aislamiento (primera transferencia) fue preparado un medio de cultivo selectivo para el crecimiento de BAL (caldo Estreptocel, Dioxon, EE. UU.; Cuadro 7), a razón de 30 g L<sup>-1</sup> de agua destilada, y fue esterilizado 15 min en autoclave (Tuttnaver/brinkmann modelo 2540E; EE. UU.) a 118

°C. Luego, 4.5 mL de medio del cultivo fueron depositados en tubos de cultivo (13 x 100 mm) e incubados 72 h a 38 °C para comprobar su esterilidad. Para la inoculación fueron depositados 0.05 g del líquido ruminal liofilizado por triplicado en los tubos de cultivo con el medio de cultivo Estreptocel con flujo de CO<sub>2</sub> y en una campana de flujo laminar vertical (Labconco, modelo Purifier Class II Biosafety cabinet; EE. UU.). Los tubos fueron agitados 15 s en un vortex e incubados 72 h a 38 °C. Después los tubos que desarrollaron turbidez fueron seleccionados y depositados en tubos de cultivo con 4.5 mL del medio de cultivo Estreptocel, e incubados 72 h a 38 °C. Este primer proceso de transferencia se repitió con la finalidad de asegurar la selección de BAL.

**Cuadro 6. Composición de la dieta a evaluar (en base seca).**

Ingrediente	Cantidad (%) de alimento
Sorgo	44.8
Maíz	27.3
Pasta de soya	13.9
Ensilado de maíz	5.7
Rastrojo de maíz	6.1
Mezcla mineral	2.2
EM (Mcal kg <sup>-1</sup> ) *	2.9
PC (%) *	12.0

\* NRC, Nutrient Requirements of Sheep, Sixth Revised Edition, 1985.

**Cuadro 7. Fórmula del medio de cultivo selectivo para BAL (caldo Estreptocel, Dioxon, EE. UU.).**

Ingrediente	Cantidad (g) por cada 1000 mL de medio
Peptona de caseína	15
Peptona de soya	5.0
Cloruro de sodio	4.0
Citrato de sodio	1.0
L-Cistina	0.2
Sulfito de sodio	0.2
Dextrosa	5.0
Azida de sodio	0.2
Cristal violeta	0.0002
pH final	7.4 ± 0.1

**5.2.3. Aislamiento del cultivo en medio sólido**

En la segunda fase del proceso de aislamiento un medio de cultivo selectivo sólido (agar Estreptocel, Merck; EE. UU.) (Cuadro 8) fue preparado a razón de 43 g L<sup>-1</sup> de agua destilada y esterilizado en autoclave a 121 °C por 15 min. El medio de cultivo estéril (5 mL) fue depositado con flujo de CO<sub>2</sub> en tubos de cultivo (18 x 150 mm) los cuales fueron colocados en posición horizontal hasta que solidificó el medio de cultivo e incubados 72 h a 38 °C para comprobar esterilidad.



**Cuadro 8. Fórmula del medio de cultivo sólido (agar Estreptocel; Merck, EE. UU.).**

Ingrediente	Cantidad (g) para 1000 mL de medio
Peptona de caseína	14.4
Peptona de soya	5.0
Cloruro de sodio	4.0
Citrato de sodio	1.0
L-cistina	0.2
Sulfito de sodio	0.2
D (+) glucosa	5.0
Azida de sodio	0.2
Cristal violeta	0.0002
Agar-agar	13.0
pH final	7.4 ± 0.2

Para el aislamiento y purificación de la cepa en medio de cultivo sólido se usaron los tubos de cultivo de la segunda transferencia que mostraron turbidez. Los tubos de cultivo con medio sólido fueron inoculados con 0.1 mL de la segunda transferencia por quintuplicado e incubados a 38 °C por 24 h o hasta el desarrollo de colonias bacterianas. Las colonias fueron observadas en un microscopio de contraste de fases (Olympus modelo BX51; EE. UU.) a una magnificación de 1000X. Las colonias bacterianas que se encontraban solas fueron seleccionadas y sembradas en medio líquido selectivo Estreptocel e incubadas por 24 h. Luego se volvió a sembrar la bacteria aislada en el medio de cultivo sólido, pero se realizaron diluciones ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$ ) usando un medio anaerobio de dilución, preparado según la metodología descrita por Cobos y Yokoyama (1995) (Cuadro 9). El procedimiento se realizó por cuadruplicado para asegurar el crecimiento de colonias puras.

**Cuadro 9. Medio para diluciones de los cultivo de BAL aislados.**

Compuesto	Cantidad (mL) para 100 mL de medio
Agua destilada	52.9
Líquido ruminal clarificado <sup>(1)</sup>	30.0
Solución mineral I <sup>(2)</sup>	5.0
Solución mineral II <sup>(3)</sup>	5.0
Carbonato de sodio, al 8% <sup>(4)</sup>	5.0
Solución sulfido-cisteína <sup>(5)</sup>	2.0
Solución resazurina al 0.1% <sup>(6)</sup>	0.1

**1**, líquido ruminal clarificado previamente filtrado en una gasa triple y centrifugado a 10, 000 rpm, por 15 min a 4 °C, esterilizado 20 min a 15 psi, 121°C; **2**, conteniendo (por 1000 mL) 6 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; **3**, conteniendo (por 1000 mL) 6 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 6 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 12 g NaCl; 2.45 g MgSO<sub>4</sub> y 1.6 g CaCl<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O; **4**, 8 g carbonato de sodio en 100 mL agua destilada; **5**, 2.5 g L-cisteína (disuelta en 15 mL 2N NaOH) + 2.5 g Na<sub>2</sub>S·9H<sub>2</sub>O (en 100 mL H<sub>2</sub>O); **6**, 0.1 mL resazurina en un volumen final de 100 mL, calentado hasta que el indicador pierde su coloración y esterilizado.

#### **5.2.4. Conservación del cultivo axénico**

Para conservar la bacteria ruminal aislada 45 mL de un medio de cultivo Glucosa-fluido ruminal (Cuadro 10) fue depositado en viales (100 mL) con flujo de CO<sub>2</sub> e incubados 72 h a 38 °C para comprobar esterilidad. Una colonia seleccionada fue inóculada en medio de cultivo selectivo caldo Estreptocel (1 mL en 9 mL de medio) e incubados 24 h; luego 5 mL fueron inculados en los viales con el medio G-FR e incubados 24 h a 38 °C. Para confirmar la pureza del cultivo una muestra fue tratada con tinción Gram y observada en un microscopio (Olympus modelo BX51; EE. UU.) a una magnificación de 1000X. Los viales fueron congelados a -10 °C por 72 h y liofilizados por 72 h en una liofilizadora (Labconco, modelo Freezone-6; EE. UU.) a -40 °C y un vacío de 133x10<sup>-3</sup> mBar.

**Cuadro 10. Medio de cultivo líquido (G-FR) para el crecimiento de la bacteria ruminal aislada.**

Compuesto	Cantidad por cada 100 mL de medio
Agua destilada	56.9 mL
Líquido ruminal clarificado <sup>1</sup>	30.0 mL
Solución mineral I <sup>2</sup>	5.0 mL
Solución mineral II <sup>3</sup>	5.0 mL
Carbonato de sodio <sup>4</sup>	0.2 g
Solución sulfido-cisteína <sup>5</sup>	2.0 mL
Solución resazurina al 0.1% <sup>6</sup>	0.1 mL
Tripticasa-peptona	0.2 g
Extracto de levadura	0.1 g
Glucosa	0.5 g

**1**, líquido ruminal clarificado previamente filtrado en una gasa triple y centrifugado a 10, 000 rpm, por 15 min a 4 °C, esterilizado 20 min a 15 psi, 121°C; **2**, conteniendo (por 1000 mL) 6 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; **3**, conteniendo (por 1000 mL) 6 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 6 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 12 g NaCl; 2.45 g MgSO<sub>4</sub> y 1.6 g CaCl<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O; **4**, 8 g carbonato de sodio en 100 mL agua destilada; **5**, 2.5 g L-cisteína (disuelta en 15 mL 2N NaOH) + 2.5 g Na<sub>2</sub>S·9H<sub>2</sub>O (en 100 mL H<sub>2</sub>O); **6**, 0.1 mL resazurina en un volumen final de 100 mL, calentado hasta que el indicador pierde su coloración y esterilizado.

### **5.3. Evaluación y caracterización del liofilizado**

La bacteria ruminal aislada en medios de cultivo Estreptocel (líquido y sólido), selectivos para BAL, fue inoculada en medio de cultivo G-FR e incubada 24 h a 38 °C. El medio de cultivo G-FR (Cuadro 10) fue usado lugar del medio líquido Estreptocel, debido a que permite mayor crecimiento de la bacteria, ya que no contiene Azida de sodio y cristal violeta, el crecimiento bacteriano fue observado en un microscopio de contraste de fases (Olympus modelo BX51; EE. UU.) a 1000X para confirmar morfología, pureza del cultivo y tinción Gram.

### **5.3.1. Tiempo óptimo de hidratación del liofilizado**

En tubos de cultivo (18 x 150 mm) con 9.9 mL de medio de cultivo G-FR estéril fue inoculado con 0.1 g del liofilizado bacteriano e incubado a 38 °C por 4, 12 y 24 h. La concentración de bacterias por mL de medio de cultivo fue calculada usando la técnica de número más probable (NMP; Harrigan y McCance, 1979) con tres repeticiones y diluciones decimales ( $10^{-1}$  hasta  $10^{-12}$ ). Este procedimiento ayudo a determinar el tiempo de hidratación que requiere la bacteria liofilizada para alcanzar una concentración  $10^8$  bacterias  $\text{mL}^{-1}$ .

### **5.3.2. Viabilidad de la bacteria ruminal liofilizada**

La concentración de bacterias viables del liofilizado fue medida por la técnica del NMP (Harrigan y McCance, 1979) en tubos de cultivo (13 x 100 mm) con 4.5 mL del medio de cultivo G-FR. 0.5 g de liofilizado fue inoculado en tubos de cultivo con 4.5 mL de medio G-FR, ésta fue considerada la dilución  $10^{-1}$  y se continuó con diluciones consecutivas hasta  $10^{-12}$  con tres repeticiones. Después de 48 h de incubación a 38 °C, el desarrollo de turbidez en los tubos de cultivo y la concentración de bacterias fue calculada por la técnica de NMP de acuerdo a las tablas para tres repeticiones. Luego, a las 0, 3, 6, 12, 24 y 48 h de incubación fue calculada la concentración de bacterias por conteo directo al microscopio de contraste y una cámara Petroff-Hausser.

### **5.3.3. Curva de crecimiento bacteriano mediante conteo directo y absorbancia**

La curva de crecimiento de la bacteria aislada en el medio G-FR fue determinada usando dos métodos: absorbancia y concentración de bacterias por mL de medio de cultivo. Primero, en tubos (18 x 150 mm) con 9.9 mL de medio de cultivo G-FR estéril fueron inoculados con 0.1 g del liofilizado e

incubados a 38 °C por 24 h para rehidratar y reactivar la cepa bacteriana. Luego, por triplicado, tubos (13 x 100 mm) con 4.9 mL de medio de cultivo G-FR fueron inoculados con el medio de cultivo con 24 h de hidratación e incubados a 38 °C por 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4 y 4.5 h. Transcurrido cada tiempo de incubación fue tomada una muestras de cada tubo de cultivo para: calcular la concentración de bacterias usando la cámara Petroff-Hausser (10 cuadros) con un área de 0.0025 mm<sup>2</sup> y una profundidad de 0.02 mm y microscopio de contraste de fases (Olympus modelo BX51; EE. UU.). La concentración bacteriana fue calculada con la siguiente fórmula: Concentración de bacterias = (promedio) (factor de dilución) (2x10<sup>7</sup>). 2 mL muestra fue depositada en cubetas de cuarzo para medir la absorbancia a 600 nm (DO<sub>600</sub>) en un espectrofotómetro UV-VIS (Perkin Elmer, modelo Lamda-40; EE. UU.), con los datos fue determinada la curva estándar y la ecuación de regresión entre la absorbancia y la concentración de bacterias por mL de medio de cultivo.

#### **5.4. Identificación de la bacteria aislada mediante la secuenciación de gen ARNr 16S.**

La identificación de la bacteria aislada a partir de líquido ruminal de ovinos alimentados con una dieta alta en carbohidratos de fácil fermentación fue realizada con base en el aislamiento, amplificación (PCR) y secuenciación del gen ARNr 16S. Para la identificación fue usado un fragmento 800 nucleótidos, el cual fue comparado con secuencias depositadas en el Gen-Bank NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)., 2007). El mismo fragmento amplificado del gen ARNr 16S fue usado para el análisis filogenético de la bacteria aislada.

##### **5.4.1. Activación de la cepa**

Un tubo (13 x 100 mm) con 4.5 mL de medio de cultivo estéril G- FR fue inoculado con 0.1 g del liofilizado con la cepa aislada e incubado 24 h a 38

°C. De éste cultivo, por quintuplicado, fueron inoculados medios de cultivo líquido (Caldo Estreptocel) y sólidos (agar Estreptocel) e incubados 72 h a 38 °C hasta observar colonias (medios sólidos) y turbidez (medios líquidos). Al cultivo bacteriano desarrollado fue obtenida una muestras para confirmar la pureza del cultivo en un microscopio de contraste de fases (Olympus modelo BX51; EE. UU.).

#### **5.4.2. Extracción y purificación del ADN.**

La extracción y purificación del ADN fue realizado con Wizard Genomic ADN Purification Kit (Promega A1120), de acuerdo a la técnica siguiente: 1) La lisis del paquete celular fue realizado mediante la centrifugación de 1 mL de la cepa aislada a 13,000 rpm por 2 min. El sobrenadante fue eliminado y el pellet suspendido en 480 µL de EDTA (50 mM), 60 µL de lisozima fue adicionada, la mezcla fue incubada a 37 °C 1 h y centrifugada a 13,000 rpm por 2 min; para obtener el precipitado o paquete celular el residuo fue decantado; 2) para la lisis nucleica fue adicionado 600 µL de la solución lisis nucleica (Lyse-*N*-Go) al precipitado o paquete celular e incubado a 80 °C por 5 min, después se enfrió a temperatura ambiente (15 min) y adicionó 3 µL de una solución de ARNasa, la mezcla fue incubada 1 h a 37 °C e enfriada a temperatura ambiente; 3) para la precipitación de proteínas y la obtención del ADN rehidratado fue adicionado 200 µL de la solución para precipitación de proteínas, la mezcla fue agitada por 20 s e incubada a 4 °C por 5 min; la mezcla fue centrifugada a 13,000 rpm por 3 min y el sobrenadante fue transferido a un vial con 600 µL de isopropanol, la mezcla fue centrifugada a 13,000 rpm por 3 min; 4) para obtener el ADN fue eliminado el sobrenadante y adicionado 600 µL de etanol al 70%, la mezcla fue centrifugada a 13,000 rpm por 2 min y aspirado el etanol; 5) el pellet de ADN fue rehidratado en 100 µL de solución de rehidratación y conservado a 4 °C, hasta su uso.

