



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

GANADERÍA

**EVALUACIÓN DE ADITIVOS MICROBIANOS
PARA REDUCIR ACIDOSIS LÁCTICA
PRODUCIDA POR *Pediococcus acidilactici***

DIEGO FELIPE PORTELA DÍAZ

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

MONTECILLOS, TEXCOCO, EDO DE MÉXICO

2018

CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y DE LAS REGALIAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACION

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, el que suscribe Diego Felipe Portela Díaz, Alumno (a) de esta Institución, estoy de acuerdo en ser participe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta institución, bajo la dirección del Profesor Dr. Mario A. Cobos Peralta, por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis Evaluación de aditivos microbianos para reducir acidosis láctica producida por *Pediococcus acidilactici* y de los producto de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos industriales que se puedan derivar serán registrados a nombre el colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, El Consejero o Director de Tesis y el que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta Institución.

Montecillo, Mpio. de Texcoco, Edo. de México, a 25 de mayo de 2018



Firma del
Alumno (a)



Mario A. Cobos Peralta

Vo. Bo. del Consejero o Director de Tesis

La presente tesis titulada: **Evaluación de aditivos microbianos para reducir acidosis láctica producida por *Pediococcus acidilactici***, realizada por el alumno: **Diego Felipe Portela Díaz** 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

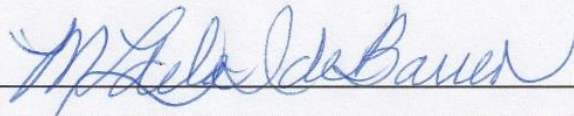
CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



DR. MARIO ANTONIO COBOS PERALTA

ASESORA



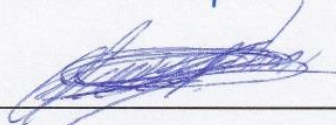
DRA. MARIA DE LOURDES DE LA ISLA SERRANO

ASESOR



DR. SERGIO SEGUNDO GONZÁLEZ MUÑOZ

ASESOR



DR. JAVIER PILONI MARTINI

ASESOR



DR. DAVID ESPINOSA VICTORIA

Montecillo, Texcoco, Estado de México, mayo de 2018.

Evaluación de aditivos microbianos para reducir acidosis láctica producida por *Pediococcus acidilactici*

Diego Felipe Portela Díaz, D. en C.
Colegio de Postgraduados, 2018

RESUMEN

Las bacterias ruminales amilolíticas producen ácido láctico cuando hay abundancia de carbohidratos de fácil fermentación. La acumulación de este ácido en el rumen, puede producir una acidosis ruminal subaguda (ARS). La ARS se presenta por un desequilibrio entre bacterias productoras y consumidoras de ácido láctico. Se aisló una bacteria productora de ácido láctico (BAL) del rumen de una vaca con cánula ruminal. Después de amplificar y secuenciar la región 16S rARN, se identificó como *P. acidilactici* KR935885 (GenBank accession number). Posteriormente, se evaluó la capacidad de tres aditivos microbianos, Probios Precise[®], P-one, y DCP[™] para evitar una acidosis láctica inducida por la inoculación de *Pediococcus acidilactici*. La inoculación de *P. acidilactici* en un medio de cultivo a base de GCA-FR, disminuyó el pH de 7.3 a 6.4 ($p \geq 0.05$) y aumentó la concentración de ácido láctico de 0.0 a 10.4 mM L⁻¹ ($p \leq 0.05$) después de 6 h de incubación, y la concentración de bacterias ácido lácticas (BAL) aumentó de 4.48x10¹⁰ a 2.79x10¹³ mL⁻¹, sin diferencia entre tratamientos ($p \geq 0.05$). El pH tuvo una correlación negativa con la concentración de ácido láctico y de bacterias ruminales totales. Se concluye que a la dosis usada, los tres aditivos microbianos no tienen capacidad para evitar la acidosis causada por *P. acidilactici*.

Palabras clave: Ácido láctico, aditivos microbianos, bacterias ácido lácticas.

**Evaluation of microbial aditives to reduce lactic acidosis produced by
*Pediococcus acidilactici***

Felipe Portela Díaz, D. en C.

Colegio de Postgraduados, 2018

ABSTRACT

The rumen amyolytic bacteria produce lactic acid when there is an abundance of easily fermented carbohydrates. The accumulation of this acid in the rumen, can produce a subacute ruminal acidosis (SARA). SARA is presented by an imbalance between bacteria producing and consuming lactic acid. A lactic acid-producing bacterium (BAL) was isolated from the rumen of a rumen cannulated cow. After amplification and sequencing of the 16S rRNA region this bacterium was classified as *P. acidilactici* KR935885 (GenBank accession number). Subsequently, the ability of three microbial additives, Probios Precise®, P-one, and DCPTM was evaluated to prevent a lactic acidosis induced by the inoculation of *P. acidilactici*. The inoculation of *P. acidilactici* in a culture medium based on GCA-FR, decreased the pH from 7.3 to 6.4 ($p \geq 0.05$) and increased the concentration of lactic acid from 0.0 to 10.4 mM L⁻¹ ($p \leq 0.05$) after 6 h of incubation; and the concentration of BAL, increased from 4.48x10¹⁰ to 2.79x10¹³ mL⁻¹, with no difference among treatments ($p \geq 0.05$). The pH had a negative correlation with the concentration of lactic acid and total ruminal bacteria. It is concluded that at the dose used, the three microbial additives have no capacity to prevent acidosis caused by *P. acidilactici*.

Key words: Lactic acid, microbial additives, lactic acid bacteria.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por bendecirme con esta gran oportunidad de conocer buenas personas y vivir situaciones que contribuyeron en mi crecimiento personal y profesional.

Al pueblo Mexicano y en su representación al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo económico otorgado durante mis estudios e investigación durante el Doctorado.

A la comunidad del Colegio de Postgraduados porque como institución de investigación pública, compartió los espacios y el personal requerido para el desarrollo de la presente investigación.

A mi Consejo Particular: Dr. Mario Antonio Cobos Peralta, por brindarme el conocimiento y la orientación durante la investigación, compartiendo su amplia experiencia en el interesante tema de la Microbiología Ruminal. Al Dr. Javier Piloni Martini, por su atención y participación oportuna durante el tiempo en que se desarrolló esta investigación. Al Dr. David Espinosa Victoria por sus aportes fundamentales para la culminación de este trabajo. Al Dr. Sergio Segundo González Muñoz por sus precisas observaciones durante el desarrollo de la presente investigación.

A la Dra. María de Lourdes de la Isla de Bauer, por su valioso ejemplo como investigadora y persona comprometida con el desarrollo de la ciencia en pro del bien común.

A mis amigas y amigos, con quienes compartí y coincidí en momentos gratos y difíciles de mi vida como estudiante de posgrado.

DEDICATORIA

A mis padres, Orlando Portela Córdoba (Q.E.P.D) y Martha Cecilia Díaz Rivera, quienes siempre confiaron en mí y con su esfuerzo y dedicación facilitaron el cumplimiento de esta meta.

A mi hijo Daniel Alejandro Portela Patiño, como muestra de superación y lucha constante por lograr nuestros sueños y construirnos día a día como mejores personas. Te amo.

A mis hermanas Angélica Portela y Vanessa Portela, quienes me apoyaron en mis decisiones, motivándome a continuar a dar este importante paso en mi proceso de formación.

A mis abuelos Antonio María Díaz y María Dolores Rivera de Díaz, quienes me han acompañado en los momentos representativos de mi vida personal y académica.

A mis paisanos con quienes compartí buenos momentos durante mi estancia.

CONTENIDO

RESUMEN	iv
ABSTRACT	v
LISTA DE CUADROS	xi
LISTA DE IMÁGENES Y FIGURAS	xiii
INTRODUCCIÓN GENERAL	1
OBJETIVOS E HIPÓTESIS	8
Objetivo General.....	8
Objetivos Particulares.....	8
Hipótesis particulares	8
CAPITULO I. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA, FERMENTATIVA Y MOLECULAR DE LA BACTERIA RUMINAL <i>Pediococcus acidilactici</i>	10
1.1 RESUMEN.....	10
1.2 INTRODUCCIÓN	11
1.3 MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
1.3.1. Ubicación geográfica del estudio	12
1.3.2. Aislamiento de <i>Pediococcus acidilactici</i> a partir de líquido ruminal	12
1.3.3. Conservación del cultivo de <i>Pediococcus acidilactici</i> , prueba de viabilidad y curva de crecimiento.....	13
1.3.4. Caracterización molecular de <i>P acidilactici</i>	16
1.3.5. Caracterización fermentativa de <i>P. acidilactici</i>	17
1.3.6 Diseño y análisis estadístico.....	19
1.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	20
1.5 CONCLUSIONES	29
1.6 LITERATURA CITADA.....	29
CAPITULO II. PRODUCCIÓN <i>IN VITRO</i> DE ÁCIDO LÁCTICO EN MEDIOS DE CULTIVO CON GLUCOSA Y DIETA ALTA EN GRANOS	36
2.1. RESUMEN	36
2.2 INTRODUCCIÓN	37
2.3 MATERIALES Y MÉTODOS.....	38

2.3.1. Ubicación geográfica del estudio	38
2.3.2. Medios de cultivo con sustratos energéticos	38
2.3.10 Diseño y análisis estadístico.....	41
2.4 RESULTADOS y DISCUSIÓN	41
2.6 CONCLUSIONES	45
2.7 LITERATURA CITADA.....	45
EFFECTO <i>IN VITRO</i> DE ADITIVOS MICROBIANOS PARA REDUCIR LA ACIDOSIS LÁCTICA.....	49
3.1 RESUMEN	49
3.2 INTRODUCCIÓN	51
3.3 MATERIALES Y METODOS.....	52
3.3.1. Ubicación geográfica del estudio	52
3.3.2. Medio de cultivo anaerobio con dieta alta en granos (DAG-FR).....	52
3.3.5. Evaluación de variables microbiológicas	55
3.3.7. Degradación <i>in vitro</i> de la materia seca (%DEGMS) de la dieta alta en granos.....	57
3.3.8 DISEÑO Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	58
3.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	58
3.5 CONCLUSIONES	66
3.7 LITERATURA CITADA.....	66
CAPITULO IV. EFFECTO <i>IN VITRO</i> DE ADITIVOS MICROBIANOS PARA REDUCIR LA ACIDOSIS LÁCTICA PRODUCIDA POR <i>Pediococcus acidilactici</i>	73
4.1 RESUMEN	73
ABSTRACT.....	74
4.2 INTRODUCCIÓN	75
4.3 MATERIALES Y METODOS.....	76
4.3.1 Ubicación geográfica del estudio	76
4.3.2 Medio de cultivo DAG-FR	76
4.3.3. Preparación del inóculo de la bacteria <i>P. acidilactici</i>	77
4.3.4 Evaluación de Variables fermentativas	78
4.3.6 Diseño experimental	81

4.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	81
4.5 CONCLUSIONES	87
4.6 LITERATURA CITADA.....	87

LISTA DE CUADROS

Titulo	pag
Cuadro 1.1 Composición de los medios de cultivo evaluados para el aislamiento de las bacterias ruminales asociadas a la acidosis.	15
Cuadro 1.2. Medio anaerobio (GCA-FR) usado para el crecimiento de la bacteria <i>P. acidilactici</i> .	16
Cuadro 1.3 Bacterias ácido lácticas aisladas del rumen con secuencias parciales de la región 16S rARN usadas para el análisis de evolución desarrollado con el programa MEGA 6.	18
Cuadro 1.4 Composición de la dieta alta en granos.	19
Cuadro 1.5 pH, potencial de óxido reducción (Eh, RevmV) y bacterias ruminales totales (BRT, 10 ⁹ /mL) inicial (0h) y final (72h) de los tubos de cultivo con medio Estreptosel inoculados con líquido ruminal, después de cada transferencia.	21
Cuadro 1.6 Promedio de UFC/g de material liofilizado y NMP de los dos tipos de liofilización comparados.	25
Cuadro 1.7 Concentración de bacterias totales (BT) pH, ácido láctico, AGV a 0, 3, 4, 5 y 6 h de incubación.	27
Cuadro 2.1 Medios anaerobios GCA – FR + 0.5% y DAG-FR.	39
Cuadro 2.2 Composición de la dieta alta en granos	39
Cuadro 2.3 Concentraciones (µg/mL) de ácido láctico conocidas y su respectivo valor de absorbancia.	42
Cuadro 2.4. Producción de ácido láctico (mmol/L ⁻¹) y pH en medios de cultivo con glucosa al 0.5% y medios con fluido ruminal y 0.2 g de dieta alta en granos (DAG-FR) durante los diferentes tiempos (h) de incubación.	44
Cuadro 2.5 Coeficientes de correlación entre pH y ácido láctico (mmol/L).	44
Cuadro 3.1 Composición de la dieta alta en granos (DAG)	53
Cuadro 3.2 Medio anaerobio DAG-FR (Hungate, 1950; Cobos <i>et al.</i> , 2007)	54
Cuadro 3.3. Componentes del medio de cultivo Agar MRS.	56

Cuadro 3.4. Producción de pH, ácido láctico, ácidos grasos volátiles (AGV; mM L ⁻¹) y concentración total de bacterias ruminales (BRT) en los tratamientos evaluados, durante 0, 3, 4,5 y 6 h de incubación a 39°C.	60
Cuadro 3.5. Coeficientes de correlación entre las variables fermentativas y microbiológicas en los factores evaluados.	62
Cuadro 3.6 Número más probable (NMP) de bacterias ruminales ácido lácticas (BAL) presentes en los tratamientos evaluados.	63
Cuadro 3.7 Degradación <i>in vitro</i> de la materia seca en los tratamientos evaluados a 0, 24, 48, y 72 horas de incubación a 39°C.	64
Cuadro 4.1 Composición de la dieta alta en granos (DAG)	75
Cuadro 4.2 Medios anaerobios con DAG-FR (Hungate, 1950; Cobos <i>et al.</i> , 2007)	76
Cuadro 4.3. Componentes del medio de cultivo Agar MRS (Difco®, EUA).	77
Cuadro 4.4 Producción de pH, ácido láctico, ácidos grasos volátiles (AGV; mM L ⁻¹) y concentración total de bacterias ruminales (BRT) en durante 0, 3, 4,5 y 6h de incubación a 39°C.	83
Cuadro 4.5 Coeficientes de correlación entre las variables fermentativas y microbiológicas.	84
Cuadro 4.6 Número más probable (NMP) de bacterias ácido lácticas (BAL) a las 72h de incubación, durante 0h, 3h y 6h de experimento.	85

LISTA DE IMÁGENES Y FIGURAS

Titulo	pag
Imagen 1.1 a, b y c son muestras a las 72 h de incubación.	21
Imagen 1.2 a, b y c son muestras a 72h de incubación durante la transferencia 1. d, e y f son muestras a 72h de incubación durante la transferencia 2. g, h i son muestras a 72h de incubación durante la transferencia 3.	22
Imagen 1.3 Crecimiento de colonias en medio sólido Estreptosel a las 48 horas de incubación.	22
Imagen 1.4 Crecimiento de colonias en medio sólido M modificado a las 48 horas de incubación	23
Imagen 1.5 Crecimiento de colonias en medio sólido Sangre azida a las 48 horas de incubación.	31
Imagen 1.6 Bacterias con tinción Gram positiva procedentes de medio sólido de Estreptosel.	23
Figura 1.1 Curva de crecimiento de la bacteria de <i>P. acidilactici</i> durante 24 h de incubación en medio de cultivo GCA-FR+0.5 %.	26
Figura 1.2 Árbol filogenético de la bacteria aislada <i>P. acidilactici</i> KR935885.1 por el método de Máxima Parsimonia y algoritmo heurístico de intercambio de ramas, poda de un subárbol y pegado.	28
Figura 2.1. Curva estándar para medir ácido láctico con un coeficiente de correlación del 0.99 (Taylor. 1996; Madrid <i>et al.</i> , 1999).	42

INTRODUCCIÓN GENERAL

El género *Pediococcus*, comprende un grupo de bacterias ácido lácticas que favorece el equilibrio intestinal de personas sanas de microorganismos nativos benéficos (Lessard *et al.*, 2009). Las bacterias de este género son Gram positivas, anaerobias facultativas y pueden usar inulina para su crecimiento (Koruri *et al.*, 2015). Dentro de este género, sobresale la especie *P. acidilactici*, por uso como probiótico en la alimentación animal (Czerucka y Rampal, 2002). Esta bacteria se ha aislado del rumen de borregos con acidosis ruminal y puede favorecer la fermentación ácido láctica (Cobos *et al.*, 2011). Otra cepa ruminal identificada como *Pediococcus acidilactici* AGR20, produce D-lactato, L-lactato y NH₃ a partir de la glucosa y arginina (Morvan y Joblin, 1999).