#### **5.4.3. Amplificación del gen ARNr 16S**

Una vez obtenido el ADN el gen ARNr 16S fue amplificado por medio de la PCR, para lo cual se utilizaron los iniciadores 8F: AGAGTTTGATCMTGGCTCAG y 1492R: TACGGYTACCTTGTTACGACTT. La reacción de PCR fue llevada a cabo en un volumen de 25  $\mu\text{L}$ , la mezcla de reacción fue 5  $\mu\text{L}$  de amortiguador 5X, 2  $\mu\text{L}$  dNTP's, 2  $\mu\text{L}$   $\text{MgCl}_2$  al 50 mM, 0.4  $\mu\text{L}$  Taq ADN Polimerasa in Storage Buffer B (Promega® M1661, EE. UU.). Las condiciones usadas en el ciclo térmico fueron (Termociclador, Biometra, EE. UU.): un ciclo inicial de predesnaturalización, 5 min a 94 °C; desnaturalización, 30 s a 94 °C; acoplamiento 20 s a 52 °C; elongación, 90 s a 72 °C; repitiendo 34 ciclos y un ciclo de post-elongación 7 min a 72 °C. Los fragmentos amplificados fueron observados mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1% (Sambrook *et al.*, 1989). Los productos purificados fueron observados mediante la tinción del gel de agarosa al 1% teñido con 1.66  $\mu\text{L}$  de bromuro de etidio 100  $\text{mL}^{-1}$  y amortiguador TBE al 0.5% a 75 V por 30 min.

#### **5.4.4. Análisis filogenético e identificación de la cepa**

Para la identificación de la cepa ruminal aislada fue mediante la secuenciación del gen ARNr 16S. Los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis comparativo con secuencias obtenidas de la base de datos del Gen Bank utilizando el programa Blast (Altschul *et al.*, 1997).

La alineación del gen ARNr 16S (800 n) de la cepa aislada fue comparado con secuencias de miembros representativos de los géneros *Pediococcus*, *Lactobacillus*, *Aerococcus* y *Tetragenococcus*. El análisis filogenético fue realizado con Neighbor-Joining y Kimura 2, (Saitou e Imanishi, 1989) con el programa Phylo\_win (Galtier *et al.*, 1996), la estabilidad del agrupamiento fue

determinada con un análisis de bootstrap de 1000 replicas (Efron y Gong, 1983; Felsenstein, 1985).

## **5.5. Evaluación de dos ionóforos en la actividad fermentativa de *Pediococcus acidilactici***

### **5.5.1. Preparación del inóculo bacteriano**

La cepa bacteriana aislada conservada por liofilización fue usada y reactivada como se describió en la sección 5.3.1. La reactivación bacteriana continuó hasta obtener una concentración de  $10^8$  bacterias por mL de medio de cultivo, para lo cual la concentración de bacterias fue monitoreada por conteo en la cámara de Petroff-Hausser (EE. UU.) y de acuerdo con la ecuación de curva estándar, al medir absorbancia a  $DO_{600}$ .

### **5.5.2. Tratamientos evaluados**

Una muestra (35 mL) de medio de cultivo dieta-FR (D-FR) estéril con 0.2 g de una dieta alta en carbohidratos de fácil fermentación (Cuadro 6) como única fuente de carbohidratos en lugar de glucosa (Cuadro 10) fue colocada en tubos de 25 x 180 mm. Los inóculos fueron: la bacteria ruminal aislada *P. acidilactici* (PA); bacterias ruminales presentes en líquido ruminal fresco (LRF). La incubación fue realizada con un mL de PA y LRF por triplicado a 38 °C por 24, 48 y 72 h, terminado el tiempo de incubación las variables pH, DIVMS, la concentración de acético, propiónico, butírico, AGV totales, nitrógeno amoniacal y ácido láctico fueron evaluadas.

Los tratamientos fueron: T1, *P. acidilactici* (PA); T2, líquido ruminal fresco (LRF); T3, PA + 30 mg  $kg^{-1}$  MS de monensina sódica; T4, LRF + 30 mg  $kg^{-1}$  MS de monensina sódica; T5, PA + 40 mg  $kg^{-1}$  MS de lasalocida sódica; T6, LRF + 40 mg  $kg^{-1}$  MS de lasalocida sódica. Las dosis de ionóforos usadas



fueron, las recomendadas por el fabricante, de 30 y 40 g ton<sup>-1</sup> Rumensin (monensina al 20%) y Bovatec (lasalocida al 15%). Los ionóforos fueron disueltos en 100 mL de una solución al 25 % de etanol antes de incorporarlos al medio de cultivo de los tratamientos.

### **5.5.3. Concentración bacteriana inicial del inóculo**

La concentración propuesta fue 10<sup>8</sup> células bacterianas mL<sup>-1</sup> de medio de cultivo para PA y LRF. En el inóculo de PA el procedimiento fue el descrito en la sección 5.3 y después de 24 h de hidratación se logró una concentración de 10<sup>8</sup> bacterias por mL de medio. En el inóculo LRF se extrajo 250 mL de líquido ruminal de una vaca con cánula ruminal, la concentración de bacterias por mL fue determinada mediante conteo en la cámara Petroff-Hausser (EE. UU.), según la metodología descrita anteriormente y las diluciones fueron hechas en medio anaerobio (Cuadro 9) hasta reducir la concentración de bacterias a 10<sup>8</sup> mL<sup>-1</sup> de fluido ruminal.

### **5.5.4. Variables evaluadas**

#### **5.5.4.1. Degradación *in vitro* de materia seca (DIVMS)**

A tubos de cultivo de 18 x 150 mm (por triplicado) con 0.2 a 0.3 g de la dieta para ovinos usada para producir acidosis (Cuadro 6) se adicionó 9 mL del medio de cultivo (Cuadro 9) para formar el medio de cultivo D-FR con flujo de CO<sub>2</sub> (Cobos y Yokoyama, 1995). La DIVMS con y sin ionóforos fue medida a las 24, 48 y 72 h de incubación a 39 °C, después de inocular con 1 mL del inóculo PA y LRF con flujo de CO<sub>2</sub> de acuerdo a los tratamientos, un tratamiento blanco (medio sin sustrato) fue incluido para restar el material adicionado al momento de la inoculación (masa bacteriana y partículas de alimento procedente del inóculo). Al concluir los tiempos de incubación (24, 48 y 72 h) se filtró el material residual en papel filtro Whatman No. 541 (ya

pesado), con una bomba de vacío, se seco en una estufa a 70 °C por 24 h, el residuo fue pesado en una balanza analítica (Ohaus, modelo Explorer, EE. UU.) y el porcentaje de sustrato no degradado calculado con el programa Microsoft Excel, usando la siguiente fórmula:

$$\text{DIVMS (\%)} = \frac{\text{Peso inicial} - \text{Peso final} \times 100}{\text{Peso inicial}}$$

#### **5.5.4.2. Concentración de ácidos grasos volátiles (AGV)**

Una muestra de 2 mL del medio de cultivo fue tomada a las 24, 48 y 72 h de incubación (por triplicada) y centrifugada a 10,000 rpm por 10 min; 1.5 mL del sobrenadante fueron colocados en viales de plástico a los cuales adicionando 0.375 mL de ácido metafosfórico al 25% (proporción 4:1). Los viales fueron agitados en un vortex (Genie 2, modelo G-560; EE. UU.) para homogenizar la muestra y almacenados a -10 °C hasta su análisis. Luego, las muestras fueron descongeladas a 25 °C y centrifugadas a 14,000 rpm por 20 min; 2 mL de la muestra fueron depositadas en viales para cromatografía. La determinación de AGV fue realizada en un equipo de cromatografía de gases (Perkin-Elmer, modelo Claurus 500; EE. UU.) con automuestreador. Las constantes del cromatógrafo fueron: una columna capilar empacada ELITE-FFAP, Perkin-Elmer (15 m), un detector de ionización de flama (FID), gas N<sub>2</sub> acarreador a 60 psi y H<sub>2</sub> y O<sub>2</sub> para generar la flama con un flujo de 45 y 450 mL min<sup>-1</sup>. Las temperaturas del inyector, columna y horno fueron 250, 200 y 140 °C y se inyectó 1µL de muestra. Con dichas condiciones se obtuvieron tres picos, con un tiempo de retención de 2.07, 2.55 y 3.75 min para acético, propiónico y butírico, con un tiempo total de cada corrida de 8.37 min.

#### **5.5.4.3. Concentración de nitrógeno amoniacal (NH<sub>4</sub>)**

Una muestra de 2 mL fue centrifugada a 3,000 rpm por 10 min, del sobrenadante se recolectó 1.5 mL y se adicionó 0.375 mL de ácido metafosfórico (proporción 4:1); fue mantenida en refrigeración y luego centrifugada a 3,500 rpm por 25 min, el sobrenadante fue recuperado en viales de 2 mL y almacenado en congelación a -10 °C hasta su valoración (McCullough, 1967). De la muestra se tomaron 20 µL y fueron depositados en un tubo de ensayo de 10 mL, adicionando 1 mL de fenol y 1 mL de hipoclorito de sodio. Las muestras fueron puestas en baño maría a 37 °C por 30 min se adicionaron 5 mL de agua destilada para diluir las muestras, agitadas en un vortex (Genie 2, modelo G-560; EE. UU.) y la fue hecha lectura en un espectrofotómetro UV-VIS (Perkin Elmer, modelo Lamda-40; EE. UU.) a una DO<sub>630</sub>.

#### **5.5.4.4. Concentración de ácido láctico**

Al concluir el tiempo de incubación (24, 48 y 72 h de la DIVMS) en tubos de cultivo fueron depositados 2 mL de muestra y centrifugada a 10,000 rpm por 10 min, 1 mL de sobrenadante fue recuperado y mezclado con 1 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en viales de 2 mL y almacenado a -10 °C hasta su valoración. De la muestra conservada se diluyó 1 mL en 20 mL de agua bidestilada desionizada, de ésta mezcla diluida se tomaron 0.5 mL y se mezclaron con 3 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en tubos (8 mL) e incubaron por 10 min en agua hirviendo. La muestras fueron enfriadas con agua a 25 °C y se adicionaron 50 µL de CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O y 100 µL de p-fenilfenol mezclando con un vortex (Genie 2, modelo G-560; EE. UU.). Las muestras reposaron por 30 min antes de medir la absorbancia a 570 nm en un espectrofotómetro UV-VIS (Perkin Elmer™ modelo Lamda-40; EE. UU.).

#### **5.5.4.5. Variables microbiológicas.**

Al concluir las incubaciones a 24, 48 y 72 h de la DIVMS el medio de cultivo fue usado como fuente de inóculo para calcular la concentración de bacterias totales, celulolíticas y lácticas. A continuación se describen las metodologías usadas

##### **5.5.4.5.1. Concentración de bacterias totales (BT)**

Medio cultivo a base de glucosa, celobiosa, almidón y fluido ruminal (GCA-FR; Cuadro 11) fue usado (Cobos y Yokoyama, 1995) conjuntamente con la técnica de cultivo de Hungate (1969). La concentración de bacterias por mL de medio de cultivo fue calculada por la técnica NMP (NMP; Harrigan y McCance, 1979) con diluciones decimales ( $10^{-1}$  hasta  $10^{-13}$ ) y tres repeticiones por dilución. Todas las diluciones fueron incubadas 24 h a 38°C, los tubos con crecimiento positivo fueron aquellos medios de cultivo turbios. Para calcular el rango de confiabilidad del 95% fue utilizada la siguiente formula:

$$\text{Concentración de bacterias} = (\text{NMP}/4.68 \text{ a } \text{NMP} \times 4.68)$$

##### **5.5.4.5.2. Concentración de bacterias celulolíticas (BC)**

Medio de cultivo anaerobio que contenía una tira de papel celulosa como única fuente de carbohidratos fueron usados para calcular la concentración de bacterias celulolíticas (Cuadro 11). La concentración de bacterias por mL de medio de cultivo fue determinada por la técnica de NMP con diluciones de  $10^{-1}$  hasta  $10^{-10}$  y tres repeticiones por dilución. Todas las diluciones se incubaron a 38°C, los tubos con crecimiento positivo fueron aquellos donde la degradación del papel de celulosa fue observada, la concentración de

bacterias fue calculada mediante la técnica de NMP y utilizando la fórmula anteriormente descrita para determinar la confiabilidad.

**Cuadro 11. Composición del medio de cultivo base (GCA-FR) para crecimiento y supervivencia de bacterias totales y celulolíticas.**

Compuesto	Cantidad para 100 mL de medio de cultivo	
	Medio para BT	Medio para BC
Agua destilada	47.42 mL	52.60 mL
Líquido ruminal clarificado <sup>(1)</sup>	30.0 mL	30.0 mL
Solución mineral I <sup>(2)</sup>	5.0 mL	5.0 mL
Solución mineral II <sup>(3)</sup>	5.0 mL	5.0 mL
Carbonato de sodio, solución 8% <sup>(4)</sup>	5.0 mL	5.0 mL
Acetato de sodio, 1.5 % <sup>(5)</sup>	5.0 mL	5.0 mL
Solución sulfido-cisteína <sup>(6)</sup>	2.0 mL	2.0 mL
Solución resazurina al 0.1% <sup>(7)</sup>	0.1 mL	0.1 mL
Tripticasa-peptona	0.20 g	0.20 g
Extracto de levadura	0.10 g	0.10 g
Glucosa	0.06 g	
Celobiosa	0.06 g	
Almidón	0.06 g	
Papel celulosa		Una tira

**BT**, bacterias totales; **BC**, bacterias celulolíticas; **(1)**, líquido ruminal clarificado previamente filtrado en una gasa triple y centrifugado a 10, 000 rpm, por 15 min a 4 °C, esterilizado 20 min a 15 psi, 121°C; **(2)**, conteniendo (por 1000 mL) 6 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; **(3)**, conteniendo (por 1000 mL) 6 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 6 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 12 g NaCl; 2.45 g MgSO<sub>4</sub> y 1.6 g CaCl<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O; **(4)**, 8 g carbonato de sodio en 100 mL de agua destilada; **(5)**, 1.5 g acetato de sodio en 100 mL de agua destilada; **(6)**, 2.5 g L-cisteína (disuelta en 15 mL de 2N NaOH) + 2.5 g Na<sub>2</sub>S·9H<sub>2</sub>O (en 100 mL de H<sub>2</sub>O); **(7)**, 0.1 mL de resazurina en un volumen final de 100 mL, calentado hasta que el indicador pierde su coloración y esterilizado.

#### 5.5.4.5.3. Bacterias productoras de ácido láctico (BAL)

Para calcular la concentración de BAL fue usado el medio de cultivo MRS (Cuadro 12), el cual fue preparado de acuerdo a las recomendación del

fabricante: 56 g del medio MRS en un matraz de bola aforado a 1000 mL con agua destilada, se disolvió y midió el pH ( $6.68 \pm 0.02$ ) del medio de cultivo con un potenciómetro (Orión, modelo 710A, México). El medio MRS fue esterilizado por 15 min a 121 °C y 15 psi y 4.5 mL fue depositado en tubos (13 x100 mm) para ser, después de determinar esterilidad, inoculados con las muestras obtenidas de las incubaciones a 24, 48 y 72 h de la prueba DIVMS con dilución de  $10^{-1}$  hasta  $10^{-13}$  (por triplicado). Inoculados lo tubos fueron incubados 24 h a 38 °C, los tubos de cultivo positivos fueron aquello con turbidez, para determinar la concentración de BAL fue utilizado el mismo sistema del NMP, utilizado en bacterias totales y celulolíticas.

**Cuadro 12. Medio de cultivo MRS (Merk; EE. UU.) para el cultivo de BAL.**

Ingrediente	Cantidad (g) para 1000 mL de medio de cultivo
Proteasa peptona	10.0
Extracto de carne	8.0
Extracto de levadura	4.0
Glucosa	20.0
Monoleato de sorbitán	1.0 mL
Fosfato de potásico	2.0
Acetato de sodio	5.0
Citrato de amonio	2.0
Sulfato de magnesio	0.2
Sulfato de manganeso	0.05
pH final	$6.4 \pm 0.02$

**5.6. Diseño y análisis estadístico**

El diseño experimental fue completamente al azar, las unidades experimentales se distribuyeron en forma aleatoria en seis tratamientos

individuales con tres repeticiones. El modelo estadístico fue el siguiente (Steel y Torrie, 1988):

$$Y_{ij} = \mu + T_i + \epsilon_{ij}$$

Donde,  $Y_{ij}$  es la variable respuesta del  $i$ -ésimo tratamiento en la  $j$ -ésima repetición,  $\mu$  es la media general,  $T_i$  es el efecto en el  $i$ -ésimo tratamiento y  $\epsilon_{ij}$  es el error experimental.

El análisis de varianza fue realizado con el procedimiento GLM y las medias fueron analizadas con la prueba de Tukey (SAS, 1998). El procedimiento de mediciones repetidas de Wilcoxon o pruebas de suma de rangos (SAS, 1998) fue usado para determinar diferencias estadísticas en las concentraciones de bacterias totales, ácido lácticas y celulolíticas.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1. Cultivo bacteriano aislado

Como resultado del proceso de aislamiento en medios de cultivo selectivos (Cuadro 6 y 7), se obtuvo una bacteria ruminal identificada como *Pediococcus acidilactici*. De acuerdo con las observaciones de la bacteria en el microscopio de contraste de fases, es esférica con alrededor de 2  $\mu\text{m}$  de diámetro, no forma esporas, no tiene motilidad, normalmente crece en forma individual y en pares, y en menor frecuencia como cadenas de 4 a 6 células. La bacteria aislada es Gram positiva, catalasa negativa y no produce gas en medio de cultivo G-FR. Estas características coinciden con los reportes de Garvie (1986) y Lui *et al.* (2006), quienes mencionan que *P. acidilactici* produce, a partir de la glucosa, (-)-D-lactato y (+)-L-lactato en la misma proporción y bajas concentraciones de ácido acético, propiónico y butírico, y ácidos grasos de cadena ramificada como valérico e isovalérico.

### 6.2. Tiempo óptimo de rehidratación del liofilizado

El cultivo puro de la bacteria ruminal aislada fue conservado mediante liofilizado; sin embargo, se desconocía el tiempo de hidratación requerido para estimular la actividad bacteriana y la concentración de bacterias obtenidas del liofilizado. El mejor crecimiento ( $p \leq 0.01$ ) de la bacteria liofilizada fue después de 24 h de hidratación a 38 °C (Cuadro 13) con una concentración de  $4.5 \times 10^{11}$  bacterias  $\text{mL}^{-1}$  de medio de cultivo. Esta concentración fue superior a la requerida en esta investigación para realizar las pruebas metabólicas. De acuerdo con la ecuación de NMP de Harrigan y McCance (1979), el mínimo y máximo número de células viables  $\text{g}^{-1}$  de liofilizado es  $6.0 \times 10^{11}$  y  $1.3 \times 10^{13}$ , respectivamente.



**Cuadro 13. Concentración de *Pediococcus acidilactici* en el liofilizado (técnica de NMP).**

<b>Tiempo (h)</b>	<b>Concentración mL<sup>-1</sup> de medio de cultivo</b>
4	1.4x 10 <sup>4</sup> b
12	1.5x 10 <sup>5</sup> b
24	4.5x 10 <sup>11</sup> a

**a y b**, medias con diferente letra en la columna son diferentes ( $p \leq 0.01$ ); **E. E. M.**, 1.3 X 10<sup>10</sup>.

Borrego *et al.* (2001) reportan que hay diferentes factores que reducen la concentración y la viabilidad de los microorganismos liofilizados, incluyen la naturaleza de la cepa, las condiciones del cultivo, la fase de crecimiento, la concentración, los ingredientes que protegen contra la liofilización, las variables de liofilización, y el modo de rehidratación del microorganismo. Además, reportan que ingredientes como la leche descremada con o sin glutamato de sodio permiten una sobrevivencia de 14 a 55.2% de las células después de 10 años de almacenamiento. En el liofilización de la bacteria aislada no se usaron ingredientes que funcionaran como protector contra la liofilización; sin embargo, considerando la concentración obtenida de bacterias del liofilizado probablemente algunos ingredientes del medio de cultivo (p. ej. proteínas y lípidos) funcionan como protectores naturales contra la liofilización. Hay procesos de conservación de microorganismos: la congelación a -20 o -40 °C con la adición de 10 o 20% de glicerol (Teather, 1982), el uso de nitrógeno líquido a -196 °C (Arcos *et al.*, 2004). Estos métodos de conservación y la liofilización tienen la ventaja de mantener altos índices de sobrevivencia, sin mutaciones genéticas.

El periodo de hidratación del liofilizado fue indispensable para determina la concentración de bacterias viables que se pueden obtener del liofilizado. En los periodos de incubación de 4 a 12 h la concentración fue 1.4 x10<sup>4</sup> y 1.5

$\times 10^5$  bacterias  $\text{mL}^{-1}$ , mientras que con 24 h de hidratación aumentó ( $p \leq 0.05$ ) la concentración bacteriana a  $4.5 \times 10^{10}$   $\text{mL}^{-1}$  de medio de hidratación.

### **6.3. Curva de crecimiento bacteriano**

La curva de crecimiento bacteriano permite determinar la actividad bacteriana en respuesta a la inclusión de un sustrato (carbohidratos, proteínas, minerales, etc.) en el medio de cultivo. El comportamiento de la bacteria aislada fue evaluado en un medio de cultivo anaerobio con 0.5% de glucosa (G-FR). En el Cuadro 14 y la Figura 1 se muestran los resultados obtenidos. El Cuadro 14 contiene los resultados de absorbancia y la concentración de bacterias por mL de medio de cultivo obtenidas cada 30 min entre las 0 y 4 h de incubación, así como la ecuación de regresión calculada con estos datos. La curva de crecimiento bacteriano mostró las cuatro fases: lag, exponencial, estacionaria y muerte (Madigan *et al.*, 2003). La fase de crecimiento lag fue aproximadamente 30 min, la de crecimiento exponencial duró 90 min, al igual que la de crecimiento estacionario, y a las 3.5 h inició la de muerte bacteriana.

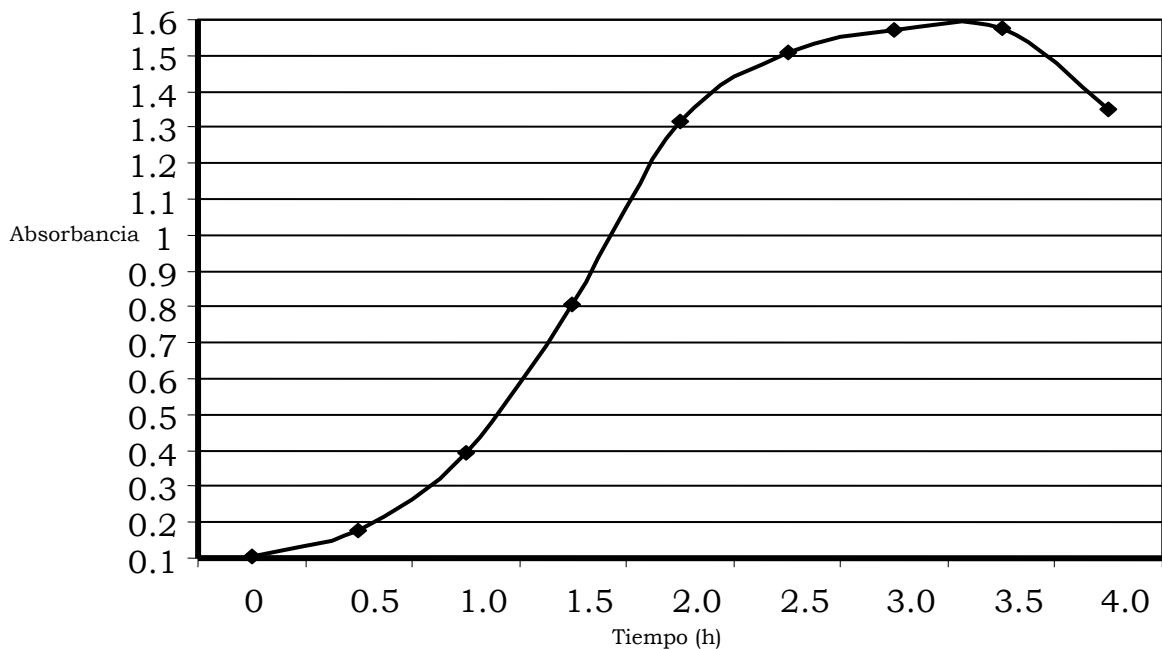
De acuerdo con Fitzsimons *et al.* (1992) *P. acidilactici* crece adecuadamente entre 25 y 45 °C y un pH de 4.5 a 8 y en esas condiciones se obtiene crecimiento exponencial de 1.5 a 2.4  $\text{h}^{-1}$  después de inocular *P. acidilactici* en medio G-FR y de 1.3 a 1.9  $\text{h}^{-1}$  en medios con fructosa.

En el presente estudio la temperatura de incubación fue 38 °C y un pH del medio de cultivo de 6.8, valores dentro de los intervalos de temperatura y pH que Fitzsimons *et al.* (1992) consideran óptimas para el crecimiento de *P. acidilactici*. Con estas condiciones experimentales la fase de crecimiento exponencial fue 1.0 a 2.0 h después de inocular *P. acidilactici*, que indica una actividad bacteriana superior a la determinada por Fitzsimons *et al.* (1992).

**Cuadro 14. Concentración de *Pediococcus acidilactici* determinada por conteo en la cámara Petroff-Hausser y un espectrofotómetro UV-VIS.**

<b>Tiempo (h)</b>	<b>Concentración mL<sup>-1</sup></b>	<b>Absorbancia</b>
0	3.4 x10 <sup>8</sup>	0.1053
0.5	4.4 x10 <sup>8</sup>	0.1757
1	1.2 x10 <sup>9</sup>	0.3924
1.5	2.8 x10 <sup>9</sup>	0.8061
2	1.1 x10 <sup>10</sup>	1.3160
2.5	1.4 x10 <sup>10</sup>	1.5106
3	1.6 x10 <sup>10</sup>	1.5726
3.5	2.0 x10 <sup>10</sup>	1.5741
4	1.4 x10 <sup>10</sup>	1.3514
Ecuación	Y = -2.7 x 10 <sup>9</sup> + 1.1 x 10 <sup>10</sup> (X)	
Regresion (R <sup>2</sup> )	0.98	

La curva de crecimiento microbiano fue obtenida midiendo la absorbancia a 600 nm (DO<sub>600</sub>) cada 30 min por 4 h. Como se observa en el Cuadro 14 existe una regresión ( $r^2 = 0.98$ ) entre la concentración por mL y absorbancia. Por tanto, la ecuación,  $Y = -2.7 \times 10^9 + 1.1 \times 10^{10}(X)$ , donde Y es la concentración bacteriana por mL de medio de cultivo y X es la absorbancia (DO<sub>600</sub>) resultante del crecimiento de *P. acidilactici* en el medio de cultivo G-FR, permite calcular la concentración bacteriana por mL de medio usando las lecturas de absorbancia.



**Figura 1. Curva de crecimiento de *Pediococcus acidilactici***

La tasa de generación, también conocida como el tiempo requerido por una bacteria para que duplique su población, es calculada con la fórmula siguiente (Madigan *et al.*, 2003):  $N = N_0 2^n$  (1)

donde  $N$  = número final de células,  $N_0$  = número inicial de células y  $n$  = número de generaciones transcurridas durante el periodo de crecimiento exponencial. Por tanto, el tiempo de generación ( $g$ ) de la población bacteriana es calculada como  $t/n$ , donde  $t$  = tiempo y es determina con los datos de la fase de crecimiento exponencial;  $n$  es calculada mediante una transformación logarítmica de la ecuación 1:  $n = 3.3 (\log N - \log N_0)$ .