En rumiantes sanos, las bacterias ruminales amilolíticas como *Prevotella ruminicola*, *Bacteroides amylophilus*, *Succinomonas amyloplitica* y *Streptococcus bovis* fermentan carbohidratos solubles presentes en granos en ácidos grasos volátiles (Yokoyama y Johnson, 1988), pero cuando hay un exceso de carbohidratos de fácil fermentación, proliferan las bacterias ácido lácticas, como *S. bovis*, y se incrementa la fermentación láctica y la producción de D-lactato (Tung y Kung, 1993). El ácido láctico, disminuye el pH ruminal a valores de 5.0 y 5.5; (Slyter, 1976; Harmon *et al.*, 1985; Liu *et al.*, 2013) y origina la acidosis ruminal subaguda (ARS). En dietas a base de forrajes (p. ej. 70 % de la MS de la dieta), la concentración de lactato en rumen es $\leq 7 \text{ mM L}^{-1}$; por lo contrario, en dietas altas en granos (p. ej. 80% de la MS), la concentración del ácido láctico puede llegar a 100 mM L^{-1} ocasionando acidosis ruminal (Owens *et al.*, 1998). El desequilibrio entre la alta producción de ácido láctico y su lenta salida del rumen causa el descenso

del pH por debajo del valor fisiológico ruminal óptimo para animales sanos (6.8; Calsamiglia *et al.*, 2012).

La acidosis ruminal, es una enfermedad metabólica que ocasiona otras enfermedades como laminitis, poliencefalomalacia, ruminitis, abscesos hepáticos, síndrome de no consumo, síndrome de mala absorción e infecciones clostridiales (Britton, 1991). Esta enfermedad afecta a un 20-40% de los animales en hatos lecheros de alta producción (Calsamiglia *et al.*, 2012).

Experimentalmente, se ha demostrado que la adición de enzimas o de bacterias productoras de lactato deshidrogenasa (LDH) reduce la acumulación de ácido láctico *in vitro* y pueden prevenir la acidosis ruminal (Sunga *et al.*, 2004). La bacteria *Megasphaera elsdenii* es una bacteria consumidora de ácido láctico que posee las enzimas D y L lactato deshidrogenasa (Hino y Kuroda, 1993). Bajo las condiciones inducidas de acidosis, usando un medio de cultivo con 50% almidón soluble, 21% glucosa, 6% celulosa, 7% celobiosa, y 16% tripticasa, se demostró que la especie *M. elsdenii* H6F32 tiene la capacidad de subir el pH ruminal de 5.42 a 6.24 y disminuir la concentración de ácido láctico a 2.30 mM L⁻¹ en 18 h de incubación (Long *et al.*, 2014). La bacteria *Selenomonas ruminantium* 5934e, fermenta glucosa y produce ácido láctico, sin embargo, cuando hay una alta concentración de lactato en el medio, produce la enzima lactato deshidrogenasas (LDH), que le permite para usar D y L-lactato como sustrato (Gilmour *et al.*, 1994). Bacterias ruminales como *Megasphaera elsdenii* y *Streptococcus bovis* son ácido tolerantes, ya que poseen una alta actividad de la enzima H⁺-ATPasa, con una actividad de 1.92 ± 0.09 y 2.45 ± 0.11 ($\mu\text{mol de Pi} \cdot \text{min}^{-1} \text{ mg de N}^{-1}$)^a en pH ácidos de 4.7 y 5.3 respectivamente (Miwa *et al.*, 1993).

Para el control de la acidosis ruminal subaguda (ARS) se han utilizado diferentes compuestos como los amortiguadores bicarbonato de sodio, 75g kg⁻¹ MS, carbonato de calcio, 100g Kg⁻¹ MS, y bentonita de sodio, 100g Kg⁻¹ MS de la dieta (Britton, 1991). Los ionóforos monensina y lasalocida en dosis de 40 y 30 ppm Kg⁻¹ MS (respectivamente), logran reducir la concentración de ácido láctico a 2.83 mM L⁻¹. La monensina, también se usa en la dieta para vaquillas a una dosis de 28 mg a 44 mg Kg⁻¹ MS (Yang *et al.*, 2014). Los ionóforos son usados para inhibir el crecimiento de *S. bovis* (Russell y Strobel, 1989; Schwingel *et al.*, 1989), por tanto, para inhibir la producción de ácido láctico en rumen (Cotta y Whitehead, 1993). Otros compuestos usados para evitar la ARS en dietas para vacas lecheras son: la cal, 3.7g Kg⁻¹ MS, y el esqueleto calcificado del alga roja *Lithothamnion calcareum*, 4g Kg⁻¹ MS (Cruywagen *et al.*, 2014). Experimentalmente, se ha evaluado estimular la generación de anticuerpos específicos contra *S. bovis* (Gill *et al.*, 2000) y la administración de anticuerpos policlonales para la prevención de ARS en terneras, durante la transición alimenticia a una dieta alta en concentrado (Blanch *et al.*, 2009)

Algunos productos comerciales a base de *Saccharomyces cerevisiae* también se han evaluado para reducir la ARS y mejorar la producción de leche en vacas Holstein (Ayala *et al.*, 2003). La forma de acción de las levaduras viables y su medio de cultivo para controlar la acidosis ruminal, todavía no se ha conoce con exactitud, pero se estima que su eficacia depende de la adaptación de las levaduras al ambiente ruminal y al pH ácido que se establece durante la ARS (Lettat *et al.*, 2012). Experimentalmente, se ha evaluado a la bacteria ruminal *Megasphaera elsdenii* para el tratamiento de ARS. Esta bacteria es ácido tolerante y tiene la capacidad de transformar el ácido láctico en propionato, además

compite con *S. bovis* por sustratos como glucosa y maltosa (Aikman *et al.*, 2011). También se ha experimentado con la bacteria *Enterococcus faecium* EF212, sin embargo, esta bacteria tiene una eficacia limitada para transformar el ácido láctico en propionato, en la reducción de la acidosis ruminal y el pH ruminal se mantiene entre valores de 5.6 y 6.0 (Chiquette, 2009; Beauchemin *et al.*, 2003). En comparación con la cepa *Prevotella bryantii* 25A, la bacteria *E. faecium* EF212 evita en un 71% del descenso del pH por debajo de 6.0 (Chiquette *et al.*, 2012).

LITERATURA CITADA

- Aikman P. C., Henning P. H., Humphries D. J., and Horn C. H. 2011. Rumen pH and fermentation characteristics in dairy cows supplemented with *Megasphaera elsdenii* NCIMB 41125 in early lactation. *Journal of Dairy Science*. 94:2840-2849.
- Ayala, O. J., S. C. Apodaca, S. R. Rangel, M. J. Armendariz, V. A. Gomez y L. L. Carreño. 2003. Adición de *Sacharomyces cerevisiae* o lasalocida a dietas de pre y post parto en vacas Holstein. In: XXVII Congreso Nacional de Buiatria. Villahermosa, Tabasco, 12 al 14 de junio de 2003.
- Beauchemin K. A., Yang W. Z., Morgavi D. P., Ghorbani G. R., and Kautz W. and Leedle J. A. Z. 2003. Effects of bacterial direct-fed microbials and yeast on site and extent of digestion, blood chemistry, and subclinical ruminal acidosis in feedlot cattle. *Journal of Animal Science*. 81:1628-1640.
- Blanch, M.; Calsamiglia, S., DiLorenzo, N.; DiCostanzo, A.; Muetzel, S.; Wallace, R.J. 2009. Physiological changes in rumen fermentation during acidosis induction and its control using a multivalent polyclonal antibody preparation in heifers. *Journal of Animal Science*. 87 (5):1722-1730.
- Britton, R. A. 1991. D-Lactic Acidosis, myth or fact. Animal Science Department, University of Nebraska-Lincoln. Ed. Elanco Products Company.

- Calsamiglia, S., Blanch M., Ferret A., Moya D. 2012. Is subacute ruminal acidosis a pH related problem? Causes and tools for its control. *Animal Feed Science and Technology*. 172:42- 50
- Chiquette J., Allison M.J. and Rasmussen M. 2012. Use of *Prevotella bryantii* 25A and a commercial probiotic during subacute acidosis challenge in midlactation dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 95:5985-5995.
- Chiquette J. 2009. Evaluation of the protective effect of probiotics fed to dairy cows during a subacute ruminal acidosis challenge. *Animal Feed Science and Technology*. 153: 278-291.
- Cobos M.A., Ley de Coss A., Ramirez N.D., Gonzalez S.S., Ferrera Cerrato R. 2011. *Pediococcus acidilactici* isolated from the rumen of lambs with rumen acidosis, 16S rRNA identification and sensibility to monensin and lasalocid. *Research in Veterinary Science*. 90:26-30.
- Cobos-Peralta M.A., E. Guerra-Medina, S. J. López-Garrido, J. L. Báez-Pérez, S. S. González-Muñoz, G. D. Mendoza-Martínez. 2008. Evaluación *in vitro* de dos amortiguadores y un ionóforo sobre variables fermentativas y microbiológicas. *Agrociencia*. 39 (1):1-9.
- Cotta, M. A. and T. R. Whitehead. 1993. Regulation and cloning of the gene encoding amylase activity of the ruminal bacterium *Streptococcus bovis*. *Applied and Environmental Microbiology*. 59:189-196.
- Cruywagen C. W., Taylor S., Beya M. M., and Calitz T. 2014. The effect of buffering dairy cow diets with limestone, calcareous marine algae, or sodium bicarbonate on ruminal pH profiles, production responses, and rumen fermentation. *Journal of Dairy Science*. 98:5506-5514.
- Czerucka D, Rampal P. 2002. Experimental effects of *Saccharomyces boulardii* on diarrheal pathogens. *Microbes and Infection*. 4:733-739.
- Gill, H. S., Q. Shu and R. A. Leng. 2000. Immunization with *Streptococcus bovis* protects against lactic acidosis in sheep. *Vaccine*. 18:2541-2548.
- Gilmour M., Flint H. J. and Mitchell W. J. 1994. Multiple lactate dehydrogenase activities of the rumen bacterium *Selenomonas ruminantium*. *Microbiology*. 140:2077-2084.

- Harmon, D. L., R. A. Britton, R. L. Prior, and R. A. Stock. 1985. Net portal absorption of lactate in volatile fatty acids in steers experiencing glucose induced acidosis or fatty 70% concentrate diet ad libitum. *Journal of Animal Science*. 60:560-569.
- Hino T. and Kuroda S. 1993. Presence of lactate dehydrogenase and lactate racemase in *Megasphaera elsdenii* grown on glucose or lactate. *Applied and Environmental Microbiology*. 59 (1): 255-259.
- Koruri S.S., Chowdhury R. Bhattacharya P. 2015. Analysis of cell growth dynamics of *Pediococcus acidilactici* in the presence of inulin in an optimized microenvironment. *Archives of Microbiology*. 197:955-963.
- Lessard, M., Dupuis, M., Gagnon, N., Nadeau, É., Matte, J.J., Goulet, J., Fairbrother, J.M., 2009. Administration of *Pediococcus acidilactici* or *Saccharomyces cerevisiae boulardii* modulates development of porcine mucosal immunity and reduces intestinal bacterial translocation after *Escherichia coli* challenge. *Journal of Animal Science*. 87:922-934.
- Lettat, A.; Noziere, P.; Silberberg, M.; Morgavi, D.P.; Berger, C., Claudette; M.C. 2012. Rumen microbial and fermentation characteristics are affected differently by bacterial probiotic supplementation during induced lactic and subacute acidosis in sheep. *BMC Microbiology*. 12 (142):20-34.
- Liu, D., Zhou, X. L., Zhao, P.T., Gao, M., Han, H.G., Hu, H.L. 2013. Effects of increasing non-fiber carbohydrate to neutral detergent fiber ratio on rumen fermentation and microbiota in goats. *Journal of Integrative Agriculture*. 12 (2):319-326
- Long M., Feng W.J., Li P., Zhang Y., He R.X., Yu L.H., He J.B., Jing W.Y., Li Y.M., Wang Z., and Liu G.W. 2014. Effects of the acid-tolerant engineered bacterial strain *Megasphaera elsdenii* H6F32 on ruminal pH and the lactic acid concentration of simulated rumen acidosis *in vitro*. *Research in Veterinary Science*. 96:28-29.
- Miwa T., Esaki H., Umemori J., and Hino T. 1997. Activity of H⁺-ATPase in ruminal bacteria with special reference to acid tolerance. *Applied and Environmental Microbiology*. 63 (6):2155-2158.
- Morvan B. and Joblin K. N. 1999. Hydration of oleic acid by *Enterococcus gallinarum*, *Pediococcus acidilactici* and *Lactobacillus sp.* isolated from the rumen. *Anaerobe*. 5:605- 611.

- Owens, F. N., D. S. Secrist, W. J. Hill, and D. R. Gill. 1998. Acidosis in cattle: A review. *Journal of Animal Science* 76:275-286.
- Russell, J. B., and H. J. Strobel. 1989. Effect of ionophores on ruminal fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*. 55:1-6.
- Schwingel, W. R., D. B. Bates, S. C. Denham, and D. K. Beede. 1989. Lasalocid-catalyzed proton conductance in *Streptococcus bovis* as affected by extracellular potassium. *Applied and Environmental Microbiology*. 55:259-260.
- Slyter, L. L. 1976. Influence of acidosis on rumen function. *Journal of Animal Science* 43:910-929.
- Sunga H.G., Baea H.D., Lee J.H., Kimb D.K., and Shina H.T. 2004. Application of LDH-enzyme and viable LDH-producing bacteria to prevent lactate accumulation during *in vitro* rumen fermentation. *Animal Feed Science and Technology*. 117:235-243.
- Tung, R. S., and L. Kung. 1993. *In vitro* effects of a thiopeptide and monensin on ruminal fermentation of soluble carbohydrates. *Journal of Dairy Science* 73:1083-1090.
- Yang W. Z., Xu L., Zhao Y. L., Chen L. Y., and McAllister T. A. 2014. Impact of hard vs. soft wheat and monensin level on rumen acidosis in feedlot heifers. *Journal of Animal Science* 92:5088-5098.
- Yokoyama, M. T., y K. A. Jhonson. 1988. Microbiología del rumen e intestino delgado. In: *El rumiante, Fisiología Digestiva y Nutrición*. Church, D. C. (ed). Acribia, Zaragoza, España. pp. 137-157.

OBJETIVOS E HIPÓTESIS

Objetivo General

Aislar a partir de muestras de contenido ruminal una bacteria ácido láctica y evaluar *in vitro* tres aditivos microbianos para reducir la acidosis láctica producida por *Pediococcus acidilactici*.

Objetivos Particulares

Aislar y caracterizar microbiológica, fermentativa y molecularmente la bacteria ácido láctica *Pediococcus acidilactici*.

Evaluar diferentes sustratos energéticos que estimulan una fermentación láctica y la acidificación de un medio de cultivo inoculado con bacterias ruminales.

Evaluar el efecto de tres aditivos microbianos comerciales en cuanto a su capacidad para reducir la acidosis en medios de cultivo inoculados con fluido ruminal.

Evaluar el efecto de aditivos microbianos para reducir la acidosis en medios de cultivo inoculados con *Pediococcus acidilactici*.