Para *P. acidilactici* la tasa de generación fue 19 min, valor dentro del intervalo 15 a 30 min reportado por Garvie (1986) para bacterias *Pediococcus*

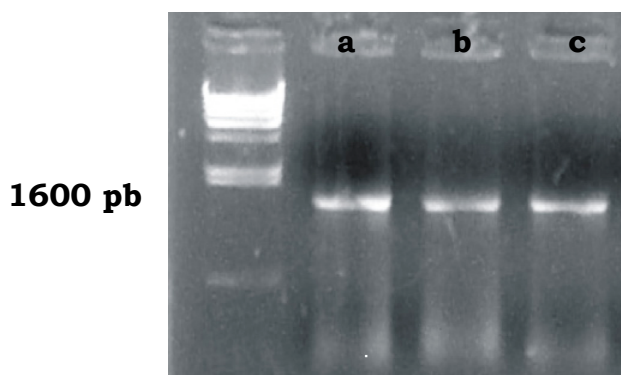
sp. La tasa de generación indica un crecimiento acelerado, pero normal para muchos grupos de bacterianos del rumen como *S. bovis* (Hardie, 1986).

#### 6.4. Amplificación del gen ARNr 16S y análisis filogenético de la cepa aislada

**Cuadro 15. Porcentaje de semejanza de la bacteria ruminal aislada con el género *Pediococcus*.**

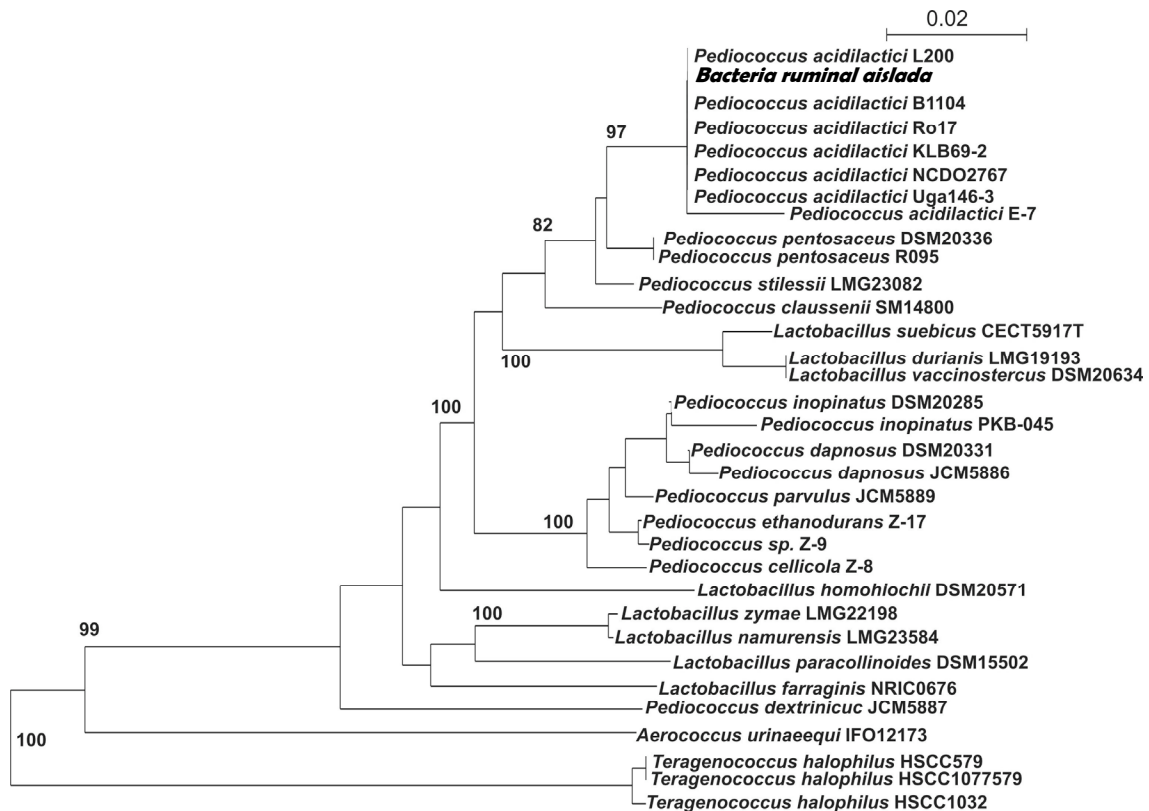
<b>Especie de comparación</b>	<b>Porcentaje de semejanza</b>
<i>Pediococcus acidilactici</i>	99
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	97
<i>Pediococcus sp.</i>	96
<i>Pediococcus stilesii</i>	96

En la Figura 2 se muestran las bandas resultantes de la amplificación y secuenciación de un fragmento (800 nucleótidos) del gen ARNr 16S de la bacteria ruminal aislada. Este fragmento permitió identificar la bacteria aislada como *P. acidilactici* con un 99% de semejanza; y en menor porcentaje de semejanza con *P. pentosaceus*, 97%, y con *P. stilesii*, 96% (Cuadro 15).



**Figura 2. Productos de la amplificación del gen ARNr 16S de la bacteria ruminal aislada (a, b y c).**

El árbol filogenético muestra el parentesco entre *P. acidilactici* con otras especies de *Pediococcus*. El análisis de bootstrap (Felsenstein, 1985) con 1000 repeticiones permite confirmar que la cepa aislada y los géneros de comparación son bacterias genéticamente diferentes, y que la cepa aislada pertenece al grupo de cepas de *P. acidilactici* reportadas en el Gen Bank con un soporte de 97%. Su parentesco con el grupo de cepas donde están *P. pentosaceus*, *P. stilessii* y *P. claussenii* es menor con un soporte de 87%. Por tanto, las cepas de comparación son diferentes, pero comparten en algún punto de su evolución un ancestro común.



**Figura 3. Arbol filogenético para la cepa de *Pediococcus acidilactici*.**

Basados en estándares de características morfológicas y fisiológicas se ha reportado en el rumen un amplio ecosistema de microorganismos con una compleja población de bacterias. Este grupo de microorganismos ha sido

reevaluado sobre todo revalidando los métodos de identificación y clasificación de bacterias (Krause y Russell, 1996). Dentro de los métodos, la amplificación y comparación de la secuencia del gen ARNr 16S permite establecer más puntualmente las relaciones filogenéticas (parentesco evolutivo) entre los microorganismos, lo cual tiene importancia en la clasificación taxonómica de los microorganismos, así como en la identificación rápida y precisa (Eisen *et al.*, 1992). Las tendencias para la identificación y caracterización están dirigidas hacia la comparación de genomas completos y no sólo de un gen. Aunque la secuenciación del gen ARNr 16S es considerado como una herramienta estándar para la identificación de bacterias, los resultados del presente estudio sugieren que el fragmento de 800 n del gen ARNr 16S, de acuerdo con Janda y Abbott (2007), podría no haber sido lo suficientemente discriminante para asegurar que la bacteria ruminal aislada es *P. acidilactici*. Aunque el sistema usado para formar el árbol filogenético permite asegurar que la bacteria aislada corresponde a la especie *P. acidilactici*. Por tanto, se recomienda para una completa identificación, amplificar el genoma total y hacer un análisis que incluya la secuenciación de otros genes específicos (por ej. la enzima lactato deshidrogenasa) (Garmyn *et al.*, 1995) para identificar la cepas aislada, a nivel de especie.

El árbol filogenético obtenido en esta investigación no incluye a *S. bovis*, por tanto, elimina cualquier posibilidad que la bacteria aislada pertenezca a la especie *S. bovis*. Este resultado, es relevante ya que *S. bovis* es considerada como la principal bacteria ruminal causante de la acidosis (Goad *et al.*, 1998).

La cepa ruminal aislada e identificada como *P. acidilactici* no ha sido reportada como una especie aislada del rumen, siendo la primera vez que se reporta. Dobson *et al.* (2002) han identificado con estudios de filogenia la presencia de esta bacteria en destilados de cervecería, además compararon

la secuencia del gen ARNr 16S de *P. acidilactici* con la secuencia del género *Lactobacillus*. En esta investigación fue comparada la secuencia de gen ARNr 16S de la cepa aislada y de los géneros *Lactobacillus*, *Aerococcus* y *Tetragenococcus*.

Cepas de *P. acidilactici* han sido identificadas con el uso de técnicas moleculares y purificación completa del gen ARNr 16S (González y Kunka, 1987; Osmanagaglu *et al.*, 1998; Leisner *et al.*, 1999; Barney *et al.*, 2001). Del ADN de la cepa ruminal aislada fue amplificado y secuenciado un segmento de 800 n del gen ARNr 16S, que resulto suficiente para encontrar 99% de similitud entre la cepa ruminal y diferentes cepas de *P. acidilactici*. Sin embargo, para confirmar que una cepa de *P. acidilactici* pertenece a nivel de especie Leisner *et al.* (1999) y Lui *et al.* (2006) reportaron una similitud de 99.9% en la secuenciación del gen ARNr 16S.

*P. acidilactici* fue aislada *in vitro* bajo condiciones anaerobias estrictas, similares a las del rumen reportada por Hungate (1969) y por Garmyn *et al.* (1995) para el aislamiento de cepas de *P. acidilactici*, aunque de acuerdo con Dobson *et al.* (2002) esta bacteria ha sido aislada en alimentos (carne conservadas y productos lácteos), en plantas y en residuos de cervecería en condiciones de anaerobiosis.

El aislamiento y secuenciación del gen ARNr 16S confirma la existencia de otras especies bacterianas (*P. acidilactici*) no reportadas en el rumen con acidosis; lo más cerca a estas condiciones, donde *P. acidilactici* fue reportada es un consorcio de BAL presentes en fermentadores anaerobios de productos lácteos (leches fermentadas, yogurt y quesos), en ensilados, en el tubo gastrointestinal de pollos, patos y otros animales (Simpson *et al.*, 2002). Los mismos autores reportan que BAL de los géneros *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella* y *Lactococcus* tienen alta similitud en la secuencia del



gen ARNr 16S, por tanto, las BAL son consideradas filogenéticamente coherente y diferente de otro grupo de bacterias.

La presencia de *Pediococcus* spp. en el rumen ser considerado normal, debido a que el rumen es un ecosistema abierto con microorganismos aun no identificados según Kopečný *et al.* (2003) o equivocadamente identificadas (Krause y Russell, 1996). Aunque las bacterias pueden crecer en diferentes medios de cultivo, hay medios de cultivo específicos para el crecimiento de BAL (p. ej. Estreptocel y MRS) como lo indica Klare *et al.* (2005), medios de cultivo con glucosa-fluido ruminal (G-FR) y con alimentos concentrados-en energía-fluido ruminal (D-FR) usados en esta investigación. El aislamiento de *P. acidilactici* del rumen en medios selectivo para BAL, indica que hay similitud fenotípica (morfológica y metabólica) entre *P. acidilactici* y *S. bovis* (Garvie, 1986; Hardie, 1986) pero sin parentesco genotípico. Aunque *S. bovis* es considerada la principal bacteria ruminal causante de acidosis ruminal (Owens *et al.*, 1998), sin embargo, la similitud fenotípica de *S. bovis* con otras BAL podría estar encubriendo la importancia de otras cepas de BAL (*P. acidilactici*), afortunadamente las técnicas moleculares permiten solucionar los problema de identificación.

## **6.5. Caracterización metabólica de *Pediococcus acidilactici***

### **6.5.1. Degradación *in vitro* de la materia seca**

Esta prueba fue realizada para evaluar la capacidad de *P. acidilactici* en comparación con un consorcio de bacterias ruminales para degradar una dieta con alto contenido de carbohidratos de fácil fermentación (Cuadro 6) con y sin ionóforos (monensina y lasalocida). Para la comparación se considero una concentración de  $10^8$  bacterias mL<sup>-1</sup> de inóculo PA y LRF.

**Cuadro 16. Degradación *in vitro* de la materia seca (DIVMS; %) y pH del medio de cultivo de una dieta alta en concentrado (86%) con y sin la adición de ionóforos.**

	Tratamientos						E.E.M
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	
Horas	Degradación <i>in vitro</i> (MS), %						
24	38.76cd	41.10bc	32.86cd	56.30a	27.83d	52.30ab	4.42
48	48.70bc	52.60ab	37.26bc	55.76a	33.90c	62.40a	5.75
72	51.73bc	62.66ab	38.93c	70.63a	39.66c	74.70a	6.70
	pH						
24	4.96bc	4.65c	5.73a	5.27b	5.69a	5.20b	0.12
48	4.53e	4.63de	5.63a	4.96cd	5.31ab	5.04bc	0.12
72	4.70bc	4.54c	5.46a	4.65bc	5.30ab	4.46c	0.26

**T1**, *P. acidilactici* (PA); **T2**, líquido ruminal fresco (LRF); **T3**, PA + 30 mg Kg<sup>-1</sup> MS de monensina sódica; **T4**, LRF + 30 mg kg<sup>-1</sup> MS de monensina sódica; **T5**, PA + 40 mg kg<sup>-1</sup> MS de lasalocida sódica; **T6**, LRF + 40 mg kg<sup>-1</sup> MS de lasalocida sódica; **a, b, c, d y e**, Medias con diferente letra en una hilera son diferentes (p≤0.01); **E.E.M**, Error estándar de la media.

Los resultados de DIVMS (Cuadro 16) indica a las 24 h los tratamientos T4 (LRF + monensina) y T6 (LRF + lasalocida) presentaron la mayor (p≤0.01) degradación de MS con 56.30 y 52.30%, respectivamente. A las 48 h de incubación los tratamientos T2, T4 y T6 presentaron la mayor (p≤0.01) degradación de MS, a las 72 h de incubación se mantuvo la mayor DIVMS en los tratamientos T2, T4 y T6. El menor porcentaje de degradación a las 72 h de incubación se obtuvo en el T3 (PA + monensina) con 38.93% y en el T5 (PA + lasalocida) con 39.66% sin diferencia significativa (p>0.05) con el tratamiento T1. Sin embargo biológicamente la diferencia es mayor a 10 unidades porcentuales. Podría indicarse que los ionóforos monensina y lasalocida afectan de manera diferente la DIVMS de acuerdo al inóculo bacteriana usado. Cuando se adiciona el inóculo de PA disminuye la DIVMS, mientras que cuando se adicionan a un inóculo LRF estimulan la DIVMS. Aunque no se encontró información científica donde se evalúe la DIVMS de *P.*

*acidilactici* en el rumen, en condiciones anaerobias Cleale *et al.* (1990) indican un aumento en la digestibilidad del 25% de forraje ensilado con *P. acidilactici*.

En el Cuadro 16 se encuentra información del pH medido en los tubos de cultivo de los tratamientos y periodos de incubación. Al inicio del experimento (0 h) todos los tratamientos tenían un pH  $6.8 \pm 0.02$ ; sin embargo, a partir de 24 h de incubación el pH fue menor a 5.8 en todos los tratamientos. La rápida acidificación es resultado del aumento en la cantidad de carbohidratos de fácil fermentación adicionados a los medios de cultivo. El pH mínimo para una eficiente actividad fermentativa de bacterias ruminales es 6.2 (Scandolo *et al.*, 2007). Por tanto, la capacidad para degradar MS de la dieta experimental (DIVMS) fue limitada para el inóculo PA y LRF.

La diferencia ( $p \leq 0.01$ ) en valores de pH desde 24 h de incubación de T1 y T2 con respecto a los tratamientos restantes (T3 al T6) adicionados con ionóforos, de acuerdo con Owens *et al.* (1998) e Ipharraguerre y Clark (2003) hubo una acción bacteriostática y no bactericida sobre las BAL, debido a que los ionóforos no eliminaron totalmente la población bacteriana, sólo redujeron la concentración.

### **6.5.2. Concentración de ácidos grasos volátiles**

Las concentraciones de ácido acético, propiónico, butírico y AGV totales de los tratamiento y periodos de incubación es presentado en el Cuadro 17. La concentración de AGV totales a 72 h de incubación no fue diferente ( $p > 0.5$ ) entre los tratamientos T2, T3, T4, T5 y T6 con 51.18, 49.36, 51.91, 48.24 y 52.99 mM L<sup>-1</sup>, respectivamente, sólo el tratamiento T1 (PA) tuvo la menor concentración (33.06 mM L<sup>-1</sup>).

La concentración de acético fue mayor ( $p \leq 0.01$ ) en los tratamientos T2, T3, T4, T5 y T6 con diferencia con el tratamiento T1 (27.99 mM L<sup>-1</sup>). Mientras que la concentración de propiónico fue mayor ( $p \leq 0.01$ ) en los tratamientos T4, T5 y T6 (10.94, 11.76 y 10.67 mM L<sup>-1</sup>) con respecto a los tratamientos T1, T2 y T3, sin diferencia ( $p > 0.05$ ) entre los tratamientos T2 y T3. (7.38 y 7.39 mM L<sup>-1</sup>). La mayor ( $p \leq 0.01$ ) concentración de butírico fue en el tratamiento T2 y diferentes a los tratamientos T1, T3 y T4, pero sin diferencia ( $p > 0.05$ ) entre los tres últimos. La menor concentración de butírico fue en los tratamientos T5 (1.83) y T6 (2.04) sin diferencia ( $p > 0.05$ ). Todas las concentraciones iniciales tanto de AGV como de ácido acético, propiónico y butírico no hubo diferencias ( $p > 0.1$ ) entre tratamientos.

Las proporciones de AGV (60-65% de acético, 25% de propiónico y 10 a 15% de butírico) producidas en el rumen en condiciones normales de alimentación (dietas con menos del 40% de energía de fácil fermentación) (Calsamiglia y Ferret, 2002; Cobos, 2007): Las proporciones de AGV calculadas en esta investigación (Cuadro 18) indican: la concentración de ácido acético fue superior en todos los tratamientos, pero principalmente en T1, T2 y T3. Mientras, la concentración de propiónico estuvo en el rango de proporciones normales (10 a 15%) en los tratamientos T4, T5 y T6, con menor concentración en los tratamientos T1, T2 y T3, lo anterior contradice a Domestik y Martín (1999) y Knowlton *et al.* (1996a, 1996b) quienes reportaron proporciones de acetato: propiónico de 60 y 20%, concluyendo que la monensina fue un potente inhibidor del metabolismo bacteriano en comparación con la lasalocida. Los tratamientos con LRF con y sin ionóforos tuvieron similares proporciones de AGV (mayor producción de acético y menor de propiónico y butírico) que contradice lo indicado por Cobos (1996) quien expone que los ionóforos permiten un proceso de selección biológica de bacterias resistentes que metabolizan más propiónico y succínico, y menos acetato, butirato, formato y metano. Los resultados de este experimento no coinciden (con excepción en la menor concentración de butírico) con los

resultados de Fuller y Jonhson (1981) donde hubo aumento ( $p \leq 0.05$ ) en la producción de propiónico, sin cambios en la producción de AGV totales, mientras que Nagaraja *et al.* (1987) indica aumento en la concentración de acético y propiónico en dieta a base de glucosa.

**Cuadro 17. Concentración (mM L<sup>-1</sup>) de ácido acético, propiónico, butírico y AGV totales.**

	Tratamientos						E.E.M
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	
Horas	<i>Ácido acético</i>						
24	23.56c	32.44ab	23.32c	31.47ab	26.35bc	32.70a	1.56
48	24.37c	33.88ab	26.34bc	34.59ab	36.31a	39.73a	2.26
72	27.99b	39.83a	39.81a	38.49a	34.64a	40.28a	1.42
	<i>Ácido propiónico</i>						
24	2.84e	8.03c	3.92d	9.78b	4.39d	11.60a	0.22
48	2.81d	15.68a	5.22d	9.36bc	8.38c	11.12b	0.61
72	3.11c	7.38b	7.39b	10.94a	11.76a	10.67a	0.50
	<i>Ácido butírico</i>						
24	2.13b	3.75a	1.69b	2.12b	1.81b	1.73b	0.15
48	1.82b	7.33a	1.85b	2.28b	2.12b	2.07b	0.19
72	1.95bc	3.96a	2.15bc	2.48b	1.83c	2.04bc	0.15
	<i>AGV totales</i>						
24	28.54b	44.23a	28,94b	43.38a	32.55b	46.05a	1.84
48	29.01b	56.90a	33.41b	46.24a	46.82a	52.93a	2.98
72	33.06b	51.18a	49.36a	51.91a	48.24a	52.99a	2.01

**T1**, *P. acidilactici* (PA); **T2**, líquido ruminal fresco (LRF); **T3**, PA + 30 mg Kg<sup>-1</sup> MS de monensina sódica; **T4**, LRF + 30 mg kg<sup>-1</sup> MS de monensina sódica; **T5**, PA + 40 mg kg<sup>-1</sup> MS de lasalocida sódica; **T6**, LRF + 40 mg kg<sup>-1</sup> MS de lasalocida sódica; **a, b, c y d**, Medias con diferente letra en una hilera son diferentes ( $p \leq 0.01$ ); **E.E.M**, Error estándar de la media.

La proporción de ácido butírico fue menos del 10%, cantidad menor a la producida en el metabolismo normal del rumen, los valores fueron de 7.73% como máximo (T2) y de 3.79 como mínimo (T5) que corresponden al inóculo LRF y PA+ lasalocida. En general, los tratamientos con ionóforos fueron los

que presentaron menor concentración porcentual de ácido butírico. Los resultados de T1, T2 y T3 coinciden con los datos reportados por Dinius *et al.* (1976) quienes obtuvieron cambios en la relación de acético: propiónico mientras que Domestik y Martin (1999) reportan reducciones en la concentración de AGV totales. La concentración total de AGV de esta investigación no concuerda con lo reportado por Russell (1987), Domestik y Martin (1999) y Beauchemin *et al.* (2003) quienes indican que la monensina no tiene acción clara en el metabolismo ruminal, pero en general produce efectos en la fermentación ruminal alterando el funcionamiento de la membrana celular de las bacterias Gram positivas. Por tanto, su adición en la alimentación de rumiantes produce inhibición en el crecimiento de éstas bacterias, reducción en la producción de metano e incrementa la concentración de propionato, lo cual no ocurrió en esta investigación, ya que hubo menor concentración de propionato.

**Cuadro 18. Concentración (%) de ácido acético, propiónico y butírico a las 72 h de incubación.**

	Tratamientos					
	T1	T2	T3	T4	T5	T6
AGV						
Acético	84.66	77.82	80.65	74.14	71.80	76.01
Propiónico	9.40	14.41	14.97	21.07	24.37	20.13
Butírico	5.89	7.73	4.35	4.77	3.79	3.84

**T1**, *P. acidilactici* (PA); **T2**, líquido ruminal fresco (LRF); **T3**, PA + 30 mg Kg<sup>-1</sup> MS de monensina sódica; **T4**, LRF + 30 mg kg<sup>-1</sup> MS de monensina sódica; **T5**, PA + 40 mg kg<sup>-1</sup> MS de lasalocida sódica; **T6**, LRF + 40 mg kg<sup>-1</sup> MS de lasalocida sódica;

Domestik y Martin (1999) indican que la monensina reduce la concentración de AGV totales, mientras que la lasalocida tuvo poco efecto, lo anterior no ocurrió en esta investigación. Thomas *et al.* (1985) reportan que *Pediococcus* spp. metaboliza rápido la glucosa a ácido láctico y lento hacia la formación de acetato (1.75  $\mu\text{mol mg}^{-1}$  de MS bacteria<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>), no anterior no fue obtenido

en el presente estudio, aunque el T1 (PA) tuvo la menor concentración de AGV, por otra parte, tuvo la mayor concentración de acético de todos los tratamientos. Los datos reportados por Bauer *et al.*, (1995); Nagaraja *et al.* (1997) y Dawson (2005) indican que los ionóforos (dosis mínima recomendada) no afectan la concentración de AGV.

### 6.5.3. Concentración de nitrógeno amoniacal

La mayor ( $p \leq 0.01$ ) concentración de amoniaco ( $\text{NH}_4$ ) entre las 24 y 72 h de incubación se presentó en el T1, la concentración fue menor a 10 mg de  $\text{NH}_4$   $\text{dL}^{-1}$  de fluido ruminal, cantidad optima requerida para bacterias ruminales (Abdoun *et al.*, 2007). En contraste, la menor concentración de  $\text{NH}_4$  se observo en el T6 a las 72 h (Cuadro 19).

**Cuadro 19. Concentración (mg  $\text{dL}^{-1}$ ) de nitrógeno amoniacal.**

Horas	Tratamientos						E.E.M
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	
24	6.75a	4.41b	5.80a	2.21c	4.39b	1.82c	0.47
48	5.14a	2.93b	4.53ab	3.38ab	3.80ab	2.77b	0.77
72	5.49a	4.47bc	4.55b	2.31d	3.74c	1.51e	0.27

**T1**, *P. acidilactici* (PA); **T2**, líquido ruminal fresco (LRF); **T3**, PA + 30 mg  $\text{Kg}^{-1}$  MS de monensina sódica; **T4**, LRF + 30 mg  $\text{kg}^{-1}$  MS de monensina sódica; **T5**, PA + 40 mg  $\text{kg}^{-1}$  MS de lasalocida sódica; **T6**, LRF + 40 mg  $\text{kg}^{-1}$  MS de lasalocida sódica; **a, b, c, d y e**, Medias con diferente letra en una hilera son diferentes ( $p \leq 0.01$ ); **E.E.M**, Error estándar de la media.

En ningún periodo de incubación la concentración de  $\text{NH}_4$  alcanzo la cantidad requerida reportada por Abdoun *et al.*, (2007) para eficiente actividad microbiana, por tanto, es recomendable aportar NNP a dietas con alta proporción de carbohidratos de fácil fermentación (D-FR); posiblemente, la baja cantidad de nitrógeno presente en el medio fue la limitante para la síntesis de proteína microbiana. Los resultados en los tratamientos con ionóforos concuerdan con Coe *et al.* (1999) quienes reportan una

concentración ruminal de  $\text{NH}_4$  menor cuando a la dieta con elevado contenido de carbohidratos de fácil degradación, le fue adicionada monensina y el antibiótico virginiamicina. Los resultados de este estudio coinciden con Fuller y Johnson (1981) quienes indican una reducción del 30% en la concentración de  $\text{NH}_4$  cuando lasalocida fue adicionada a la dieta con alto contenido de alimentos concentrados en energía. Mientras que, Ricke *et al.* (1984) reporta similares resultados ( $p \leq 0.05$ ) pero usando monensina, Funk *et al.* (1986) no reportan cambios en la concentración de  $\text{NH}_4$  con la adición de lasalocida.

#### **6.5.4. Concentración de ácido láctico**

La concentración de ácido láctico (Cuadro 20) desde 24 hasta 72 h de incubación fue mayor ( $p \leq 0.01$ ) en los tratamientos T1 (PA) y T2 (LRF) con una concentración final (72 h) de 1419.4 y 1452.4  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente, los tratamientos T3, T4, T5 y T6 no presentaron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) desde el inicio hasta las 72 h de incubación. Los resultados permiten indicar que los inóculos utilizados (PA y LRF) tienen alta capacidad para producir ácido láctico, y que la monensina y lasalocida produjeron una reducción significativa ( $p \leq 0.01$ ) en la concentración de ácido láctico. La acumulación de éste ácido fue menor en los tratamientos con ionóforos. La disponibilidad de carbohidratos de fácil fermentación en la dieta favoreció el crecimiento de BAL, por tanto, mayor producción de ácido láctico en los tratamientos T1 y T2.



**Cuadro 20. Concentración ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) de ácido láctico.**

Tratamientos							
Horas	T1	T2	T3	T4	T5	T6	E.E.M
24	1549.6a	1500.8a	265.2b	746.3b	248.6b	795.7b	220.90
48	1561.0a	1789.7a	518.6b	854.3b	551.7b	611.6b	158.06
72	1419.4a	1452.4a	505.7b	681.3b	484.4b	715.2b	172.65

**T1**, *P. acidilactici* (PA); **T2**, líquido ruminal fresco (LRF); **T3**, PA + 30 mg Kg<sup>-1</sup> MS de monensina sódica; **T4**, LRF + 30 mg kg<sup>-1</sup> MS de monensina sódica; **T5**, PA + 40 mg kg<sup>-1</sup> MS de lasalocida sódica; **T6**, LRF + 40 mg kg<sup>-1</sup> MS de lasalocida sódica; **a y b**, Medias con diferente letra en una hilera son diferentes ( $p \leq 0.01$ ); **E.E.M**, Error estándar de la media.