Hipótesis particulares

- La bacteria *P. acidilactici* tiene la capacidad de disminuir el pH y producir ácido láctico a partir de la fermentación de una dieta alta en granos.
- Los aditivos microbianos reducen la producción de ácido láctico y la acidificación en medios de cultivo inoculados con bacterias ruminales totales.

- Los aditivos microbianos reducen la producción de ácido láctico y la acidificación en medios de cultivo inoculados con *P. acidilactici*.

CAPITULO I. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA, FERMENTATIVA Y MOLECULAR DE LA BACTERIA RUMINAL *Pediococcus acidilactici*

1.1 RESUMEN

La adición de 0.4% de carbón activado en el medio de cultivo Estreptosel, mejora ($p \leq 0,05$) la viabilidad de *Pediococcus acidilactici* (3.5×10^{12} UFC mL⁻¹). A las 6 h de incubación, disminuyó el pH a (6.4, $p \leq 0,05$) y aumentó la concentración de ácido láctico a 10.4 mMol L⁻¹ ($p \leq 0.05$) y de bacterias ácido lácticas (BAL) a 7.50×10^{11} mL⁻¹ ($p \leq 0.05$). Se amplificó y secuenció la región 16S rARN de *P. acidilactici* aislada y se registró en el GenBank con el Locus KR935885. Se realizó el análisis bioinformático con el programa MEGA versión 6.06 y secuencias parciales de BAL ruminales. *P. acidilactici* presentó 1201 sitios conservados con bacterias de su misma especie, 631 sitios conservados con *L. plantarum* y 447 sitios conservados con *S. bovis*. Se concluye que, la bacteria ruminal aislada, tiene un parentesco muy lejano con *S. bovis*, sin embargo, tiene la capacidad de producir ácido láctico a partir de la fermentación de una dieta alta en cereales y puede estar relacionada con la acidosis ruminal subaguda (ARS).

Palabras claves: *P. acidilactici*, rumen, lactato ruminal, carbón activado, acidosis.

ABSTRACT

The addition of 0.4% activated charcoal into the Estreptosel culture medium improves ($p \leq 0.05$) the viability of *Pediococcus acidilactici* (3.5×10^{12} CFU mL⁻¹). At 6 h of incubation, the pH decreased to 6.4 ($p \leq 0.05$). In contrast, the concentration of lactic acid and lactic acid bacteria increased (10.4 mMol L⁻¹ and 7.50×10^{11} mL⁻¹, respectively; $p \leq 0.05$). The 16S rARN region of *P. acidilactici* was amplified and sequenced and

registered in the GenBank with Locus KR935885. The bioinformatic analysis was performed with the program MEGA version 6.06 and partial sequences of ruminal-BAL. *P. acidilactici* have 1201 conserved sites with bacteria of the same species, 631 sites conserved with *L. plantarum*, and 447 sites conserved with *S. bovis*. It is concluded that the isolated ruminal BAL have a very distant relationship with *S. bovis*, however, it has the capacity to produce lactic acid from the fermentation of a diet high in cereals and may be related to subacute ruminal acidosis (SRA).

Key words: *P. acidilactici*, rumen, ruminal lactate, activated charcoal, acidosis

1.2 INTRODUCCIÓN

La acidosis ruminal subclínica (ARS) es una enfermedad metabólica que afecta al ganado lechero y de engorda alimentado con dietas altas en carbohidratos de fácil fermentación (Dunlop y Hammond, 1965; Telle y Preston, 1971; Fernando *et al.*, 2010). A nivel mundial, el ARS afecta entre 20% a 40% de las vacas lecheras de alta producción (Calsamiglia *et al.*, 2012). En México, se estimó una incidencia del 71% de ARS en 66 establos lecheros de la Comarca Lagunera (Hernández *et al.*, 2008). Se estima que la ARS causa una reducción de al menos 10% en la ganancia de peso o en la producción de leche (Schwartzkopf-Genswein *et al.*, 2003).

Durante la fermentación ruminal de carbohidratos de fácil fermentación proliferan las bacterias ácido lácticas (BAL). *Pediococcus acidilactici* pertenece al grupo de BAL y se ha aislado en el rumen de borregos con acidosis ruminal (Cobos *et al.*, 2011). *P. acidilactici*, es una bacteria Gram positiva, crece como cocos o en tétradas, y produce D-lactato y L-lactato a partir de la fermentación de glucosa (Morvan y Joblin, 2000). A pesar

de estar asociada con la ARS, *P. acidilactici* y otras BAL, como *Enterococcus faecium* y *Lactobacillus mucosae*, se usan experimentalmente, como probióticos en rumiantes durante la adaptación a dietas altas en granos y a la presencia de ácido láctico en el rumen (Ghorbani *et al.*, 2002; Weinberg *et al.*, 2003; Beauchemin *et al.*, 2006; Jiao *et al.*, 2017). El objetivo de esta investigación, fue aislar a partir de muestras de contenido ruminal a la bacteria *P. acidilactici* en un medio de cultivo selectivo. Además, caracterizar microbiológica, fermentativa y molecularmente a esta bacteria.

1.3 MATERIALES Y MÉTODOS

1.3.1. Ubicación geográfica del estudio

El estudio se realizó en el Laboratorio de Microbiología Ruminal y Genética Microbiana, del Programa de Ganadería del Colegio de Postgraduados.

1.3.2. Aislamiento de *Pediococcus acidilactici* a partir de líquido ruminal

Una vaca Jersey con fistula ruminal, se usó para la extracción de líquido ruminal (LR), de acuerdo con el protocolo aprobado por el Comité de Cuidado Animal del Programa de Ganadería del Colegio de Postgraduados. El LR fue filtrado en papel Whatman N°541 (90 mm Ø; Whatman™; Yanke y Cheng, 1998) bajo flujo de bióxido de carbono. Para el cultivo y aislamiento de la bacteria ácido láctica se evaluaron cuatro medios selectivos (Cuadro 1.1): Agar M Modificado (Sigma-Aldrich®), Agar sangre con azida (Sigma-Aldrich®), Agar Estreptosel, y el medio líquido BD-Bioxon®. Se depositaron 15 mL de los medios de cultivo sólidos en cajas de Petri y se incubaron 39°C por 72 h, para comprobar su esterilidad.

Para el aislamiento, se realizaron tres transferencias en los medios de cultivo selectivos. 1 mL de LR filtrado se inoculó, por quintuplicado, en tubos de cultivo de 18 x 150 mm que contenían 9 mL de medio Estreptosel líquido y se incubó a 39°C. Después de 72 h de incubación, se transfirió 1 mL a tubos de cultivo con 9 mL de medio Estreptosel fresco y se incubaron nuevamente a 39 °C por 72 h. La transferencia se realizó tres veces para asegurar el aislamiento de un cultivo puro de BAL (Leedle y Hespell, 1980; Lederberg, 1989). Durante este proceso, se midió pH y potencial de óxido reducción (Eh) con un potenciómetro (ORION®, E.U.A.) calibrado a dos puntos, pH (4.0 y 7.0), y a un Eh de 220 mV. La concentración de bacterias totales a las 0 h y 72 h de incubación se realizó por conteo directo (Harrigan y McCance, 1979) usando un microscopio de contraste Olympus (BX51, Japón) y una cámara de conteo Petroff-Hausser (Hausser Scientific, E.U.A.). De la tercera transferencia, se inoculó por estriado 0.1 mL en cajas de Petri que contenían los tres diferentes medios de cultivo sólido y se incubaron a 39°C por 72 h. Se caracterizó la morfología y la tinción Gram de las colonias bacterianas que crecieron en cada medio de cultivo y caja de Petri.

1.3.3. Conservación del cultivo de *Pediococcus acidilactici*, prueba de viabilidad y curva de crecimiento

La colonia bacteriana más abundante de *P. acidilactici*, de la tercera transferencia, se transfirió, con un asa bacteriológica, en un tubo de cultivo de 18 x 150 mm con 9 mL de medio Estreptosel fresco y se incubó 24 h a 39 °C (Leedle y Hespell, 1980; Lederberg, 1989).

Para observar la morfología bacteriana y estimar la concentración de bacterias totales por mL de medio de cultivo, se fijaron 0.4 mL del cultivo con 0.1 mL de una solución de formaldehído al 18 % (Harrigan y McCance, 1979).

Para la conservación por liofilización de la bacteria aislada, se usó el método desarrollado en el Laboratorio de Microbiología Ruminal por el Dr. Mario A. Cobos (datos no publicados). Se transfirieron 8.5 mL de medio líquido Estreptosel inoculado con *P. acidilactici* a un matraz Erlenmeyer con 100 mL de medio Estreptosel fresco, se incubó en un baño orbital (Lab-Line®, EUA) a 39°C y 60 ciclos por min. Cuando se alcanzó una concentración bacteriana de 1×10^8 bacterias/mL de medio de cultivo, se detuvo la incubación y se transfirieron 5 mL del inóculo en viales serológicos de 50 mL de capacidad. Se usaron un total de 20 viales. En 10 de estos viales se agregó, además, 0.02 g de carbón activado (Hycel®) antes del proceso de incubación (Sánchez *et al.*, 2016).

Las bacterias depositadas en los 20 viales serológicos, se incubaron 2h a 39 °C, después, se enfriaron 2h a 4°C en un refrigerador, después, se ultracongelaron en un congelador de rodillos (Labconco®, EUA) a -38°C, finalmente, se almacenaron 24 h a -40°C en un ultra-congelador (REVCO™, EUA). La liofilización se llevó a cabo en una liofilizadora de 6 L de capacidad (Labconco®, EUA) durante 8 horas, a -45°C y un vacío de 133×10^{-3} mBar (Heckly, 1961).

Cuadro 1.1 Composición de los medios de cultivo evaluados para el aislamiento de las bacterias ruminales asociadas a la acidosis.

Componentes	Medios, g/L			
	Estreptosel líquido	Estreptosel sólido	M modificado	Sangre con azida
Peptona de carne	---	---	---	5.0
Peptona de caseína	15.0	15.0	---	5.0
Peptona de soya	5.0	5.0	---	---
Digerido pancreático de gelatina	---	---	10.0	---
Extracto de levadura	---	---	30.0	---
Extracto de carne	---	---	---	5.0
Cloruro de sodio	4.0	4.0	15.0	5.0
Citrato de sodio	1.0	1.0	---	---
Esculina	---	---	1.0	---
L-cisteína	0.2	0.2	---	---
Sulfito de sodio	0.2	0.2	---	---
Dextrosa	5.0	5.0	---	---
Azida sódica	0.2	0.2	0.15	0.2
Violeta de cristal	0.0002	0.0002	---	---
Cicloheximida	---	---	0.05	---
Ácido nalidíxico	---	---	0.25	---
Agar	---	15.0	15.0	15.0

Para evaluar la viabilidad de las bacterias liofilizadas con y sin carbón activado (Hycel®) se contaron las unidades formadoras de colonia (UFC) en placa y se estimó la concentración de bacterias por mL de medio de cultivo, por el método de número más probable (NMP; Harrigan y McCance, 1979; Doré *et al.*, 1995). Mientras que, la curva de crecimiento bacteriano, se determinó por absorbancia a 600 nm (Baranyi y Pin 1999; Rodríguez *et al.*, 2005; Swamy 2008) en un espectrofotómetro Lambda 40 (Perkin Elmer, EUA). La absorbancia se midió cada 3h durante 24h de incubación. El medio de cultivo

GCA-FR+0.5 % (Hungate 1950; Cuadro 1.2) fue usado para activar (hidratar) el cultivo bacteriano liofilizado.

Cuadro 1.2. Medio anaerobio (GCA-FR) usado para el crecimiento de la bacteria

Componente	Cantidad en 100 mL
Extracto de levadura, g	0.1
Trypticase-peptona, g	0.2
Glucosa, mg	500
Celobiosa, mg	60
Almidón, mg	60
Solución mineral I ¹ , mL	5.0
Solución mineral II ² , mL	5.0
Líquido ruminal clarificado ³ , mL	30.0
Solución de cisteína-sulfido ⁴ , mL	2.0
Sol. de carbonato de sodio al 8 % ⁵ , mL	5.0
Agua destilada, mL	52.6
Solución de resazurina al 0.1 % ⁶ , mL	0.1

(1) Conteniendo (por 1L) 6 g de K₂HPO₄; **(2)** Conteniendo (por 1L) 6 g de KH₂PO₄; 6 g (NH₄)₂SO₄; 12 g NaCl; 2.45 g MgSO₄ y 1.6 g de CaCl₂·H₂O; **(3)** 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 y 121°C; **(4)** 2.5 g de L-cisteína (disuelta en 15 mL de 2N NaOH) + 2.5 g de Na₂S·9H₂O (en 100 mL de H₂O); **(5)** 8 g de carbonato de sodio en 100 mL de agua destilada; **(6)** 0.1 mL de resazurina en un volumen final de 100 mL.

1.3.4. Caracterización molecular de *P acidilactici*

La extracción de ADN se realizó por el método de bromuro de hexadeciltrimetilamino (CTAB; Doyle y Doyle, 1991), para la amplificación de la región 16S rARN se usaron los cebadores universales 8F y 1492R (Promega®). La secuenciación se realizó en el equipo Applied Biosystems® 3130. El historial de evolución fue inferido usando el método de Máxima Parsimonia. El árbol filogenético se obtuvo usando el algoritmo heurístico de intercambio de ramas, poda de un subárbol y pegado (Nei y Kumar, 2000). El análisis de evolución fue desarrollado con el programa MEGA 6 (Tamura *et al.*, 2013). Para el análisis se usaron 24 secuencia de nucleótidos de bacterias ácido lácticas aisladas del rumen (Cuadro 1.3).

1.3.5. Caracterización fermentativa de *P. acidilactici*

La bacteria *P. acidilactici* se hidrató durante 12 h en el medio GCA-FR (Hungate, 1947), de este material se utilizaron 10 µL para inocular cajas Petri con medio MRS (Herigstad *et al.*, 2001) que se incubaron a 39°C por 72h. De las colonias que proliferaron, se tomó una asada para inocular 9 mL de medio de cultivo GCA-FR con 5% de glucosa, y se incubó por 24h. Después, el volumen total del tubo (9 mL) fue usado para inocular 250 mL de medio GCA-FR con 5% de glucosa contenidos en un matraz Erlenmeyer de 500 mL de capacidad y se incubó durante 12 h (Leedle y Hespell, 1980; Lederberg, 1989). El cultivo bacteriano obtenido, se usó como inóculo, dosificando 1 mL en tubos de cultivo con 9 mL de medio FR + 0.2 g de dieta alta en granos (Cuadro 1.4), este material se mantuvo en incubación a 39°C por 6h, los muestreos de AGV y ácido láctico se realizaron a las 0, 3, 4,5 y 6h de incubación. Para AGV las muestras fueron fijadas con ácido metafosfórico al 25% en una proporción 4:1 (Erwin *et al.*, 1961) el material se mantuvo en refrigeración hasta su análisis por cromatografía de gases (Cobos *et al.*, 2007). La medición de ácido láctico se realizó por colorimetría (Taylor. 1996; Madrid *et al.*, 1999). El pH se cuantificó usando un potenciómetro Orion 250^a calibrado a dos puntos de pH de 7.0 y 4.0. Para la concentración de bacterias totales se realizó el conteo directo en la cámara Petroff-Hausser usando un microscopio Carl Zeiss Axiostar a 1000X (Harrigan y McCance, 1979). La concentración de bacterias ácido lácticas se realizó por la técnica del número más probable (NMP; Harrigan y McCance, 1979). Las variables anteriores se midieron a las 0, 3, 4,5 y 6h de incubación.