Los resultados de este estudio coinciden con Burrin y Britton (1986) quienes indican que la adición de monensina (150 y 300 mg animal<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>) redujo la concentración ruminal de lactato por debajo de 1.25 mM. Mientras que Nagaraja y Taylor (1987) concluyen que la adición de monensina y lasalocida (1.3 mg kg<sup>-1</sup> de MS por 2 d) no evito la caída del pH, ni la acumulación de lactato en el rumen. Knowlton *et al.* (1996a y 1996b) reportan que lasalocida (360 mg animal<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>) no evito el incremento en la concentración de ácido láctico, aunque la concentración de acético, propiónico, butírico, se mantuvo estable. En contraste Bauer *et al.* (1995) y Coe *et al.* (1999) reportan que la monensina reduce la acumulación de ácido láctico, previniendo la acidosis ruminal, también reportan que entre 5 y 15 % de forraje en la dieta reduce la acumulación de éste ácido.

Los diferentes resultados reportados con el uso de monensina en dietas altas en concentrados pueden ser modificados por el número variables relacionadas; por ejemplo Green *et al.* (1999) y Mutsvangwa *et al.* (2002) indican que adaptar a los rumiantes a dietas altas en granos con monensina incrementa el pH ruminal, evitando la acidosis ruminal aguda, lo cual no sucedió cuando los animales recibieron la misma dieta pero sin periodo de adaptación. Owens *et al.* (1998) reportan aumento de pH y Mutsvangwa *et al.* (2002) determinaron que incidencia de acidosis ruminal no fue provocada

por el aumento en la concentración de ácido láctico, sino por el aumento en la producción y concentración de AGV. La acción bacteriostática de la monensina provocó menor concentración de ácido láctico y mantuvo regulado el pH ruminal, por tanto, permitió mayor fermentación de carbohidratos de la dieta y mayor producción de AGV en el rumen. Los valores de pH obtenidos en los tratamientos T1 y T2 fueron debidos a la acumulación de ácido láctico tal y como lo reporta Fitzsimons *et al.* (1992) y no por acumulación de AGV como indica Beauchemin *et al.* (2003) y Mutsvangwa *et al.* (2002)

## **6.6. Variables microbiológicas**

### **6.6.1. Concentración de bacterias totales**

La concentración inicial de  $10^8$  bacterias  $\text{mL}^{-1}$  de medio de cultivo fue similar ( $p \leq 0.05$ ) en todos los tratamientos (Cuadro 21). El número inicial (0 h) de bacterias fue establecido en las pruebas para medir el efecto de los ionóforos en la concentración de las diferentes especies de bacterias de los inóculos PA y LRF. A 3 h de incubación la mayor ( $p \leq 0.05$ ) concentración de bacterias totales fue en los tratamientos T2 y T4 y la menor concentración fue en el tratamiento T6.

A 6 h de incubación el tratamiento T2 tuvo la mayor ( $p \leq 0.05$ ) concentración de bacterias totales, seguido por los tratamientos T1, T4 y T6. Con relación a los tratamientos T3 y T5 que fueron inoculados con PA + monensina y PA + lasalocida el efecto bacteriostático de los ionóforos disminuyó la concentración de bacterias, sin eliminarlas. En general, la monensina y la lasalocida tienen una acción bacteriostática sobre *P. acidilactici*, mientras que en el consorcio de bacterias ruminales (LRF) fue nulo, este resultado coincide con Tung y Kung (1993) quienes indican que el ionóforo monensina no afectó al consorcio bacteriano ruminal utilizado; debido a que mantuvieron los

niveles de AGV, pero Callaway y Martin (1998) reportaron que la monensina afecto la mezcla de bacteria ruminales utilizadas como inóculo reduciendo la producción de AGV y ácidos orgánicos.

**Cuadro 21. Concentración de bacterias totales (BT).**

Tratamientos	Horas de incubación		
	0	3	6
T1	4.41 x 10 <sup>8</sup> a	9.78 x 10 <sup>9</sup> c	1.71 x 10 <sup>11</sup> b
T2	4.17 x 10 <sup>8</sup> a	1.71 x 10 <sup>11</sup> a	8.64 x 10 <sup>11</sup> a
T3	3.54 x 10 <sup>8</sup> a	1.72 x 10 <sup>7</sup> d	9.22 x 10 <sup>6</sup> c
T4	2.10 x 10 <sup>8</sup> a	1.02 x 10 <sup>11</sup> a	2.68 x 10 <sup>11</sup> b
T5	2.10 x 10 <sup>8</sup> a	7.58 x 10 <sup>6</sup> d	9.02 x 10 <sup>6</sup> c
T6	1.02 x 10 <sup>8</sup> a	2.67 x 10 <sup>10</sup> b	8.38 x 10 <sup>10</sup> b
E. E. M	2.13 x 10 <sup>6</sup>	8.57 x 10 <sup>10</sup>	8.70 x 10 <sup>10</sup>

**T1**, *P. acidilactici* (PA); **T2**, liquido ruminal fresco (LRF); **T3**, PA + 30 mg Kg.<sup>-1</sup> MS de monensina sódica; **T4**, LRF + 30 mg kg<sup>-1</sup> MS de monensina sódica; **T5**, PA + 40 mg kg<sup>-1</sup> MS de lasalocida sódica; **T6**, LRF + 40 mg kg<sup>-1</sup> MS de lasalocida sódica; **a, b, c y d**, Medias con diferente letra en una columna son diferentes (p<0.01); **E.E.M**, Error estándar de la media.

### 6.6.2. Concentración de bacterias ácido lácticas

Los tratamientos T1 y T2 (Cuadro 22) tuvieron las mayores (p<0.05) concentraciones de BAL mL<sup>-1</sup> de medio de cultivo a 3 y 6 h de incubación con respecto a los tratamientos T3, T4, T5 y T6.

En el Cuadro 22, puede observarse que *P. acidilactici* no tuvo dificultades para crecer en medio de cultivo MRS, mientras que para LRF solo crecieron especies de los géneros Estreptococos y Lactobacilos con capacidad para crecer en el medio de cultivo MRS. Lo anterior, indica el porque al inicio de la prueba la concentración de bacterias fue entre 8.5 x10<sup>5</sup> a 4.41 x10<sup>6</sup> mL<sup>-1</sup>.

**Cuadro 22. Concentración de bacterias ácido lácticas (BAL).**

Tratamientos	Horas de incubación		
	0	3	6
T1	4.82 x10 <sup>8</sup> a	9.53 x10 <sup>9</sup> a	6.50 x10 <sup>10</sup> a
T2	1.33 x10 <sup>6</sup> c	7.83 x10 <sup>8</sup> b	7.50 x10 <sup>10</sup> a
T3	4.20 x10 <sup>8</sup> a	1.17 x10 <sup>7</sup> c	9.33 x10 <sup>6</sup> b
T4	8.50 x10 <sup>5</sup> c	2.40 x10 <sup>6</sup> c	5.90 x10 <sup>6</sup> b
T5	2.52 x10 <sup>8</sup> b	4.00 x10 <sup>7</sup> c	9.02 x10 <sup>6</sup> b
T6	4.41 x10 <sup>6</sup> c	4.00 x10 <sup>5</sup> c	8.61 x10 <sup>7</sup> b
E. E. M	3.21 x10 <sup>7</sup>	2.64 x10 <sup>7</sup>	4.08 x10 <sup>9</sup>

**T1**, *P. acidilactici* (PA); **T2**, líquido ruminal fresco (LRF); **T3**, PA + 30 mg Kg.<sup>-1</sup> MS de monensina sódica; **T4**, LRF + 30 mg kg<sup>-1</sup> MS de monensina sódica; **T5**, PA + 40 mg kg<sup>-1</sup> MS de lasalocida sódica; **T6**, LRF + 40 mg kg<sup>-1</sup> MS de lasalocida sódica; **a, b y c**, Medias con diferente letra en una columna son diferentes (p≤0.01); **E.E.M**, Error estándar de la media.

El comportamiento diferentes entre los inóculos PA y LRF con o sin ionóforos (T3 y T5 versus T4 y T6) indica que la concentración de bacterias en el inóculo PA fue disminuyendo de las 0 a las 6 h de incubación, de 4.2 x10<sup>8</sup> a 9.33 x10<sup>6</sup> mL<sup>-1</sup> en el tratamiento T3 y de 2.52 x10<sup>8</sup> a 9.02 x 10<sup>6</sup> en T5. Mientras que la concentración de BAL del inóculo LRF tendió a aumentar de 8.5 x10<sup>5</sup> a 5.9 x10<sup>6</sup> (T4) y de 4.41 x10<sup>6</sup> a 8.61 x10<sup>7</sup>.

La mayor concentración de bacterias ruminales al inocular los medios de cultivo con LRF, coincide con Therion *et al.* (1982) quienes indican que hay una sucesión de especies bacterianas ácido sensibles hacia bacterias ácido tolerantes. A 3 y 6 h de incubación la concentración de bacteriana de *P. acidilactici* sin ionóforos (T1) fue superior en comparación con los tratamientos con monensina (T3) y con lasalocida (T5), lo anterior indica una acción inhibitoria de los ionóforos usados en contra de *P. acidilactici*. Con relación al inóculo LRF hubo una mayor (p≤0.05) concentración de BAL a 3 y 6 h de incubación en el tratamiento sin ionóforos (T2) en comparación con los tratamientos con monensina (T4) y con lasalocida (T6).

La sensibilidad de *P. acidilactici* a la monensina y la lasalocida observada en este estudio fue similar a los causados a la mayoría de BAL; alterando la permeabilidad de la membrana (González y Kunka 1983; Zarazaga *et al.*, 1999). La actividad inhibitoria en el metabolismo de BAL causado por los ionóforos, justifica el uso de la monensina y la lasalocida para el control de acidosis ruminal (Dawson, 2005). También, las bacterias ruminales presentes en el inóculo LRF pueden tener resistencia a los ionóforos evaluados, esta característica se ha identificado en bacterias ruminales *Ruminococcus* sp., *Succinivibrio dextrinosolvens*, *Lachnospira multiparus*, *Eubacterium*, *Butyrivibrio ruminantium*, las cuales no son dañadas por los ionóforos y proliferan en un medio con producción de ácido láctico (Bryant y Robinson, 1962; Martin y Streeter, 1995).

### **6.6.3. Concentración de bacterias celulolíticas**

El efecto de los ionóforos monensina y lasalocida en desarrollo de bacterias celulolíticas únicamente fue realizado en los tratamientos inoculados con LRF (T2, T4 y T6). Los tratamientos T1, T3 y T5 inoculados con *P. acidilactici* no fue requerido hacer la prueba de actividad celulolítica.

El Cuadro 23 muestra el poco crecimiento de bacteria celulolíticas, no hubo diferencia significativa ( $p > 0.05$ ) entre los tratamientos T2, T4 y T6 a 0 y 3 h de incubación, pero hubo diferencias ( $p \leq 0.05$ ) entre los tratamientos a 6 h de incubación. En general hay disminución en la concentración de bacterias celulolíticas de acuerdo al paso del tiempo de incubación. Aunque Russell y Strobel (1989) explican que el efecto de los ionóforos hacia las bacterias celulolíticas es mínimo, ya que las tres principales especies de bacterias ruminales celulolíticas: *Ruminococcus flavefaciens* y *R. albus* son sensibles y *Fibrobacter succinogenes* es resistente. Cuando se adicionan ionóforos a una dieta, la población de *Ruminococcus flavefaciens* y *R. albus* disminuye, pero

la población de *Fibrobacter succinogenes* aumenta. Por tanto, el balance o concentración de bacterias celulolíticas mL<sup>-1</sup> de fluido ruminal se mantiene sin cambios. En este estudio no se identificaron las especies celulolíticas a los diferentes periodos de incubación, pero de acuerdo a los resultados obtenidos no hay evidencia para indica una sucesión microbiana similar a la reportada por Russell y Strobel (1989).

**Cuadro 23. Concentración de bacterias celulolíticas (BC).**

Tratamientos	Horas de incubación		
	0	3	6
T2	2.5x10 <sup>3</sup> a	9.7x10 <sup>2</sup> a	7.8x10 <sup>2</sup> a
T4	2.0x10 <sup>3</sup> a	1.88x10 <sup>2</sup> a	0c
T6	2.5x10 <sup>3</sup> a	2.0x10 <sup>2</sup> a	2.5x10 <sup>2</sup> b
E. E. M	150	33.3	33.3

**T2**, líquido ruminal fresco (LRF); **T4**, LRF + 30 mg kg<sup>-1</sup> MS de monensina sódica; **T6**, LRF + 40 mg kg<sup>-1</sup> MS de lasalocida sódica; **a y b**, Medias con diferente letra en una columna son diferentes (p≤0.01); **E.E.M**, Error estándar de la media.

## 7. CONCLUSIONES

De acuerdo con los objetivos planteados en este presente trabajo se concluye que:

- 1) La cepa bacteriana aislada del rumen de ovinos alimentados con una dieta alta en carbohidratos de fácil fermentación, pertenecen de acuerdo a la secuenciación del gen ARNr 16S y con un 99% de confianza al género *Pediococcus*.
- 2) El análisis del árbol filogenético confirma que la cepa es del género *Pediococcus*, ubicándose dentro del grupo conformado por cepas de la especie *P. acidilactici*.
- 3) *P. acidilactici* es una bacteria amilolítica productora de ácido láctico y no hay reportes anteriores que indiquen su presencia en el rumen.
- 4) *P. acidilactici* fue sensible a las dosis de monensina y lasalocida usadas, sin ser completamente eliminada, lo que indica un efecto bacteriostático.
- 5) En el fluido ruminal (LRF) hay microorganismos resistentes a la monensina y lasalocida con metabolismo similar de BAL en la reducción de pH y producción de ácido láctico en los medios *in vitro*.
- 6) *P. acidilactici* tuvo fermentación heterofermentativa con producción de ácido láctico y en menor cantidad de ácido acetato, propionato y butirato.
- 7) La adición de monensina y lasalocida a una dieta alta en carbohidratos de fácil fermentación disminuyó la producción de ácido láctico por *P. acidilactici*, sin afectar su producción de AGV.

8) La similitud fenotípica entre *S. bovis* y *P. acidilactici* podría ser la causa de que *P. acidilactici* no sea reconocida como una especie ruminal importante en la acidosis ruminal subclínica.



## 8. LITERATURA CITADA

- Abdoun, K., F. Stumpff, and H. Martens. 2007. Ammonia and urea transport across the rumen epithelium: a review. *Anim. Health Res. Reviews* 7: 43-59.
- Al Jassim, R. A., G. L. R. Gordon, and J. B. Rowe. 2003. The effect of basal diet on lactate-producing bacteria and the susceptibility of sheep to lactic acidosis. *Brit. Society of Animal Sci.* 77: 459-469.
- Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, and D. J. Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402.
- Anderson, R. C., M. A. Rasmussen, N. S. Jensen, and M. J. Allison. 2000. *Denitrobacterium detoxificans* gen. Nov., sp. Nov., a ruminal bacterium that respire on nitrocompounds. *Int. J. Syst. Microbiol.* 50: 633-638.
- Arcos, M. L., F. Ossa, y T. E. Díaz. 2004. Criopreservación de aislados nativos de la bacteria ruminal *Fibrobacter succinogenes*. *Rev. Corpoica.* 5: 60-63.
- Bach, A. 2002. Trastornos Ruminales en el Vacuno Lechero. Un enfoque práctico. XVIII Curso de Especialización FEADN. Barcelona, España. pp. 119-139.
- Back, W. 1978. Elevation of *Pediococcus cerevisiae* subsp. *Dextrinius* Coster and White to species status *Pediococcus dextrinius* (Coster and White). *Comb. Nov. Int. J. Syst. Bacteriol.* 28: 523-527.
- Barney, M., A. Volgyi, A. Navarro, and D. Ryder. 2001. Ribotyping and 16S rRNA Gene Sequencing for Identification of Brewery *Pediococcus* Isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 553-560.
- Bauer, M. L., D. W. Herold, R. A. Stock, T. J. Klopstein, and D. A. Yates. 1995. Efficacy of Laidlomycin Propionate to Reduce Ruminant Acidosis in Cattle. *J. Anim. Sci.* 73: 3445-3454.
- Beauchemin, K. A., W. Z. Yang, D. P. Morgavi, G. R. Ghorbani, W. Kautz, and J. A. Z. Leedle. 2003. Effect of bacterial direct-fed microbials and yeast on site and extent of digestion, blood chemistry, and subclinical ruminal acidosis in feedlot cattle. *J. Anim. Sci.* 81: 1628-1640.
- Beede, D. K., and S. D. Farlin. 1977. Effects of antibiotics on apparent lactate and volatile fatty acid production: in vitro rumen fermentation studies. *J. Anim. Sci.* 45: 385-392.

- Borrego, S., M.E. Espinosa, M.E. Carballo, T. Moreira, E. Martí, A. Ramírez. 2001. Comportamiento de tres mutantes de micobacterias productoras de precursores esteroides conservadas por liofilización durante 10 años. *Biotecnología Aplicada* 18: 85-87.
- Bryant, M. P. and I. M. Robinson. 1962. Some nutritional characteristic of predominant culturable ruminal. *J. Bacteriology*. 64: 605-613.
- Burrin, D. G., and R. A. Britton. 1986. Response to monensin in cattle during subacute acidosis. *J. Anim. Sci.* 63: 888-893.
- Cai, Y., S. Kumai, M. Ogawa, Y. Benno, and T. Nakase. 1999. Characterization and identification of *Pediococcus* species isolated from forage crops and their application for silage preparation. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 2901-2906.
- Callaway, T. R, and S. A. Martin. 1996. Effects of organic acid and monensin treatment on *in vitro* mixed ruminal microorganism fermentation of cracked corn. *J. Anim. Sci.* 1996. 74: 1982-1989.
- Callaway, T. R. and S. A. Martin. 1997. Effects of Cellobiose and Monensin on In Vitro Fermentation of Organic Acids by Mixed Ruminal Bacteria. *J Dairy Sci* 80: 1126-1135.
- Caldwell, S., D. J. McMahon, C. J. Oberg, and J. R. Broadbent. 1996. Development and Characterization of Lactose-Positive *Pediococcus* Species for Milk Fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 936-941
- Calsamiglia, S., y A. Ferret. 2002. Fisiología ruminal relacionada con la patología digestiva: acidosis y meteorismo. XVIII Curso de especialización FEADN. Barcelona pp.97-115.
- Chaucheyras, F., G. Fonty, G. Bertin, and P. Gouet. 1995. In vitro H<sub>2</sub> utilization by a ruminal acetogenic bacterium cultivated alone or in association with an archaea methanogen is stimulated by a probiotic strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 3466-3467.
- Chow, J. L., J. A. S. Van Kessel, and J. B. Russell. 1994. Binding of radiolabeled monensina and lasalocida to ruminal microorganism and feed. *J. Anim. Sci.* 72: 1630-1635.
- Cleale, R. M., J. L. Firkins, F. Van Der Beek, J. H. Clark, E. H. Jaster, G. C. McCoy, and T. H. Klusmeyer. 1990. Effect of inoculation of whole plant corn forage with *Pediococcus acidilactici* and *Lactobacillus xylosus* on preservation of silage and heifer growth. *J. Dairy Sci.* 73: 711-718.

Cobos, M. A. 2007. Interacción entre microorganismos ruminales. In: Ferrera-Cerrato R. y A. Alarcón (eds). Microbiología agrícola. Hongos, bacterias, micro y macrofauna, control biológico y planta-microorganismo. Ed. Trillas. pp. 498-516.

Cobos, M. A. and M. T. Yokoyama. 1995. *Clostridium paraputrificum* variedad *Ruminantium*: colonization *in vitro* observed by scanning electron microscopy. In Wallace, R. J. and A. Lahlou-Kassi (eds). Rumen Ecology Research Planning. Proceedings of a workshop held at LLRF. Addis Ababa, Ethiopia, 13-18 March. pp. 151-161.

Cobos, M. A., E. Guerra, S. J. López, J. L. Báez, S. S. González-Muñoz, y G. D. Mendoza. 2005. Evaluación *in vitro* de dos amortiguadores y un ionóforo sobre variables fermentativas y microbiológicas. *Agrociencia, Colegio de Postgraduados*. 39:1-9.

Cobos, P. M. 1996. Microbiología aplicada a nutrición animal de rumiantes. In: memoria del curso internacional avanzado de nutrición de rumiantes. Universidad Autónoma Metropolitana. Xochimilco. Edo de México. pp. 1-16.

Coe, M. L., t. G. Nagaraja, Y. D. Sun, N. Wallace, E. G. Towne, K. E. Kemp, and J. P. Hutcheson. 1999. Effects of virginiamycin on ruminal fermentation in cattle during adaptation to a high concentrate diet ad during an induced acidosis. *J. Anim. Sci.* 77: 2259-2268.

Collins M. D., A. M. Williams, and S. Wallbanks. 1990. The phylogeny of *Aerococcus* and *Pediococcus* as determined by 16S rRNA sequence analysis: description of *Tetragenococcus* gen. Nov. *FEMS Microbiol Lett.* 58(3): 255-62.

Cotta, M. A. 1992. Interaction of ruminal bacteria in the production and utilization of maltooligosaccarides from starch. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 48-54.

Dawson, K. A. 2005. The use of complementary tools, monensin and Yea-Secc®<sup>1026</sup>, to synergistically modify ruminal functions and improve the performance of dairy cattle. In: Lyons, T. P., and K. A. Jacques (Eds.). *Biotechnology in the feed industry*. Proceedings of Alltech's 21th Annual Symposium. Nottingham University Press. UK. pp. 232-239.

Dehority, B. A. 2003. Rumen microbiology. Rumen bacteria – history, methods of *in vitro* cultivation and discission of mixed culture fermentation. Nottingham University Press. pp 157-176.

Deibel, R. H., G. D. Wilson, and C. F. Niven, Jr. 1960. Microbiology of meat curing. IV. A lyophilized *Pediococcus cerevisiae* starter culture for fermented sausage. Divisions of bacteriology and food technology, American Meat Institute Foundation, The University of Chicago, Illinois.

Dennis, S. M. and T. G. Nagaraja. 1981. Effects of lasalocid or monensin on lactate-producing or using rumen bacteria. *J. Anim. Sci.* 52: 418-426.

Dinius, D. A., M. E. Simpson, and P. B. Marsh. 1976. Effect of monensin fed with forage on digestion and the ruminal ecosystem of steers. *J. Anim. Sci.* 42: 229-234.

Dobson, C. M., C. M., H. Deneer, S. Lee, S. Hemmingsen, S. Glaze, and B. Ziola. 2002. Phylogenetic analysis of the genus *Pediococcus*, including *ediococcus clausenii* sp. Nov., a novel lactic acid bacterium isolated from beer. *Int. J. Syst Microbiol.* 52: 2003-2010.

Domestik, E. J., and S. A. Martin. 1999. Effects of laidlomycin propionate and monensin on the in vitro mixed ruminal microorganism fermentation. *J. Anim. Sci.* 77: 2305-2312.

Duchaine, C., M. Lavoie, and Y. Cormier. 1995. Effects of a bacterial hay preservative (*Pediococcus pentosaceus*) on hay under experimental storage conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 4240-4243.

Efron, B., and G. Gong. 1983. A leisurely look at the bootstrap, the jackknife, and cross-validation. *American Statistician.* 37: 36-48.

Eisen, J. A., S. W. Smith, and C. M. Cavanaugh. 1992. Phylogenetic relationships of chemoautotrophic bacterial symbionts of *Solemya velum* say (Mollusca: Bivalvia) determined by 16S rRNA gene sequence analysis. *J. Bacteriol.* 174: 3416-3421.

El-Baradei, G., A. Delacroix-Buchet, and J. C. Ogier. 2007. Biodiversity of bacterial ecosystems in traditional Egyptian. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 1248-1255.

Ennahar, S., Y. Cai, and Y. Fujita. 2003. Phylogenetic diversity of lactic acid bacteria associated with paddy rice silage as determined by 16S ribosomal ADN analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 444-451.

Fahey, G. C. y L. L. Berger. 1993. Los carbohidratos en la nutrición de los rumiantes. In: Church, D. C. (Ed). *El Rumiante, Fisiología y Nutrición*. Editorial Acribia, S. A. Zaragoza, España. pp. 305- 337.

Felis G. E., S. Torriani, and F. Dellaglio. 2005. Reclassification of *Pediococcus urinaeequi* (ex Mees 1934) Garvie 1988 as *Aerococcus urinaeequi* comb. Nov. *Int. J. Syst Evol Microbiol.* 55: 1325-1327.

Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*, 39: 783-791.

- Fitzsimons, A., F. Duffner, D. Curtin, G. Brophy, P. O'kiely, and M. O'Connell. 1992. Assessment of *Pediococcus acidilactici* as a potential silage inoculants. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 2578-2585.
- Fuller, J. R., and D. E. Johnson. 1981. Monensin and lasalocid effects on fermentation in vitro. *J. Anim. Sci.* 53: 1575-1580.
- Funk, M. A., M. L. Galyean and T. T. Ross. 1986. Potassium and lasalocid effects on performance and digestion in lambs. *J. Anim. Sci.* 63: 685-691.
- Galtier, N., M. Gouy, and C. Gautier. 1996. SEAVIEW and PHYLO\_WIN: two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *Cabios*, 12: 543-548.
- Garmyn, D., T. Ferain, N. Bernard, P. Hols, and J. Delcour. 1995. Cloning nucleotide sequence, and transcriptional analysis of the *Pediococcus acidilactici* L-(+)-lactate dehydrogenase gene. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 266-272.
- Garvie, E. L. 1986. Genus *Pediococcus*. pp. 1075-1079. *In* Sneath, P. H. A., N. S. Mair, M. E. Sharpe, and J. G. Holt (Ed). *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 9<sup>th</sup> ed. Vol 2. The Williams & Wilkins Co. Baltimore. USA.
- Ghorbani, G. R., D. P. Morgavi, K. A. Beauchemin, and J. A. Z. Leedle. 2002. Effects of bacterial direct-fed microbials on ruminal fermentation, blood variables, and the microbial populations of feedlot cattle. *J. Anim. Sci.* 80: 1977-1985.
- Goad, D. W., C. L. Goad, and T. G. Nagaraja. 1998. Ruminal Microbial and Fermentative Changes Associated with Experimentally Induced Subacute Acidosis in Steers. *J. Anim. Sci.* 76: 234-241.
- Golledge, C. L., N. Stingemore, M. Aravena, and D. Joske. 1990. Septicemia caused by vancomycin-resistant *Pediococcus acidilactici*. *J. Clin. Microbiol.* 28: 1678-1679.
- Gonzalez, C. F., and B. Kunka. 1983. Plasmid transfer in *Pediococcus* spp.: intergeneric and intrageneric transfer of pIP5O1. *Appl. Environ. Microbiol.* 46: 81-89.
- Gonzalez, C. F., and B. Kunka. 1987. Plasmid transfer in *Pediococcus* spp.: intergeneric and intrageneric transfer of pIP5O1. *Appl. Environ. Microbiol.* 46: 81-89.
- Green, B. L., B. W. McBride, D. Sandals, K. E. Leslie, R. Bagg, and P. Dick. 1999. The impact of a monensin controlled-released capsule on subclinical ketosis in the transition dairy cow. *J. Dairy Sci.* 82: 333-342.

- Hardie, J. M. 1986. *Genus Streptococcus*. pp. 1043-1070. *In* Sneath, P. H. A., N. S. Mair, M. E. Sharpe, and J. G. Holt (Ed). *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 9<sup>th</sup> ed. Vol 2. The Williams & Wilkins Co. Baltimore. USA.
- Harrigan, W. F., y E. M. McCance. 1979. *Métodos de Laboratorio en Microbiología de los Alimentos y Productos Lácteos*. Ed. Academia. León, España. pp: 32-35, 361-366.
- Huber, T. L. 1976. Physiology effects of acidosis on feedlot cattle. *J. Anim. Sci.* 43: 902-909.
- Hummel, A. S., C. Hertel, W. H. Holzapfel, and C. M. P. Franz. 2007. Antibiotic resistances of starter and probiotic strains of lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 730-739.
- Hungate, R. E. 1969. A roll-tube method for the cultivation of strict anaerobes *In: Methods in Microbiology*. Vol. 3B: 117-132. Academic Press. NY.
- Huntington, G. 1996. Utilización de ionóforos para bovinos. *In: Memoria del Curso Internacional Avanzado de Nutrición de Rumiantes*. Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco. Edo de México. Pp. 1-13.
- Huntington, G., and R. Britton. 1978. Effect of dietary lactic content and energy level on rumen lactate metabolism in sheep. *J. Anim. Sci.* 47: 241-246.
- Ipharraguerre, I. R. and J. H. Clark. 2003. Usefulness of ionophores for lactating dairy cows: a review. *Anim Feed Sci and Technol.* 106: 39-57.
- Janda, J. M., and S. L. Abbott 2007. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: Pluses, perils, and pitfalls. *J. Clin. Microbiol.* doi:10.1128/JCM.01228-07.
- Jarrige, R. 1990. Ingestión y digestión de los alimentos. *In: INRA. (Ed). Alimentación de bovinos, ovinos y caprinos*. Ed. Mundi-Prensa. Madrid, España. pp. 29-53.
- Klare, I., C. Konstabel, S. Muller-Bertling, R. Reissbrodt, G. Huys, M. Vancanneyt, J. Swings, H. Goossens, and W. Witte. 2005. Evaluation of new broth media for microdilution antibiotic susceptibility testing of Lactobacilli, Pediococci, Lactococci and Bifidobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* Vol 71. No. 12: 8982-8986.
- Knowlton, K. F., M. S. Allen, and P. S. Erickson. 1996a. Lasalocid and particle size of corn grain for dairy cows in early lactation. 1. Effect on

performance, serum metabolites, and nutrient digestibility. *J. Dairy Sci.* 79: 557-564.