Cuadro 1.3 Bacterias ácido lácticas aisladas del rumen con secuencias parciales de la región 16S rARN usadas para el análisis de evolución desarrollado con el programa MEGA 6 (Tamura *et al.*, 2013)

Cepa	Referencia
<i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 33314	Morvan y Joblin, 1999
<i>Lactobacillus reuteri</i> ATCC 23272	
<i>Lactobacillus fermentum</i> ATCC 14931	
<i>Streptococcus bovis</i> Sb R1	Al <i>et al.</i> , 2003
<i>Lactobacillus reuteri</i> ATCC 55730	Versalovic <i>et al.</i> , 2008
<i>Lactobacillus plantarum</i> LJR7	Ladha y Jeevaratnam, 2016
<i>Lactobacillus plantarum</i> LJR10	
<i>Lactobacillus plantarum</i> LJR13	
<i>Streptococcus bovis</i> ATCC 700338	
<i>Streptococcus bovis</i> M58835.1	
<i>Lactobacillus plantarum</i> LJR3	
<i>Lactobacillus plantarum</i> LJR8	
<i>Lactobacillus plantarum</i> LJR4	
<i>Lactobacillus plantarum</i> LJR2	
<i>Lactobacillus paraplantarum</i> Ni957	
<i>Pediococcus acidilactici</i> Uga146-3	
<i>Pediococcus clausenii</i> DSM 14800T	
<i>Pediococcus acidilactici</i> DSM 20284	
<i>Pediococcus pentosaceus</i> LJR5	
<i>Pediococcus pentosaceus</i> LJR1	
<i>Pediococcus pentosaceus</i> DSM 20336	
<i>Lactobacillus gastricus</i> Kx156A7	
<i>Lactobacillus fermentum</i> LJR6	
<i>Lactobacillus fermentum</i> LJR18	

Cuadro 1.4 Composición de la dieta alta en granos.

Ingrediente	g/ kg BS
Sorgo	448
Maíz	275
Harina de soya	139
Silo de maíz	57
Rastrojo de maíz	61
Mezcla mineral ^a	20
EM (Mcal Kg ⁻¹) ^b	2.9
PC (%) ^b	12.0

^a Contiene por cada 1000g, calcio, 130g; fosforo, 50g; sodio, 109 g, cloro 200g; hierro, 4.3g; magnesio, 3.3g; manganeso, 0.2 g; cobre, 0.08 g; cobalto, 0.067g; yodo, 0.004g; zinc, 0.008 g.

^b De acuerdo a los requerimientos nutricionales para engorda de borregos NRC 2007.

1.3.6 Diseño y análisis estadístico

Para evaluar el efecto de la liofilización con o sin la adición de carbón activado (Hycel[®]) sobre la viabilidad bacteriana, y el tipo de fermentación se usó un diseño experimental completamente al azar usando el procedimiento MIX de SAS (SAS[®] Institute Inc., 2011).

Los promedios se ajustaron por mínimos cuadrados para compararlos con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). El modelo estadístico fue:

$$Y_{ijk} = \mu + \tau_i + \xi_{ijk}$$

En donde Y_{ij} es la variable respuesta en observación k , repetición j , tratamiento; μ es la media general; τ_i es el efecto del i -ésimo tratamiento; ξ_{ijk} es el error aleatorio asociado con k -ésima medida dentro de j -ésima repetición.

1.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.4.1 Evaluación del medio de cultivo seleccionado para el aislamiento y caracterización morfológica de *Pediococcus acidilactici*

Al momento de inocular con líquido ruminal (LR) el medio de cultivo Estreptosel, el pH fue de 6.35; después, 72h de incubación el medio se acidificó y alcanzó un valor pH de 4.89 (Cuadro 1.5). Se ha determinado que la bacteria ácido láctica *Streptococcus bovis*, disminuye el pH a 4.75 en medios de cultivo con glucosa y su índice entre la producción de ácido láctico (g/L) y utilización de glucosa (g/L) es de 0.69 (Russell y Dombrowski 1980). A las 72h de incubación el potencial de óxido reducción (Eh) fue positivo (≥ 0.1 mV), debido a la presencia de oxígeno y sus especies reactivas (ERO) que favorecen el crecimiento de bacterias anaerobias facultativas (Marden *et al.*, 2005) y ejercen una presión de selección sobre bacterias anaerobias estrictas presentes en el LR, en donde el Eh está entre -250 a -450 mV (Broger, 1957; Marden *et al.*, 2005). La concentración inicial y final de bacterias ruminales totales (CBRT) tuvo una mínima variación y fluctuó entre $1 \times 10^8 \text{ mL}^{-1}$ y $1.8 \times 10^9 \text{ mL}^{-1}$ de medio Estreptosel (Cuadro 1.5). A la hora “cero” de inoculación, se encontraron bacterias Gram (+) y Gram (-); mientras que, a las 72h de incubación, solamente, se identificaron bacterias Gram (+), en forma de cocos, diplococos y algunas cadenas con menos de 10 células (Imagen 1 a, b, y c). Este resultado se repitió en las tres transferencias (Imagen 2). El medio Estreptosel es selectivo para bacterias Gram positivas ya que contiene azida de sodio (NaN_3), compuesto que bloquea el hierro de la molécula de citocromo en el estado férrico, e impide la transferencia final del electrón al oxígeno molecular (Reuter, 1992).

Cuadro 1.5 pH, potencial de óxido reducción (Eh, RevmV) y bacterias ruminales totales (BRT, 10⁹/mL) inicial (0h) y final (72h) de los tubos de cultivo con medio Estreptosel inoculados con líquido ruminal, después de cada transferencia.

Periodo	Variable	Inoculación	Transferencia		
			1	2	3
0	pH	6.54	6.31	6.42	6.13
	Eh, RevmV	18.07	53.83	51.47	24.27
	BRT, 10 ⁹ /mL	1.2	0.2	0.4	0.1
72	pH	5.30	4.77	4.75	4.74
	Eh, RevmV	57.83	74.27	63.93	75.43
	BRT, 10 ⁹ /mL	1.8	1.0	1.0	1.1

Las colonias bacterianas que crecieron en el medio de cultivo Estreptosel, fueron de forma circular, elevada, de textura viscosa, coloración blanca y con tinción Gram positiva, (Imagen 1.3 y 1.6, respectivamente). En el agar M modificado, crecieron menos colonias, fueron blancas, de forma circular con textura viscosa, (Imagen 1.4). Las colonias bacterianas crecidas en el medio sangre azida, presentaron forma circular, textura viscosa y diferentes tamaños (Imagen 1.5).

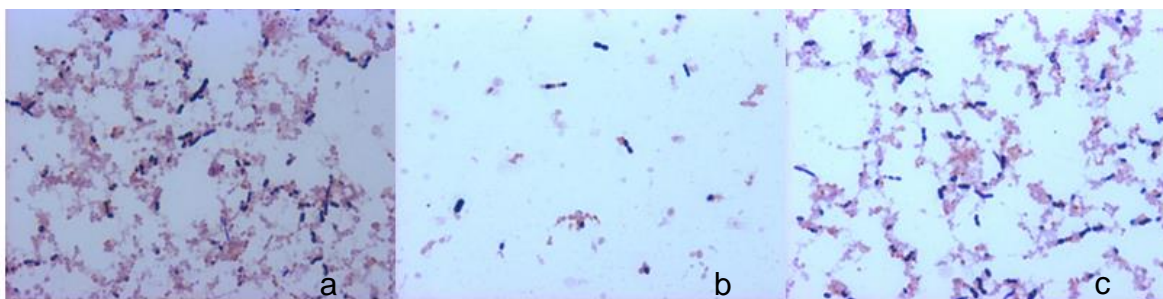
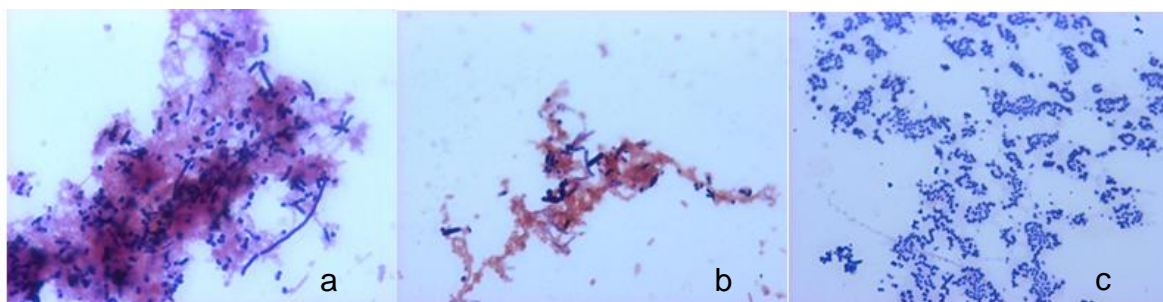


Imagen 1.1 a, b y c son muestras a las 72 h de incubación.



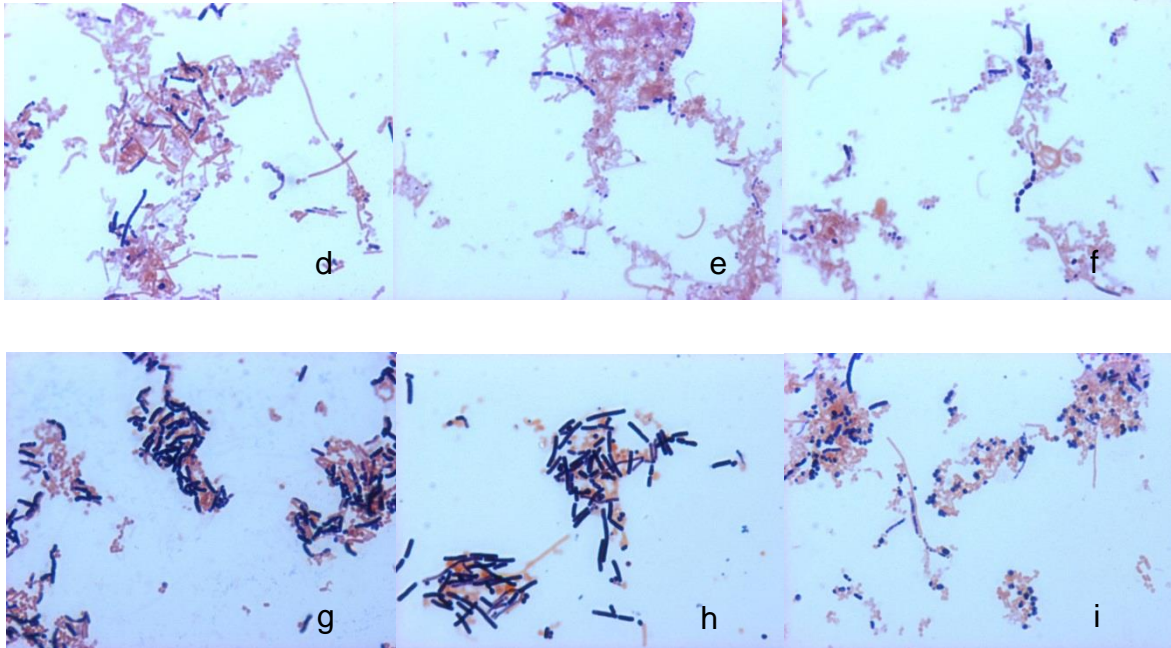


Imagen 1.2 a, b y c son muestras a 72h de incubación durante la transferencia 1. d, e y f son muestras a 72h de incubación durante la transferencia 2. g, h i son muestras a 72h de incubación durante la transferencia 3.

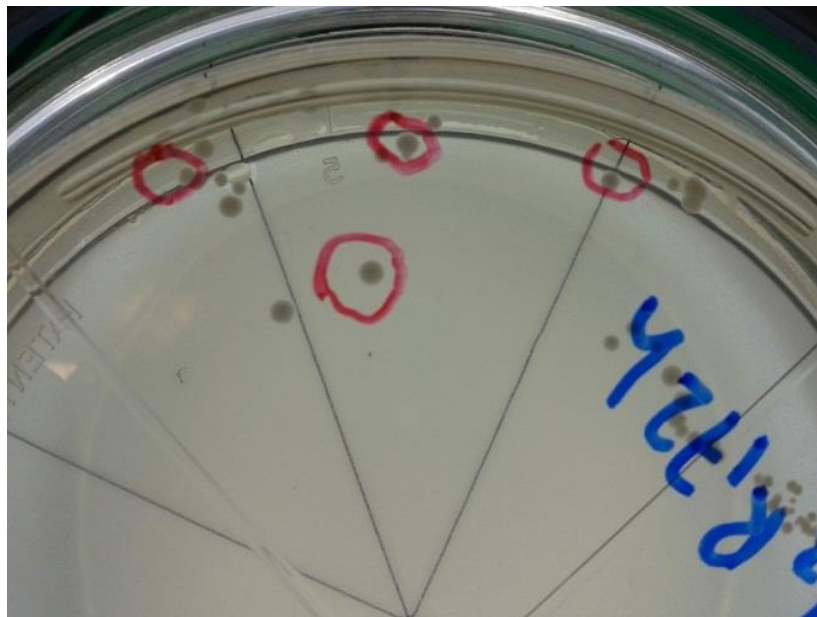


Imagen 1.3 Crecimiento de colonias en medio sólido Estreptosel a las 48 horas de incubación.



Imagen 1.4 Crecimiento de colonias en medio sólido M modificado a las 48 horas de incubación.

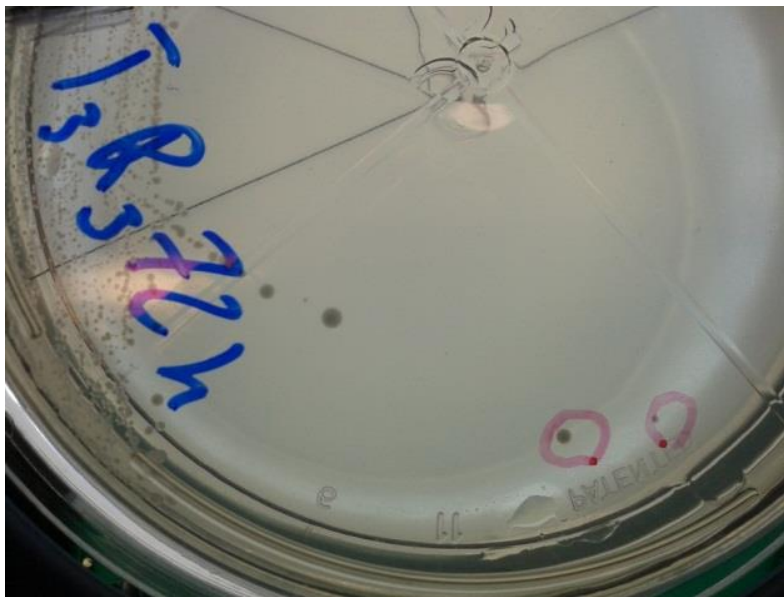


Imagen 1.5 Crecimiento de colonias en medio sólido Sangre azida a las 48 horas de incubación.

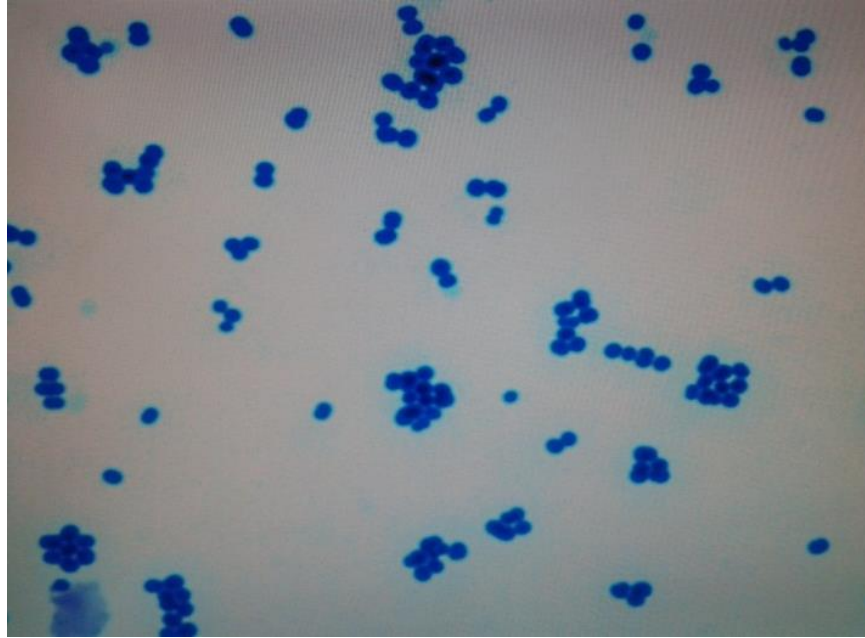


Imagen 1.6 Bacterias con tinción Gram positiva procedentes de medio sólido de Estreptosel.

El medio Estreptosel contiene dextrosa, peptona de caseína y de soya para cubrir los requerimientos de energía y aminoácidos de las bacterias (Parés y Juárez, 2002). Además, contiene, compuestos como la azida sódica, L-cisteína y sulfito de sodio que inhibe el crecimiento de hongos y bacterias Gram (-) y forman parte de la enzima glutatión peroxidasa (Reuter, 1992; Konrad *et al.*, 2003). Estos componentes hacen del medio Estreptosel un medio selectivo para el crecimiento de bacterias Gram (+) del género *Streptococcus*. Sin embargo, en este estudio el medio Estreptosel, mostró que también permite el desarrollo de otra BAL, como *Pediococcus acidilactici*, un resultado similar fue reportado por Cobos *et al.* (2011).

1.4.2 Evaluación de la viabilidad y curva de crecimiento de un cultivo puro de *Pediococcus acidilactici*

El uso de carbón activado (Hycel®) como lioprotector, mostro una mayor ($p \leq 0,05$) concentración bacteriana por gramo de material liofilizado a las 72 h de incubación ($6,79 \times 10^{10}$ UFC/g), con respecto al medio sin carbón activado. Se ha reportado que el carbón activado absorbe y conserva los nutrientes del medio de cultivo, los cuales están disponibles para las bacterias conservadas por liofilización, una vez que son rehidratadas (Camper *et al.*, 1986). La utilidad del carbón activado como lioprotector, se determinó también con las bacterias ruminales celulolíticas liofilizadas con 0.1g de carbón activado (Hycel®), se determinó una mayor ($p \leq 0,05$) viabilidad, expresada en UFC y NMP, que las bacterias conservadas sin carbón activado (Cuadro 1.6), un resultado similar al reportado por Sánchez *et al.* (2016).

Cuadro 1.6 Promedio de UFC/g de material liofilizado y NMP de los dos tipos de liofilización comparados.

Carbón activado	UFC $\times 10^{10}$ /g	EEM	NMP
Sin	1.63 ^b	1.24	4.9×10^{11} mL ⁻¹
Con	6.79 ^a	1.24	3.5×10^{12} mL ⁻¹

*Medias con letras diferentes en columna son diferentes ($p \leq 0.05$); EEM: error estándar del valor promedio; UFC: unidades formadoras de colonia; NMP: número más probable considerando límites de confianza aproximados al 95%.

La curva de crecimiento de la bacteria aislada presento una fase lag, de 3h; una fase exponencial de 9h y una fase de latencia de 12h, sin que se estableciera una fase de declinación o muerte celular. (Figura 1.1; Monod, 1949; Casciato *et al.*, 1957).

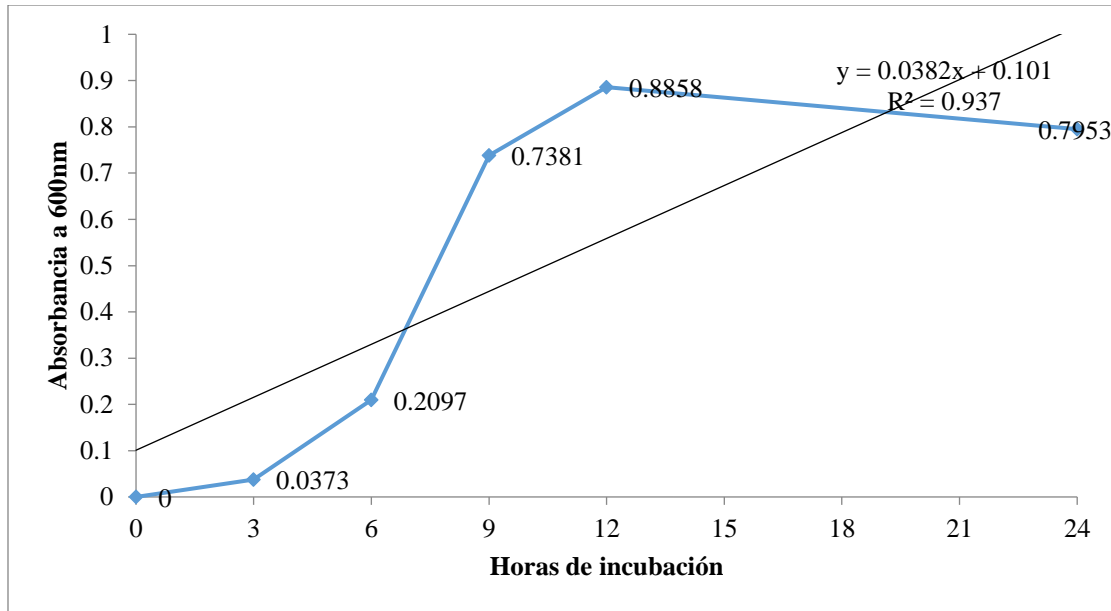


Figura 1.1 Curva de crecimiento de la bacteria de durante 24 h de incubación en medio de cultivo GCA-FR+0.5 %.

Variables fermentativas y microbiológicas. – Después de 6h de incubación, el pH del medio de cultivo disminuyo ($p \leq 0.05$) ligeramente a 6.4 y la concentración de ácido láctico aumento ($p \leq 0.05$) a 10.4 mMol/L, (Cuadro 1.7), con respecto al pH del medio de cultivo a la hora cero de inoculación con LR. La concentración de bacterias totales (BT) incremento desde las 3 h de incubación (4.50×10^8 / mL; Cuadro 1.7) y a partir de las 4h de incubación la concentración de BT fue estadísticamente mayor ($p \leq 0.05$). Otros autores, han reportado, en dietas altas en granos, que la concentración de BAL como *P. acidilactici* mantienen una concentración de 1×10^7 mL⁻¹ con un pH de 5.8 después 24h de incubación a 39 °C (Jiao *et al.*, 2017).

La concentración total de ácidos grasos volátiles (AGV) disminuyó ($p \leq 0.05$) partir de las 4 h de incubación con un valor mínimo de 11.0 mMol mL⁻¹ a las 6h de incubación (Cuadro 1.7). Cuando el pH del medio de cultivo se acidifica, la concentración total de AGV puede

disminuir un 8.6%, con respecto a su valor inicial, por ejemplo, con valores pH de 5.8 la concentración total de AGV disminuyó a 73.6 mM (Jiao *et al.*, 2017). También disminuyó la concentración de ácido acético ($p \leq 0.05$) a partir de las 4 h de incubación. Mientras que, el ácido propiónico y el ácido butírico, disminuyeron su concentración ($p \leq 0.05$) hasta las 5 h de incubación. Cuando la fermentación de carbohidratos ocasiona la caída del pH a valores ≤ 6.0 , se favorece la producción de ácido propiónico (Bannink *et al.*, 2008). En el presente estudio, solo se observó una mayor proporción de ácido propiónico a las 5 h de incubación.

Durante la acidosis ruminal subaguda, la producción de ácido láctico se puede mantener en valores de 2 mM h^{-1} , se rebasa la capacidad de remoción ruminal (vaciado o vía sanguínea), y la transformación de ácido láctico a propionato por bacterias utilizadoras de ácidos orgánicos, como resultado el pH ruminal puede disminuir a valores de 5.7 (Counotte y Prins, 1979). Los AGV, tiene un pK de 4.76, 4.87, 4.82, acético propiónico y butírico, respectivamente (Kristensen, 2005); mientras que, el ácido láctico es un ácido fuerte y tiene un pKa de 3.86, por tanto, su acumulación en rumen, causa la disminución inmediata del pH ruminal (Counotte y Prins, 1979).

Cuadro 1.7 Concentración de bacterias totales (BT) pH, ácido láctico, AGV a 0, 3, 4, 5 y 6 h de incubación.

Hora	pH	Láctico (mMol/L)	BT $10^8/\text{mL}$	AGV (mMol/mL)				
				Total	Acético	Propiónico	Butírico	Ace:Pro
0	7.3a	0.0b	1.95c	21.3a	13.6 ^a	5.0a	2.7a	2.72
3	6.7b	6.6a	4.50bc	21.5a	13.9 ^a	4.9a	2.6a	2.84
4	6.4b	9.6a	4.75 ab	17.4b	9.9b	4.7a	2.8a	2.11
5	6.5b	5.4ab	4.75 ab	12.8c	8.2cb	3.0b	1.5b	2.73
6	6.4b	10.4a	7.25 ^a	11.0c	7.4c	2.5b	1.2b	2.96
EEM	0.08	0.97	0.43		0.58	0.24	0.17	

*Medias con letras diferentes en columna son diferentes ($p \leq 0.05$)

La bacteria aislada del rumen se identificó como *P. acidilactici* y fue clasificada en el GenBank con el número de acceso: KR935885. Esta bacteria presentó 1201 sitios conservados con otras bacterias de su misma especie, 631 sitios conservados con *L. Plantarum*, y 447 con *S. bovis* (Figura 1.2). Queda claro, que esta bacteria es un pariente muy lejano de otras BAL y en particular de *S. bovis*.

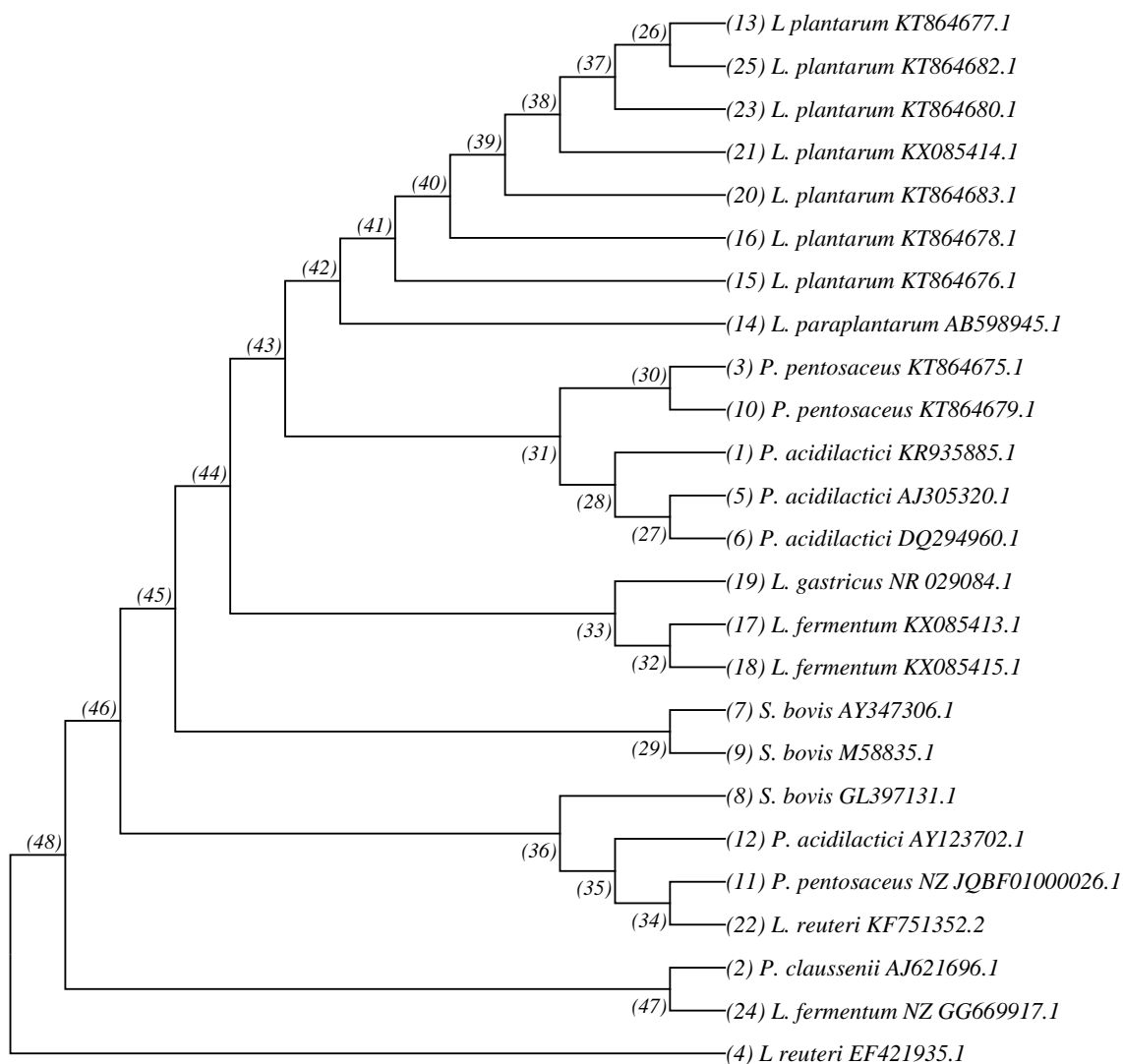


Figura 1.2 Árbol filogenético de la bacteria aislada KR935885.1 por el método de Máxima Parsimonia y algoritmo heurístico de intercambio de ramas, poda de un subárbol y pegado (Nei y Kumar, 2000).

1.5 CONCLUSIONES

El medio de cultivo Estreptosel es adecuado para el crecimiento y aislamiento de otras bacterias ácido lácticas (BAL). En este estudio, se logró el aislamiento, a partir de muestras de líquido ruminal de la BAL *Pediococcus acidilactici*, bacteria Gram positiva, con una morfología característica de coco, diplococos y cadenas de entre 4 a 10 bacterias. El uso de carbón activado (Hycel®) al 0.4 % adicionado antes de la inoculación e incubación en el medio de cultivo Estreptosel mejora la conservación por liofilización y la viabilidad bacteriana. La fermentación de dietas altas en cereales favorece su crecimiento *in vitro*, así como, la producción de ácido láctico, lo cual hace que esta bacteria ruminal pueda estar asociada a la acidosis ruminal.

1.6 LITERATURA CITADA

- Bannink, A., France, J., Lopez, S., Gerrits, W. J. J., Kebreab, E., Tamminga, S., and Dijkstra, J. 2008. Modelling the implications of feeding strategy on rumen fermentation and functioning of the rumen wall. *Animal Feed Science and Technology* 143(1): 3-26.
- Baranyi J. And Pin C. 1999. Estimating bacterial growth parameters by means of detection times. *Applied and environmental microbiology* 65 (2): 732-736.
- Beauchemin, K. A., Krehbiel, C. R., & Newbold, C. J. 2006. Enzymes, bacterial direct-fed microbials and yeast: principles for use in ruminant nutrition. *Biology of Growing Animals* 4: 251-284.

- Broberg, G. 1957. Oxygen's significance for the ruminal flora as illustrated by measuring the redox potential in rumen contents. A provisional announcement. *Nordisk Veterinaermedicin* 9: 57-60.
- Calsamiglia, S., Blanch M., Ferret A., Moya D. 2012. Is subacute ruminal acidosis a pH related problem? Causes and tools for its control. *Animal Feed Science and Technology* 172:42- 50.
- Camper. A.K., Lechevallier. M. W., Broadaway. S.C., and Mcfeters. G. A. 1986. Bacteria Associated with Granular Activated Carbon Particles in Drinking Water. *Applied and Environmental Microbiology* 52 (3): 434-438.
- Casciato D. A., Stewart P. R., and Rosenblatt J. E. 1975. Growth curves of anaerobic bacteria in solid media. *Applied Microbiology* 29 (5): 610-614
- Cobos M. A., M. Pérez-Sato, J. Piloni-Martini, S. S. González, and J. R. Bárcena. 2007. Evaluation of diets containing shrimp Shell waste and an inoculum of *Streptococcus milleri* on rumen bacteria and performance of lambs. *Animal Feed Science and Technology* 132:324-330.
- Cobos M.A., Ley de Coss A., Ramírez N.D., González S.S., Ferrera Cerrato R. 2011. *Pediococcus acidilactici* isolated from the rumen of lambs with rumen acidosis, 16S rRNA identification and sensibility to monensin and lasalocid. *Research in Veterinary Science* 90:26-30.
- Counotte, G. H. M., & Prins, R. A. 1978. Regulation of rumen lactate metabolism and the role of lactic acid in nutritional disorders of ruminants. *Veterinary Science Communications* 2(1):277-303.