Knowlton, K. F., M. S. Allen, and P. S. Erickson. 1996b. Lasalocid and particle size of corn grain for dairy cows in early lactation. 2. Effect on ruminal measurements and feeding behavior. *J. Dairy Sci.* 79: 565.

Kopecny J., M. Zorec, J. Mraček, Y. Kobayashi, and R. Marinský-Logar. 2003. *Butyrivibrio hungatei* sp. Nov. and *Pseudobutyrvibrio xylanivorans* sp. Nov., butyrateproducing bacteria from the rumen. *Int. J. Syst Microbiol.* 53: 201-209.

Krause, D. O. and J. B. Russell. 1996. How many ruminal bacteria are there? *J. Dairy Sci.* 79: 1467-1475.

Kunene, N. F., I. Geornaras, A. von Holy, and J. W. Hasting. 2000. Characterization and determination of origin of lactic acid bacteria from a sorghum-based fermented weaning food by analysis of soluble proteins and amplified fragment length polymorphism fingerprinting. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 1084-1092.

Lana, R. P. and J. B. Russell. 1996. Use of potassium depletion to assess adaptation of ruminal bacteria to ionophores. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 4499-4503.

Leisner, J. J., B. Pot, H. Christensen, G. Rusul, J. E. Olsen, B. W. Wee, K. Muhamad, and H. M. Ghazali. 1999. Identification of lactic acid bacteria from chili bo, a Malaysian food ingredient. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 599-605.

London, J. 1968. Regulation and function of lactate oxidation in *Streptococcus faecium*. *J. Bacteriol.* 95:1380-1387.

Lui, L., B. Lui, H. Tong, X. Dong. 2006. *Pediococcus ethanolidurans* sp. Nov., isolated from the walls of a distilled-spirit-fermenting cellar. *Int J Syst Evol Microbiol.* 56: 2405-2408.

Madigan, M. T., J. M. Martinko y J. Parker. 2003. *Nutrición y metabolismo*. In Brock, *Biología de los microorganismos*. 10<sup>a</sup> Edición. Ed. Pearson, Prentice Hall, España. pp. 109-148.

Martin, S. A., and J. B. Russell. 1987. Transport and phosphorylation of disaccharides by the ruminal bacterium *Streptococcus bovis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 2388-2393.

Martin, S. A., and M. N. Streeter. 1995. Effect of malate on in vitro mixed ruminal microorganism fermentation. *J. Anim. Sci.* 73: 2141-2145.

McCullough, H. 1967. The determination of amonio in whole blood by direct colorimetric method. *Clin. Chem.* 17: 297-304.

McDonald, P., A. R. Henderson, S. J. E. Heron. 1991. *The biochemistry of silage*, 2<sup>nd</sup> Edition. Chalcombe Publications, Marlow, Bucks, UK. pp. 255-257.

Mora, D., M. G. Fortina, C. Parini, D. Daffonchio, and P. L. Manachini. 2000. Genomic subpopulations within the species *Pediococcus acidilactici* detected by multilocus typing analysis: relationships between pediocin AcH/PA-1 producing and non-producing strains. *Microbiology* 146: 2027-2038.

Murray, P. R., E. J. Baron, M. A. Pfaller, F. C. Tenover, and R. H. Tenover. 1999. *Manual of Clinical Microbiology*. 7th ed. American Society for Microbiology, Washington, DC. 1774 p.

Mutsvangwa, T., J. P. Walton, J. C. Plaizier, T. F. Duffield, R. Bagg, P. Dick, G. Vessie, and B. W. McBride. 2002. Effects of a monensin controlled-release capsule or premix on attenuation of subacute ruminal acidosis in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 85: 3454-3461.

Nagaraja, T. G., and M. B. Taylor. 1987. Susceptibility and resistance of ruminal bacteria to antimicrobial feed additives. *Appl. Environ. Microbiol.* 53:1620-1625.

Nagaraja, T. G., T. B. Avery, E. E. Bartley, S. J. Galitzer, and A. D. Dayton. 1981. Prevention of lactic acidosis in cattle by lasalocida or monensin. *J. Anim. Sci.* 53: 206-216.

Nagaraja, T. G., C. J. Newbold, J. Van Nevel and D. I. Demeyer. 1997. Manipulation of ruminal fermentation. In: *The Rumen Microbial Ecosystem* (2a Ed.). Chapman and Hall. pp. 523-632.

NCBI (National Center for Biotechnology Information). 2007. National Library of Medicine National Institutes of Health Building 38A, 8600 Rockville Pike, Bethesda, MD 20894, USA. Disponible en: [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov). (20 May. 2008).

Nocek, J. E., W. P. Kautz, J. A. Z. Leedle, and J. G. Allman. 2000. Altering diurnal pH and in situ digestion in dairy cows with ruminal supplementation of direct-fed microbials (DFM) and yeast. *J. Dairy Sci.* 83(Suppl. 1): 1242. (Absr.)

NRC. 1996. *Nutrient Requirements of Domestic Animals, Nutrient Requirements of Beef Cattle*. 7th ed. National Academia of Science-National Research Council, Washington, D. C. 242 p.



Ogier, J. C., O. Son, A. Gruss, P. Tailliez, and A. Delacroix-Buchet. 2002. Identification of the bacterial microflora in dairy products by temporal temperature gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* Vol 68. No. 8: 3691-3701.

Orpin, C. G., and E. A. Munn. 1974. The occurrence of bacteriophages in the rumen and their influence on rumen bacterial populations. *Experientia.* 30: 1018-1020.

Osmanagaoglu, O., U. Gündüz, Y. Beyatli, C. Cökmüs. 1998. Purification and characterization of pediocin F, a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici* F. *J. of Biology.* 22: 217-228.

Owens, F.N., D.S. Secrist, W.J. Hill and D.R. Gill. 1998. Acidosis in cattle: a review. *J. Anim. Sci.* 76: 275-286.

Pinos, J. M. y S. S. González-Muñoz. 2000. Efectos biológicos y productivos de los ionóforos en rumiantes. *Interciencia.* 25:379-385  
[http://www.interciencia.org/v25\\_08/pinos.pdf](http://www.interciencia.org/v25_08/pinos.pdf). (10 Nov. 2008).

Plengvidhya, V., F. Breidt, Jr., Z. Lu, and H. P. Fleming. 2007. ADN fingerprinting of lactic acid bacteria in sauerkraut fermentations. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 7697-7702.

Richardson, L. F., A. P. Raun, E. I. Potter, C. O. Cooley, and R. P. Rathmacher. 1976. Effects of monensin on rumen fermentation in vitro and in vivo. *J. Anim. Sci.* 3: 657.

Ricke, S. C., L. L. Berger, P. J. Van der Aar, and G. C. Fahey. 1984. Effects of lasalocid and monensin on nutrient digestion, metabolism and rumen characteristic of sheep. *J. Anim. Sci.* 58:194-202.

Riebel, W. J., and J. A. Washington. 1990. Clinical and microbiologic characteristic of pediococci. *J. Clin. Microbiol.* 28: 1348-1355.

Rumpler, W. V., D. E. Johnson, and D. B. Bates. 1986. The effects of high dietary cation concentration on methanogenesis by steers fed diets with without ionofores. *J. Ainm. Sci.* 62: 1737-1741.

Russell, J. B. 1987. Effect of extracellular pH on growth and proton motive force of *Bacteroides succinogenes*, a cellulolytic ruminal bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 2379.

Russell, J. B. 1998. Strategies that ruminal bacteria use to handle excess carbohydrate. *J. Anim. Sci.* 76: 1955-1963.

- Russell, J. B., W. G. Bottje, and M. A. Cotta. 1981. Degradation of protein by mixed cultures of rumen bacteria: identification of *Streptococcus bovis* as an actively proteolytic rumen bacterium. *J. Anim. Sci.* 53: 242-252.
- Russell, J.B., and H. J. Strobel. 1989. Effect of ionophores on ruminal fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 1-6.
- Saitou, N., Imanishi, T. 1989. Relative efficiencies of the Fitch- Margoliash, maximum-parsimony, maximum-likelihood, minimum-evolution, and neighbor-joining methods of phylogenetic tree construction in obtaining the correct tree. *Molec Biol and Evol*, 6: 514 -525.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sarma, P. S., and S. Mohanty. 1998. *Pediococcus acidilactici* pneumonitis and bacteremia in a pregnant woman. *J. Clin. Microbiol.* 36: 2392-2393.
- SAS Institute. 1998. *User's guide: statistics, version 6 editions*. SAS Institute, Inc., Cary, N. C.
- Sauvant, D., S. Giger-Reverdin and P. Schmidely. 2004. Rumen acidosis: modeling ruminant response to yeast culture. *In Nutritional biotechnology in the feed and food industries: Proceeding of alltech's 20 annual symposium* (T.P Lyons and K. A. Jacques, Eds). Nottingham University Press. UK.
- Scandolo, D., M. Noro, H. Böhmwald, P. A. Contreras, and F. Wittwer. 2007. Diurnal variations of ruminal fluid pH and magnesium and potassium concentrations in grazing dairy cows. *Arch. Med. Vet.* 39: 141-146.
- Schelling, G. T. 1984. Monensin mode of action in the rumen. *J. Anim. Sci.* 58: 1518-1527.
- Simpson, P. J., C. Stanton, G. F. Fitzgerald, and R. P. Ross. 2002. Genomic diversity within the genus *Pediococcus* as revealed by randomly amplified polymorphic ADN PCR and pulsed-field gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 765-771.
- Slyter, L. L. 1976. Influence of acidosis on rumen function. *J. Anim. Sci.* 43: 910-929.
- Steel, R. G. D. y J. C. Torrie. 1988. *Bioestadística, principios y procedimientos*. 2ª Edición. Mc Graw-Hill. pp. 179-180.

- Stewart, H. J., and M. P. Bryant. 1988. The rumen bacteria *In*: P. N. Hobson (Ed.) The rumen Microbial Ecosystem. p. 21. Elsevier Science Publishing. New York.
- Stiles, M. E. 1996. Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie Leeuwenhock* 70: 331-345.
- Tankovic, J., R. Leclercq, and J. Duval. 1993. Antimicrobial susceptibility of *Pediococcus* spp. Genetic basis of macrolide resistance in *Pediococcus acidilactici* HM3020. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 37: 789-792.
- Teather, R. M., and R. J. Forster. 1998. Manipulating the rumen microflora with bacteriocins to improve ruminant production. *Can. J. Anim. Sci.* 78(Suppl.):57-69.
- Therion, J. J., A. Kistner, and J. H. Kornelius. 1982. Effect of pH on growth rates of rumen amylolytic and lactolytic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 44: 428-434.
- Thomas, T. D., L. L. McKay, and H. A. Morris. 1985. Lactate metabolism by *Pediococci* isolated from cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* 49: 908-913.
- Torriani, S., M. Vescovo, and F. Dellaglio. 1987. Tracing *Pediococcus acidilactici* in ensiled maize by plasmid-encoded erythromycin resistance. *J. Appl. Bacteriol.* 63: 305-309.
- Tung, R. S., and L. Kung, Jr. 1993. In vitro effects of thiopeptide and monensin on ruminal fermentation of soluble carbohydrates. *J. Dairy Sci.* 76:1083-1090.
- Valadez, E. M. y G. Kahl. 2000. Huellas de ADN en genomas de plantas (Teoria y protocolos de laboratorio). Ed. Mundiprensa. México. 141 pp.
- Van Nevel, C.J., and D. I. Demeyer. 1977. Effect of monensin on rumen metabolism in vitro. *Appl. Environ. Microbiol.* 34: 251-257.
- Wallace, R. J. 1996. Ruminal microbial metabolism of peptides and amino acids. Conference: Altering ruminal nitrogen metabolism to improve protein utilization. *J. Nutr.* 1326S-1335S.
- Wallace, R. J., J. W. Czerkawski, and G. Breckenridge. 1981. Effect of monensin on the fermentation of basal rations in the rumen simulation technique (Rusitec). *Br. J. Nutr.* 46: 131-148.
- Weiss, W.P., and B. A. Amiet. 1990. Effect of lasalocid on performance of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 73: 153-162.

Williams, A.G. and G.S. Coleman. 1992. The rumen protozoa. Brock springer serie in contemporary bioscience. Springer-Verlag, New York Inc. pp. 133-164.

Woods, V. B., A. P. Moloney, S. Calsamiglia, and F. P. O'Mara. 2003. The nutritive value of concentrate feedstuffs for ruminant animals. Part III. Small intestinal digestibility as measured by in vitro or mobile bag techniques. Anim. Feed Sci. Technol. 110: 145-157.

Yokoyama, M. T. y K. A. Johnson. 1993. Microbiología del rumen e Intestino delgado. In: Church, D. C. (Ed). El rumiante, fisiología y nutrición. Editorial Acribia, S. A. Zaragoza, España. pp. 137- 57.

Zarazaga, M., Y. Sa´enz, A. Portillo, C. Tenorio, F. Ruiz-Larrea, R. Del Campo, F. Baquero, and C. Torres. 1999. In vitro activities of ketolide HMR3647, macrolides, and other antibiotics against *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, and *Pediococcus* isolates. Antimicrob. Agents Chemother. 43: 3039-3041.

Zinn, R. A., and J. L. Borques. 1993. Influence of sodium bicarbonate and monensin on utilization of a fat-supplemented high-energy growing-finishing diet by feedlot steers. J. Anim. Sci. 71: 18-25.