- Doré, J., Morvan, B., Rieu-Lesme, F., Goderel, I., Gouet, P., & Pochart, P. 1995. Most probable number enumeration of H₂-utilizing acetogenic bacteria from the digestive tract of animals and man. *FEMS microbiology Letters* 130(1): 7-12.
- Doyle, J. (1991). DNA protocols for plants. In *Molecular techniques in taxonomy*. Springer, Berlin, Heidelberg. pp. 283-293
- Dunlop, R. H., & Hammond, P. B. 1965. D-lactic acidosis of ruminants. *Annals of the New York Academy of Sciences* 119(3): 1109-1132.
- Erwin, E. S., Marco, G. J., & Emery, E. M. 1961. Volatile fatty acid analyses of blood and rumen fluid by gas chromatography. *Journal of dairy science* 44(9): 1768-1771.
- Fernando, S. C., Purvis, H. T., Najar, F. Z., Sukharnikov, L. O., Krehbiel, C. R., Nagaraja, T. G., & DeSilva, U. 2010. Rumen microbial population dynamics during adaptation to a high-grain diet. *Applied and Environmental Microbiology* 76(22): 7482-7490.
- Ghorbani, G. R., Morgavi, D. P., Beauchemin, K. A., & Leedle, J. A. Z. 2002. Effects of bacterial direct-fed microbials on ruminal fermentation, blood variables, and the microbial populations of feedlot cattle. *Journal of Animal Science* 80(7): 1977-1985.
- Harrigan, W. F. and E. M. McCance. 1979 *Laboratory methods in microbiology of foods and milk products*. Ed. Academia. Leon, Spain. Pp 361-366.
- Heckly, J.R. 1961. Preservation of bacteria by lyophilization. *Advances in Applied Microbiology* 3:1-76
- Herigstad, B., Hamilton, M., & Heersink, J. 2001. How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria. *Journal of Microbiological Methods* 44(2): 121-129.

- Hernández Salgado, J. R., Ortega Sánchez, J. L., & Villagómez Hernández, J. 2008. Prevalencia de acidosis ruminal subaguda en ganado lechero Holstein friesian en 66 establos de la comarca lagunera, México. *Revista Chapingo Serie Zonas Áridas* 7(2).
- Hungate, R. E. 1950. The anaerobic mesophilic cellulolytic bacteria. *Bacteriology Review* 14:1-49.
- Jiao, P. X., Liu, F. Z., Beauchemin, K. A., & Yang, W. Z. 2017. Impact of strain and dose of lactic acid bacteria on *in vitro* ruminal fermentation with varying media pH levels and feed substrates. *Animal Feed Science and Technology* 224, 1-13.
- Konrad, J.D., Helmut, K.M., Wolfgang, K. 2003. Methods used for the isolation, enumeration, characterization and identification of *Enterococcus spp.*:1. Media for isolation and enumeration. *International Journal of Food Microbiology* 88(2-3):147-
- Kristensen, N. B. 2005. Splanchnic metabolism of volatile fatty acids in the dairy cow. *Animal Science* 80(01): 3-10.
- Ladha, G., & Jeevaratnam, K. 2016. Molecular Characterization of lactic acid bacteria isolated from rumen liquor of goat. *Biosciences Biotechnology Research Asia* 13(4): 2155-2159.
- Lederberg, J. 1989. Replica plating and indirect selection of bacterial mutants: isolation of preadaptive mutants in bacteria by sib selection. *Genetics* 121(3): 395.
- Leedle, J. A., & Hespell, R. B. 1980. Differential carbohydrate media and anaerobic replica plating techniques in delineating carbohydrate-utilizing subgroups in rumen bacterial populations. *Applied and Environmental Microbiology* 39(4): 709-719.

- Lynch, Raphael, Mellor, Spare & Inwood.1978. Métodos de Laboratorio. Editorial Interamericana, 2da edición.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Dunlap, P. V., & Clark, D. P. 2014. Brock Biología de los microorganismos 14a. ed. Pearson.
- Madrid, J., Martínez-Teruel, A., Hernández, F., & Megías, M. D. 1999. A comparative study on the determination of lactic acid in silage juice by colorimetric, high-performance liquid chromatography and enzymatic methods. Journal of the Science of Food and Agriculture 79(12): 1722-1726.
- Marden J.P., Bayourthe C., Enjalbert F. and Moncoulon R. 2005. A new device for measuring kinetics of ruminal pH and redox potential in Dairy Cattle. Journal Dairy Science 88:277-281.
- Monod, J. 1949. The growth of bacterial cultures. Annual Review of Microbiology 3:371-394.
- Morvan B., and Joblin K. N. 2000. Hydration of Oleic Acid by *Entorococcus gallinarum*, *Pediococcus acidilactici* and *Lactobacillus sp.* Isolated from Rumen. Anaerobe 5: 605-611.
- Nei M. and Kumar S. 2000. Molecular Evolution and Phylogenetic. Oxford University Press, New York.
- O'Toole, G. A. 2016. Classic spotlight: plate counting you can count on. Journal of Bacteriology 198(23): 3127.
- Parés Farrás R., Juárez Giménez A. 2002. Bioquímica de los microorganismos. Ed. Reverté S.A. 2ª ed. pag.: 73-94.

- Reuter, G. 1992. Culture media for *Enterococci* and group *D-streptococci*. International journal of food microbiology 17(2): 101-111.
- Rodríguez. E., Gamboa. M., Hernández. F., García. J. 2005. Bacteriología general: principios y prácticas de laboratorio. Editorial Universidad de Costa Rica, 475 p.
- Russell J.B and Dombrowski D.B. 1980. Effect of pH on the efficiency of growth by pure culture of rumen bacteria in continuous culture. Applied and Environmental Microbiology 39 (3): 604-610.
- Russell, J. B., & Strobel, H. J. 1989. Effect of ionophores on ruminal fermentation. Applied and Environmental Microbiology 55(1), 1.
- Sánchez-Santillán, P., Cobos-Peralta, M. A., Hernández-Sánchez, D., Alvarado-Iglesias, A., Espinosa-Victoria, D., & Herrera-Haro, J. G. 2016. Uso de carbón activado (Hycel®) para conservar bacterias celulolíticas liofilizadas. Agrociencia 50(5): 576-581.
- SAS. Institute Inc. 2011. Statistical Analysis System, SAS, User's Guide: SAS Inst., Cary, NC. pp: 119-130.
- Schwartzkopf-Genswein, K. S., Beauchemin, K. A., Gibb, D. J., Crews, D. H., Hickman, D. D., Streeter, M., & McAllister, T. A. 2003. Effect of bunk management on feeding behavior, ruminal acidosis and performance of feedlot cattle: A review. Journal of Animal Science, 81(2): E149-E158.
- Swamy P. M. 2008. Laboratory manual on biotechnology. Rastogi publications, biotechnology - 617 p.

- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., and Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725-2729.
- Taylor, K. A. 1996. A simple colorimetric assay for muramic acid and lactic acid. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 56(1): 49-58.
- Telle, P. P., & Preston, R. L. 1971. Ovine lactic acidosis: Intraruminal and systemic. *Journal of animal science* 33(3): 698-705.
- Versalovic, K. J., Roos, S., & Britton, R. A. 2008. Genomic and genetic characterization of the bile stress response of probiotic *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730. *Applied and environmental microbiology* 74(6):1812-1819.
- Warner, A. C. I. 1962. Enumeration of rumen micro-organisms. *Microbiology* 28(1): 119-128.
- Weinberg, Z. G., Muck, R. E., & Weimer, P. J. 2003. The survival of silage inoculant lactic acid bacteria in rumen fluid. *Journal of applied microbiology* 94(6): 1066-1071.
- Yanke L.J. and Cheng K.J. 1998. A method for the selective enumeration and isolation of ruminal *Lactobacillus* and *Streptococcus*. *Letter in Applied Microbiology* 26: 248-252.

CAPITULO II. PRODUCCIÓN *IN VITRO* DE ÁCIDO LÁCTICO EN MEDIOS DE CULTIVO CON GLUCOSA Y DIETA ALTA EN GRANOS

2.1. RESUMEN

Se evaluaron dos medios de cultivo para simular acidosis ruminal láctica. El medio de GCA-FR + glucosa 0.05% y el medio DAG-FR. El medio de GCA-FR + glucosa es un medio anaerobio con un alto contenido de glucosa y una cantidad moderada de celulosa y almidón. Mientras que, el medio de cultivo DAG-FR es un medio que tiene como fuente de carbohidratos, ingredientes de una dieta alta en cereales para borregos en engorda. Ambos medios se inocularon con líquido ruminal fresco, como fuente de bacterias ruminales y se midió el pH y la concentración de ácido láctico a las 0, 3, 4, 5 y 6 h de incubación. A las cuatro horas de inoculación con bacterias lácticas, el medio de cultivo GCA-FR + glucosa 0.05% cambió el pH de 6.7 a 5.8 y aumento la concentración de ácido láctico de cero a 54.1 mmol L⁻¹. El medio de cultivo DAG-FR, mostró una menor sensibilidad para simular una acidosis láctica. El medio de cultivo GCA-FR+0.05% de glucosa, tiene potencial para estudios relacionados con la evaluación y control de la acidosis ruminal subclínica.

Palabras claves: pH, acidosis láctica, rumen.

ABSTRACT

Two culture media were evaluated to simulate rumen lactic acidosis. The GCA-FR + glucose 0.05% and DAG-FR media. The GCA-FR + glucose medium is an anaerobic medium with a high glucose content and a moderate amount of cellulose and starch. Whereas, the culture medium DAG-FR is a medium that has as a source of carbohydrates, ingredients of a diet high in cereals for lambs in fattening. Both media

were inoculated with fresh ruminal fluid, as a source of ruminal bacteria and the pH and lactic acid concentration were measured at 0, 3, 4, 4.5 and 6 h of incubation. After four hours of inoculation with rumen bacteria, the culture medium GCA-FR + glucose 0.05% changed the pH from 6.7 to 5.8 and increased the concentration of lactic acid from zero to 54.1 mmol L⁻¹. The culture medium DAG-FR showed a lower sensitivity to simulate a lactic acidosis. It is concluded that the GCA-FR + 0.05% glucose culture medium has potential for studies related to the evaluation and control of subacute ruminal acidosis.

Key words: pH, lactic acidosis, rumen.

2.2 INTRODUCCIÓN

El almidón es el principal carbohidrato en dietas altas en granos y se fermenta por la actividad amilolítica de bacterias ruminales que producen AGV (Mackie *et al.*, 1979). Sin embargo, bajo ciertas condiciones, se produce ácido láctico por BAL ruminales. *S. bovis*, produce amilasas extracelulares e intracelulares que hidrolizan el almidón en glucosa, el cual es transformado en ácido láctico (Walker *et al.*, 1965; Allen, 1997). La acidosis ruminal se presenta en rumiantes de alta producción de carne y leche, es producto de un desbalance entre la producción ácido láctico y su utilización en el rumen, una fermentación asincrónica entre las bacterias productoras y consumidoras de ácido láctico (Kenney *et al.*, 2015), como consecuencia, el pH ruminal disminuye (Aschenbach *et al.*, 2011). La acumulación ruminal de ácido láctico *in vitro*, se produce experimentalmente en medios de cultivo para bacterias ruminales que contenga 50% de almidón, 21% de glucosa, 6% de celulosa, 7% de celobiosa y 16% de tripticasa (Tung y Kung, 1993; Kung y Hession, 1995). Con una dosis de glucosa de 3g/L, *S. bovis* produce 40.35 mmol/L⁻¹

ácido láctico (Chen *et al.*, 2016). La cuantificación indirecta de ácido láctico en los medios de cultivo por el método de Taylor (1996), se relaciona con el acetaldehído presente en el ácido láctico que es liberado al ser incubado con ácido sulfúrico (Barker y Summerson, 1941). A partir de la descarboxilación del ácido láctico, se puede producir acetaldehído, al eliminarse el grupo carboxilo (-COOH) en forma de dióxido de carbono (CO₂; Sad *et al.*, 2017). Esta prueba se realizó con el objetivo de identificar los cambios en pH y ácido láctico, asociados a la fermentación *in vitro* de diferentes sustratos energéticos.

2.3 MATERIALES Y MÉTODOS

2.3.1. Ubicación geográfica del estudio

El estudio se realizó en el Laboratorio de Microbiología Ruminal y Genética Microbiana, del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo.

2.3.2. Medios de cultivo con sustratos energéticos

Para el experimento, se utilizó el medio glucosa, celobiosa, almidón y fluido ruminal clarificado más 0.5 % de glucosa (GCA-FR + 0.5 % de glucosa; Hungate, 1950; Cobos *et al.*, 2007), sus componentes se describen en el Cuadro 2.1. En tubos de cultivo de 18 x 150 mm (Pyrex[®], EUA) se adicionaron 9 mL de medio de cultivo bajo flujo de CO₂, posteriormente se llevaron a incubación a 39°C, comprobando su esterilidad durante 24 h. Así mismo, se utilizó el medio de cultivo a base de una dieta alta en granos y fluido ruminal clarificado (DAG-FR; ver Cuadro 2.1 y 2.2), 9 mL del medio DAG-FR se vertió en tubos de cultivo de 18 x 150 mL bajo flujo de CO₂.

Cuadro 2.1 Medios anaerobios GCA – FR + 0.5% y DAG-FR.

Componente	GCA – FR + 0.5%/100 mL	DAG-FR/100 mL
Extracto de levadura, g	0.1	0.1
Tripticasa-peptona, g	0.2	0.2
Glucosa, mg	500	---
Celobiosa, mg	60	---
Almidón, mg	60	---
Dieta, g	---	0.2
Solución mineral I ^a , mL	5.0	5.0
Solución mineral II ^b , mL	5.0	5.0
Líquido ruminal clarificado ^c , mL	30.0	30.0
Solución de cisteína-sulfido ^d , mL	2.0	2.0
Solución de carbonato de sodio al 8 %, mL	5.0	5.0
Agua destilada, mL	52.6	52.6
Solución de resarzurina al 0.1 %, mL	0.1	0.1

^aContiene por 1000 mL K₂HPO₄, 6.0 g.

^bContiene por 1000 mL K₂HPO₄, 6.0 g; (NH₄)₂SO₄, 6 g; NaCl, 12 g; MgSO₄, 2.45 g y CaCl 2H₂O, 1.6 g.

^cPreviamente filtrado a través de gasa y centrifugado a 23 000 g por 20 minutos a 8°C y esterilizado a 15 psi por 15 minutos.

^dSe disolvieron 2.5 g de L-cisteína- HCL•2H₂O en 50 mL de H₂O destilada, ajustando el pH de la mezcla a 10 con NaOH (2N); se agregaron 2.5 g de Na₂S•9H₂O y se aforó a 200 mL con H₂O destilada; la solución estuvo en ebullición por 5 minutos con flujo de N₂ y se depositó en tubos con tapón de hule.

Cuadro 2.2 Composición de la dieta alta en granos

Ingrediente	g/ kg BS
Sorgo	448
Maíz	275
Harina de soya	139
Silo de Maíz	57
Rastrojo de maíz	61
Mezcla mineral ^a	20
EM (Mcal Kg ⁻¹) ^b	2.9
PC (%) ^b	12.0

^a Contiene por cada 1000g, calcio, 130g; fósforo, 50g; sodio, 109 g, cloro 200g; hierro, 4.3g; magnesio, 3.3g; manganeso, 0.2 g; cobre, 0.08 g; cobalto, 0.067g; yodo, 0.004g; zinc, 0.008 g.

^b De acuerdo a los requerimientos nutricionales para engorda de borregos NRC 2007.

2.3.3. Curva de calibración y determinación de ácido láctico

Para evitar contaminación, la cristalería usada, se esterilizó a 500°C durante 15 min en una mufla Lindberg/Blue M™ (Thermo Fisher Scientific, EUA; Sykes; 1969). El material de plástico se esterilizó a 134 °C durante 3 min a 20 psi en una autoclave Tuttnauer® EZ10 (Tuttnauer, EUA; Sykes; 1969). Para preparar la solución madre de ácido láctico 1 mM/L, se agregaron 74.51µL de ácido láctico al 98.9% (Sigma Aldrich®, EUA) en un matraz aforado y se aforo con agua doble destilada (H₂O_{dd}) a 100mL De esta solución se prepararon soluciones que contenían 5, 10, 15, 20, 25 y 30 µg mL⁻¹ de ácido láctico (Taylor. 1996; Madrid *et al.*, 1999). Para cuantificar ácido láctico se utilizó 1mL de la solución con la concentración conocida de ácido láctico que fue agregado en tubos de cultivo con tapón de rosca Kimax® de 20 mm x 150 mm (Kimble Glass®, EUA). Para iniciar la prueba, se agregaron 6 mL de ácido sulfúrico J.T.Baker® al 96% (J.T.Baker®, EUA) a los tubos de rosca, y se calentaron por 15 min a 96 °C en un calentador seco (Daigger, EUA). Posteriormente, los tubos se dejaron enfriar a temperatura ambiente durante 15 min. A continuación, se agregaron 100 µL de sulfato de cobre al 4% (Sigma aldrich®, EUA) y 200 µL de una solución al 1.5 % parafenilfenol (Sigma aldrich®, EUA) en etanol al 95% (Fermont, PQM, México). La mezcla se agito con un vortex modelo (VWR®, EUA) y se dejó en reposo por 30 min a temperatura ambiente. Finalmente, la lectura de absorbancia se realizó a una longitud de onda de 570 nm en un espectrofotómetro Lambda 40 (Perkin Elmer, EUA).

2.3.4. Recolección de fluido ruminal (FR) fresco y preparación del inóculo

El FR se colecto de acuerdo con la norma del Comité de Cuidado Animal del Programa de Ganadería, Campus Montecillo del Colegio de Postgraduados. El FR se obtuvo de

una vaca Jersey con cánula ruminal. El FR fue filtrado en tela de manta y posteriormente centrifugado a 1157 X g durante 10 min, en una centrifuga 5810R (Eppendorf, Alemania) para precipitar partículas de alimento y protozoarios, el sobrenadante, con las bacterias ruminales se usó para inocular los medios de cultivo.

2.3.5. Producción de ácido láctico y pH en medios con glucosa y dieta alta en granos

Los medios con GCA-FR + 0.5 % de glucosa y DAG-FR, fueron inoculados con 1 mL del sobrenadante de bacterias ruminales. Cada tratamiento tuvo tres repeticiones. Se midió el pH con un potenciómetro ORION A250 (Thermo Fisher Scientific, EUA) calibrado a pH 4 y 7 y ácido láctico (Taylor. 1996; Madrid *et al.*, 1999) a las 0, 3, 4, 5 y 6 h de incubación.

2.3.10 Diseño y análisis estadístico

Los datos se analizaron usando un diseño completamente al azar con tres repeticiones por tratamiento. Los promedios se ajustaron por mínimos cuadrados para compararlos con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). Las variables de pH y ácido láctico se relacionaron usando la correlación de Pearson ($p \leq 0.05$; SAS Institute Inc., 2011).

2.4 RESULTADOS y DISCUSIÓN

La curva de calibración (Figura 2.1) del ácido láctico (Taylor. 1996; Madrid *et al.*, 1999), que se obtuvo con las concentraciones de referencia descritas en el Cuadro 2.3, tuvo un coeficiente de correlación de 0.99 con las lecturas de absorbancia. Este resultado indica una alta confianza en el método colorimétrico usado para medir la producción de ácido láctico en los diferentes tratamientos.

Cuadro 2.3 Concentraciones ($\mu\text{g/mL}$) de ácido láctico conocidas y su respectivo valor de absorbancia.

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbancia
0	0.0004
5	0.0395
10	0.2771
15	0.3788
20	0.4846
25	0.7499
30	0.9689

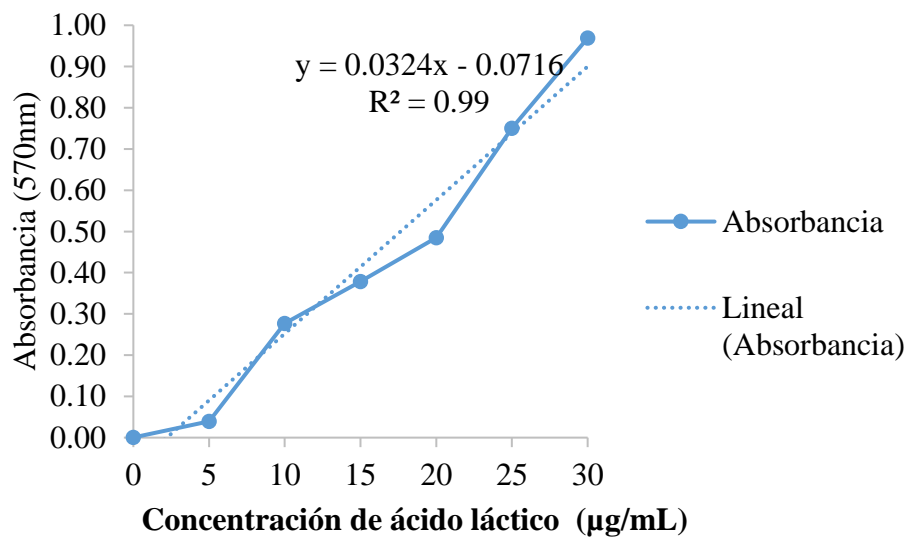


Figura 2.1. Curva estándar del ácido láctico con un coeficiente de correlación del 0.99

La disminución de pH fue más evidente en el medio GCA-FR+0.5% glucosa. A partir de las 4 h de incubación, el pH bajó a 5.8 con una concentración de 54.1 mmol L^{-1} de ácido láctico. En un estudio similar, un medio de cultivo que contenía 5g/L de glucosa se inoculó con la bacteria *S. bovis*, después de 6 h de incubación, el pH descendió a 4.5 y la concentración de ácido láctico aumentó a 23.0 mmol L^{-1} (Asanuma *et al.*, 1999). Sin

embargo, cuando se disminuyó la dosis de glucosa a 3g/L, el pH se mantuvo en 6.9 y la concentración de ácido láctico fue de tan solo 2.7 mmol L⁻¹ a las 6h de incubación (Asanuma *et al.*, 1999). En contraste, en el medio DAG-FR, se determinó una disminución del pH hasta las 6 h de incubación con un menor aumento ($p < 0.05$) en la concentración de ácido láctico de 11.5 mmol L⁻¹. Se estima, que la disponibilidad o contenido de carbohidratos de fácil fermentación fue menor en el medio DAG-FR que en el medio GCA-FR.

Concentraciones ruminales de ácido láctico por encima de 20 mM son asociadas con pH ≤ 5.0 , aunque aumente la concentración de ácido láctico a 80 mM el pH del rumen no desciende más allá de 4.35 (Briggs *et al.*, 1957). En vacas adultas con acidosis ruminal subclínica, la concentración de ácido láctico aumenta a 40 mmol L⁻¹ (Dawson *et al.* 1997). En este estudio, la concentración de ácido láctico aumentó ($p \leq 0.05$) 54.1 y 67.1 mmol L⁻¹ cuando el pH disminuyó a 5.8 y 5.4, a las 4 y 6 h de incubación, respectivamente, por tanto, se puede afirmar, que esta prueba *in vitro* usando un medio GCA-FR, predice la posibilidad de una acidosis ruminal subclínica. Sin embargo, cuando se usó el medio DAG-FR, la concentración de ácido láctico, fue de tan solo 11.5 mmol L⁻¹ cuando se declaró un pH ácido de 5.4 (Cuadro 2.4), por tanto, el uso del medio DAG-FR, no es adecuado para predecir una acidosis ruminal láctica *in vivo*. En el medio DAG, la menor producción de ácido láctico, puede estar asociada al tipo de fermentación bacteriana del almidón por parte de las bacterias ruminales amilolítica (Walker *et al.*, 1965). Es muy probable, que la fermentación de la glucosa liberada del almidón del medio DAG-FR, se fermento usando una ruta heterofermentativa, como resultado, además de ácido láctico se produjo ácido acético (Kandler, 1983 y Poolman, 1993).

Cuadro 2.4. Producción de ácido láctico (mmol/L⁻¹) y pH en medios de cultivo con glucosa al 0.5% (GCA-FR) y de dieta alta en granos (DAG-FR) durante los diferentes tiempos (h) de incubación.

Medio	Tiempo (h)	pH	Ácido láctico (mmol L ⁻¹)
GCA-FR + glucosa 0.5%	0	6.7 ^a	0.0 ^f
	3	6.5 ^b	10.2 ^d
	4	5.8 ^d	54.1 ^b
	5	5.4 ^e	62.8 ^{ab}
	6	5.4 ^e	67.1 ^a
DAG-FR	0	6.8 ^a	0.0 ^f
	3	6.4 ^b	7.9 ^e
	4	6.0 ^c	0.0 ^f
	5	6.0 ^c	18.8 ^c
	6	5.4 ^e	11.5 ^d
EMM		0.10	3.93

Valores promedio con distinta letra en una misma columna son diferentes ($p \leq 0.05$); EEM=error estándar del valor promedio.

El pH tuvo una correlación negativa con la producción ácido láctico, al aumentar la producción de ácido láctico, el pH en los medios de cultivo disminuye. Considerando que el lactato es un ácido fuerte ($pK_a = 3.8$), dona protones al medio y su producción, disminuye el pH (Millen *et al.*, 2016). Cuando el ácido láctico se acumula en el rumen, el flujo glucolítico incrementa (Counotte y Prins 1981). Las BAL como *S. bovis* pueden fermentar hasta 3g de glucosa L⁻¹ de medio de cultivo y producir hasta 40.35 mM ácido láctico (Chen *et al.*, 2016), de igual forma, utiliza maltosa a una tasa de dilución máxima de 0.36 moléculas por hora (Russell *et al.*, 1981).

Cuadro 2.5 Coeficiente de correlación entre pH y ácido láctico (mmol L⁻¹).

	pH	Ácido láctico
pH	1	-0.74719 [†]
ácido láctico		1

[†]Coeficiente significativo ($p \leq 0.0001$); pH, medido durante 6 h de incubación, ácido láctico (mmol L⁻¹).

2.6 CONCLUSIONES

El medio de cultivo GCA-FR + glucosa 0.05% inoculado con bacterias ruminales, mostro sensibilidad para simular una acidosis láctica expresada con una acidificación del pH de 6.7 a 5.8 y un aumento en la concentración de ácido láctico de 0 a 54.1 mmol L⁻¹ de las 0 a las 4h de incubación. El medio de cultivo preparado con una dieta alta en granos (DAG-FR), mostró menor sensibilidad para simular una acidosis láctica. El pH presenta una correlación negativa con la producción ácido láctico. El medio de cultivo GCA-FR+0.05% de glucosa, tiene potencial para estudios relacionados con la evaluación y control de la acidosis ruminal subclínica.

2.7 LITERATURA CITADA

- Allen, M. S. 1997. Relationship between fermentation acid production in the rumen and the requirement for physically effective fiber. *Journal of dairy science* 80 (7): 1447-1462.
- Asanuma, N., Iwamoto, M., & Hino, T. 1999. Structure and transcriptional regulation of the gene encoding pyruvate formate-lyase of a ruminal bacterium, *Streptococcus bovis*. *Microbiology* 145(1): 151-157.
- Aschenbach, J. R., Penner, G. B., Stumpff, F., & Gäbel, G. 2011. Ruminant nutrition symposium: Role of fermentation acid absorption in the regulation of ruminal pH. *Journal of Animal Science* 89(4): 1092-1107.
- Barker, S. B., & Summerson, W. H. 1941. The colorimetric determination of lactic acid in biological material. *Journal of Biological Chemistry* 138:535-554.

- Briggs, P. K., Hogan, J. P., & Reid, R. L. 1957. Effect of volatile fatty acids, lactic acid and ammonia on rumen pH in sheep. *Australian Journal of Agricultural Research* 8(6): 674-690.
- Chen, L., Luo, Y., Wang, H., Liu, S., Shen, Y., & Wang, M. 2016. Effects of Glucose and Starch on Lactate Production by Newly Isolated *Streptococcus bovis* S1 from Saanen Goats. *Applied and Environmental Microbiology* 82(19): 5982-5989.
- Cobos M. A., M. Pérez-Sato, J. Piloni-Martini, S. S. González, and J. R. Bárcena. 2007. Evaluation of diets containing shrimp shell waste and an inoculum of *Streptococcus milleri* on rumen bacteria and performance of lambs. *Animal Feed Science and Technology* 132:324-330.
- Counotte, G. H., & Prins, R. A. 1981. Regulation of lactate metabolism in the rumen. *Veterinary Research Communications* 5(1): 101-115.
- Dawson, K. A., Rasmussen, M. A., & Allison, M. J. 1997. Digestive disorders and nutritional toxicity. In *The Rumen Microbial Ecosystem* Springer Netherlands (pp. 633-660)
- Hungate, R. E. 1950. The anaerobic mesophilic cellulolytic bacteria. *Bacteriology Review* 14:1-49.
- Kandler, O. 1983. Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 49(3): 209-224.
- Kenney, N. M., Vanzant, E. S., Harmon, D. L., & McLeod, K. R. 2015. Direct-fed microbials containing lactate-producing bacteria influence ruminal fermentation but

- not lactate utilization in steers fed a high-concentrate diet. *Journal of Animal Science* 93(5): 2336-2348.
- Kung, L., & Hession, A. O. 1995. Preventing *in vitro* lactate accumulation in ruminal fermentations by inoculation with *Megasphaera elsdenii*. *Journal of Animal Science*.
- Mackie, R. I., Gilchrist, F. M., Robberts, A. M., Hannah, P. E., & Schwartz, H. M. 1979. Microbiological and chemical changes in the rumen during the stepwise adaptation of sheep to high concentrate diets. *Journal of Agricultural Science*, 90(2), 241-254.
- Madrid, J., Martínez-Teruel, A., Hernández, F., & Megías, M. D. 1999. A comparative study on the determination of lactic acid in silage juice by colorimetric, high-performance liquid chromatography and enzymatic methods. *Journal of Science of Food and Agriculture* 79(12): 1722-1726.
- Millen, D. D., Pacheco, R. D. L., da Silva Cabral, L., Cursino, L. L., Watanabe, D. H. M., & Rigueiro, A. L. N. 2016. Ruminal Acidosis. In *Rumenology* (pp. 127-156). Springer International Publishing.
- Poolman, B. 1993. Energy transduction in lactic acid bacteria. *FEMS microbiology reviews* 12(1-3), 125-147.
- Russell, J. B., Cotta, M. A., & Dombrowski, D. B. 1981. Rumen bacterial competition in continuous culture: *Streptococcus bovis* versus *Megasphaera elsdenii*. *J. Applied and Environmental Microbiology*, 41(6), 1394-1399.
- Sad, M. E., Peña, L. G., Padró, C. L., & Apesteguía, C. R. 2017. Selective synthesis of acetaldehyde from lactic acid on acid zeolites. *Catalysis Today*.

- SAS. Institute Inc. 2011. Statistical Analysis System, SAS, User's Guide: SAS Inst., Cary, NC. pp: 3154-3339.
- Sykes, G. 1969. Chapter III Methods and Equipment for Sterilization of Laboratory Apparatus and Media. *Methods in Microbiology*, 1, 77-121.
- Taylor, K. A. 1996. A simple colorimetric assay for muramic acid and lactic acid. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 56(1), 49-58.
- Tung, R. S., & Kung, L. 1993. *In vitro* Effects of a Thiopeptide and Monensin on Ruminant Fermentation of Soluble Carbohydrates¹. *Journal of Dairy Science*, 76(4), 1083-1090.
- Walker, G. J. 1965. The cell-bound α -amylases of *Streptococcus bovis*. *Biochemical Journal*, 94(2), 289.

CAPITULO III. EFECTO *IN VITRO* DE ADITIVOS MICROBIANOS PARA REDUCIR LA ACIDOSIS LÁCTICA

3.1 RESUMEN

El objetivo de este experimento fue comparar *in vitro* la capacidad de tres aditivos microbianos comerciales para evitar la acidificación de un medio de cultivo anaerobio formulado con una dieta alta en granos (DAG) inoculada con bacterias ruminales. El tratamiento control (T1) no contenía aditivos, el T2= T1 + bicarbonato de sodio (control positivo), T3= T1+ Probios Precise® (contiene *Enterococcus faecium* EF212), T4= T1+P-one™ (contiene *Pediococcus pentosaceus*, *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus brevis*) y T5= T1+DCP™ (*Propionibacterium freudenreichii*). A las 4 h de incubación solamente T1, T2 y T3 lograron mantener el pH ≥ 6.0 . A las 6 h de incubación, ningún aditivo logro mantener el pH del medio de cultivo DCP arriba de 6.0. En general, la concentración de ácido láctico aumento con el tiempo de incubación y mostró una correlación negativa con el pH. La concentración de ácido acético, propiónico y butírico en todos los periodos evaluados, fue mayor ($p \leq 0.05$) a las 4h con valores promedio de 21.92¹, 10.48, y 6.76 mM L⁻¹, respectivamente. La concentración de bacterias ruminales totales (BRT) aumentó ($p \leq 0.05$) desde la 3h en los medios de cultivo con los aditivos microbianos (T3, T4 y T5). La concentración de bacterias ácido lácticas (BAL) tendió a aumentar, sin diferencias significativas entre tratamientos ($p \geq 0.05$). La degradación *in vitro* de la materia seca (DEGMS) de la dieta alta en granos (DAG) a las 48h fue similar ($p \geq 0.05$) en todos los tratamientos con valores entre 71.7 y 78.5. Se concluye, que a la dosis evaluada, los

aditivos microbianos usados no previenen la acidificación, ni mejora la DEGMS de un medio de cultivo que simula una dieta alta en granos.

Palabras claves: acidosis, aditivos microbianos, pH, ácido láctico, bacterias ácido lácticas.

ABSTRACT

The objective of this experiment was to compare *in vitro* the capacity of three commercial microbial additives to avoid the acidification of an anaerobic culture medium formulated with a high-grain diet (DAG) and inoculated with ruminal bacteria. The control treatment (T1) did not contain additives, T2 = T1 + sodium bicarbonate (positive control), T3 = T1 + Probios Precise® (contains *Enterococcus faecium* EF212), T4 = T1 + P-one TM (contains *Pediococcus pentosaceus*, *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus brevis*), and T5 = T1 + DCP TM (contains *Propionibacterium freudenreichii*). After 4 h of incubation only T1, T2 and T3 maintained the pH \geq 6.0. At 6 h of incubation, no additive maintained the pH of the DCP culture medium above 6.0. In general, the concentration of lactic acid increased with the incubation time and showed a negative correlation with the pH. The concentration of acetic, propionic and butyric acid in all periods evaluated was higher ($p \leq 0.05$) at 4h with average values of 21.92, 10.48, and 6.76 mM L⁻¹, respectively. The concentration of total rumen bacteria (BRT) increased ($p \leq 0.05$) from 3h in the culture media with the microbial additives (T3, T4 and T5). The concentration of lactic acid bacteria (BAL) tended to increase, without significant differences between treatments ($p \geq 0.05$). The *in vitro*

degradation of the dry matter (DEGMS) of the high-grain diet (DAG) at 72 h of incubation, was similar ($p \geq 0.05$) among treatments with values ranging between 71.7 and 78.5. It is concluded that, at the evaluated dose, the commercial microbial additives used do not prevent acidification, and do not improve the DEGMS of a culture medium that simulates a high-grain diet for ruminants.

Key words: Acidosis, microbial additives, rumen pH, lactic acid bacteria.

3.2 INTRODUCCIÓN

En los rumiantes alimentados con una dieta alta en forrajes y baja en carbohidratos de fácil fermentación, se establece un balance entre los microorganismos ruminales productores y utilizadores de ácido láctico, y, entre la producción de ácidos orgánicos (acético, propiónico, butírico y láctico) y su salida del rumen vía sanguínea; como resultado, se evita la acumulación de ácidos en el rumen. Sin embargo, cuando se pierde el balance, el ácido láctico se acumula y el pH ruminal se acidifica (Walker *et al.*, 1965; Aschenbach *et al.*, 2011; Kenney *et al.*, 2015; Nagaraja, 2016). El término alimentación directa con microorganismos (DFM, direct feed microorganisms), se usa para indicar el uso de microorganismos vivos como suplemento dietético, que una vez en el interior del tubo digestivo, van a tener un efecto benéfico, ya sea nutricional o controlando el crecimiento de otros microorganismos (Heyman *et al.*, 2002; Katherine, 2017). Cuando los DFM, tienen un efecto en la población o actividad de otros microorganismos, se conocen con el nombre de probióticos. Los probióticos que contienen bacterias utilizadoras de ácido láctico puede evitar el descenso del pH en casos de acidosis ruminal (Russell y Wilson, 1996; Ghorbani *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2004; Plaizier *et al.*, 2009).

Para el control de la acidosis ruminal, se han evaluado experimentalmente, probióticos formulados con bacterias de los géneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus* (Ghorbani *et al.*, 2002; Chiquette *et al.*, 2012), *Streptococcus*, *Bacillus*, *Propionibacterium* (Ghorbani *et al.*, 2002), *Megasphaera elsdenii* (Long *et al.*, 2014), y *Prevotella bryantii* (Chiquette *et al.*, 2008). La característica general de estas bacterias es que, dependiendo de las condiciones químicas del ambiente en que se desarrollan, pueden producir o utilizar ácido láctico (Seo *et al.*, 2010). También, se han usado probióticos que contienen levaduras (Jiao *et al.*, 2017) y hongos (Shen *et al.*, 2017). El objetivo de este experimento fue evaluar la capacidad de tres probióticos microbianos comerciales, para reducir la acidosis láctica en un medio de cultivo anaerobio preparado con una dieta alta en granos y fluido ruminal (DAG-FR)

3.3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.3.1. Ubicación geográfica del estudio

El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Microbiología Ruminal y Genética Microbiana del programa de Ganadería, Colegio de Postgraduados, ubicado en Montecillo, Texcoco, Estado de México.

3.3.2. Medio de cultivo anaerobio con dieta alta en granos (DAG-FR)

Se formuló una dieta alta en granos (DAG) para ovinos en engorda, con los ingredientes indicados en el Cuadro 3.1. La DAG contenía 44.8 g de sorgo y 27.5 gr de maíz por cada 100 g de producto, en total, 72.3 g de cereales por cada 100 g de MS.

Cuadro 3.1 Composición de la dieta alta en granos (DAG)

Ingrediente	g/ kg BS
Sorgo	448
Maíz	275
Harina de soya	139
Silo de Maíz	57
Rastrojo de maíz	61
Mezcla mineral ^a	20
EM (Mcal Kg ⁻¹) ^b	2.9
PC (%) ^b	12.0

^a Contiene por cada 1000g, calcio, 130g; fosforo, 50g; sodio, 109 g, cloro 200g; hierro, 4.3g; magnesio, 3.3g; manganeso, 0.2 g; cobre, 0.08 g; cobalto, 0.067g; yodo, 0.004g; zinc, 0.008 g.

^b De acuerdo a los requerimientos nutricionales para engorda de borregos, NRC 2007.

En 30 tubos de cultivo de 18 x 150 mm (Pyrex®, EUA), se agregaron 0.2 g de la DAG y 9 mL del medio de cultivo DAG-FR (Cuadro 3.2), el llenado de los tubos de cultivo se realizó bajo flujo de CO₂. Posteriormente, se esterilizaron en una autoclave a 121 °C y 15 PSI durante 15 min y se incubaron a 39 °C por 24 h para comprobar su esterilidad (Hungate, 1950; Cobos *et al.*, 2007).

3.3.3. Aditivos microbianos para reducir acidosis láctica

Los tres aditivos microbianos comerciales evaluados fueron:

1) Probios Precise® (Chr. Hansen, EUA) contiene la especie *Enterococcus faecium*-EF212,

2) P-one™ (Priority IAC™, EUA) contiene un consorcio bacteriano de las especies *Pediococcus pentosaceus*, *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus brevis*, y

3) DCP™ (Priority IAC™, EUA) contiene la bacteria *Propionibacterium freudenreichii*.

En vacas lecheras, la dosis diaria recomendada de estos aditivos microbianos es de 2g de Probios Precise®, 28 g de P-one™, y 28 g de DCP™. La dosis usada en los experimentos *in vitro* se calculó, considerando vacas adultas de 500 Kg de peso vivo con volumen ruminal de 90 L (Silanikove y Tadmor, 1989). De acuerdo con el tratamiento, se agregaron 10µL de una solución de Probios Precise® con una concentración de 22.2 mg/mL, 100 µL de una solución de P-one™ con una concentración de 31.1 mg/mL, y 100 µL de una solución de DCP™ con una concentración de 31.1 mg/mL en tubos de cultivo que contenían 9 mL de medio de cultivo DAG-FR.

Cuadro 3.2 Medios anaerobio DAG-FR (Hungate, 1950; Cobos *et al.*, 2007).

Componente	DAG-FR/100 mL
Extracto de levadura, g	0.1
Tripticasa-peptona, g	0.2
Dieta alta en granos, g	0.2
Solución mineral I ^a , mL	5.0
Solución mineral II ^b , mL	5.0
Líquido ruminal clarificado ^c , mL	30.0
Solución de cisteína-sulfido ^d , mL	2.0
Solución de carbonato de sodio al 8 %, mL	5.0
Agua destilada, mL	52.6
Solución de resarzurina al 0.1 %, mL	0.1

^a Contiene por 1000 mL K₂HPO₄, 6.0 g.

^b Contiene por 1000 mL K₂HPO₄, 6.0 g; (NH₄)₂SO₄, 6 g; NaCl, 12 g; MgSO₄, 2.45 g y Ca Cl₂·2H₂O, 1.6 g.

^c Previamente filtrado a través de gasa y centrifugado a 23,000 g por 20 min a 8°C y esterilizado a 15 psi por 15 min.

^d Se disolvieron 2.5 g de L-cisteína- HCl·2H₂O en 50 mL de H₂O destilada, ajustando el pH de la mezcla a 10 con NaOH (2N); se agregaron 2.5 g de Na₂S·9H₂O y se aforó a 200 mL con H₂O destilada; la solución estuvo en ebullición por 5 min con flujo de N₂ y se depositó en tubos con tapón de neopreno.

3.3.4. Tratamientos experimentales

Los cinco tratamientos evaluados fueron: T1= Testigo, inoculado con el sobrenadante de FR centrifugado, sin aditivos; T2= T1+1% de bicarbonato de sodio, (NaHCO₃; Cobos *et al.*, 2005; Merk[®], EUA) T3= T1+Probios Precise[®] (Chr. Hansen, EUA), T4= T1+ P-one[™] (Priority IAC[™], EUA), T5= T1+DCP[™] (Priority IAC[™], EUA). Cada tratamiento tuvo 3 repeticiones y los tiempos de evaluación de las variables consideradas fueron a las 0, 3, 4, 5 y 6h de incubación a 39°C en una incubadora Heratherm OMH180 (Thermo Fisher Scientific, EUA).

3.3.5. Evaluación de variables microbiológicas

Para el conteo directo de bacterias ruminales 1 mL de medio de cultivo de cada tratamiento, fue fijado con 0.25 mL (proporción 4:1) de una solución de formaldehído al 10% (J.T.Baker, EUA). Para el conteo bacteriano se usó una cámara Petroff-Hausser (Hausser Scientific, EUA) y un microscopio de contraste Olympus BX51 (Olympus, Japón) a una magnificación de 1000x (Harrigan y McCance, 1979). Los conteos se realizaron a las 0, 3, 4, 5 y 6 h de incubación. La fórmula para estimar la concentración de bacterias ruminales totales por mL de medio de cultivo fue la siguiente:

$$\text{Bacterias ruminales totales mL}^{-1} = (\bar{X}) (\text{F.D}) (2 \times 10^7)$$

Dónde:

\bar{X} = número de bacterias contabilizadas en la cámara Petroff-Hausser.

F.D = factor de dilución.

2×10^7 = factor del volumen de la cámara Petroff-Hausser.

Para estimar la concentración de bacterias ácido lácticas a las 0, 3 y 6 h de incubación, se hicieron diluciones seriadas (10^{-1} hasta 10^{-12}) en el medio líquido MRS (Man-Rogosa-Sharp; Difco®, EUA; Cuadro 3.3). Posteriormente, se inocularon con rastrillo 10 μ L de cada dilución en cajas Petri con medio sólido MRS, se incubaron a 37°C, 24 h y se contaron las colonias crecidas (Harrigan y McCance, 1979; Doré *et al.*, 1995; Herigstad *et al.*, 2001).

Cuadro 3.3. Componentes del medio de cultivo Agar MRS^a.

Componente	g/L
Proteasa Peptona	10
Extracto de carne	10
Extracto de levadura	5.0
Dextrosa	20
Polisorbato 80	1.0
Citrato amónico	2.0
Acetato de sodio	5.0
Sulfato de Magnesio	0.1
Sulfato de Manganeso	0.05
Fosfato dipotásico	2.0
Agar	15

^aDifco®, EUA

3.3.6. Evaluación de variables fermentativas

De cada una de las repeticiones se midió pH a las 0, 3, 4, 5 y 6 h, con un potenciómetro Orion 250A (Thermo Fisher Scientific, EUA) calibrado a pH 4 y 7. El ácido láctico se determinó por el método colorimétrico (Taylor, 1996; Madrid *et al.*, 1999), 1mL de muestra fue dosificado en tubos de cultivo de 20 mm x 150 mm con tapón de rosca (Kimble Glass®, EUA). En seguida, se agregaron 6mL de ácido sulfúrico al 96 % (J.T.Baker®, EUA). Se calentó la muestra a 96°C por 15 min en un calentador seco

(Diagger, EUA), al término, los tubos de cultivo se enfriaron a temperatura ambiente. A continuación, se agregaron 100µL de sulfato de cobre al 4% (Sigma Aldrich®, EUA) y 200µL de 1.5% parafenilfenol (Sigma Aldrich®, EUA) en 95% de etanol Fermont (PQM, México). La mezcla de estos materiales, fue agitada con un vortex (VWR®, EUA), y se dejó en reposo por 30 min a temperatura ambiente. Finalmente, la lectura de absorbancia se realizó a una longitud de onda de 570nm en un espectrofotómetro Lambda 40 UV-VIS (Perkin Elmer, EUA).

La concentración de AGV se determinó a las 0, 3, 4, 5 y 6h de incubación, en un cromatógrafo de gases Clarus 500 (Perkin Elmer®, EUA) equipado con detector de ionización de flama y columna capilar (Elite FFAP, Perkin-Elmer, EUA). Se usó nitrógeno como gas acarreador. Las temperaturas del horno, inyector y columna fueron 120, 250 y 250 °C, respectivamente y se inyectó 1 µL de muestra (Cobos *et al.*, 2007). Previo al análisis, 1mL de cada medio de cultivo, se depositó en un tubo Eppendorf (Eppendorf, Alemania), se adicionaron 0.25 mL de ácido metafosfórico al 25 % y se centrifugaron a 18,800 X g por 10 min en una centrifuga (Hettich® EBA 21, Alemania), 1.5 mL del sobrenadante se colocó en viales para cromatografía (Perkin Elmer, EUA).

3.3.7. Degradación *in vitro* de la materia seca (%DEGMS) de la dieta alta en granos

La DAG fue molida (Molino Thomas Wiley # 4, EUA) con una criba de 1 mm y pulverizada (Pulverizador Fritsch, Alemania). La DAG pulverizada y filtros de papel (Whatman® Núm. 541, EUA) se secaron en una estufa (Riossa y México) por 48 h a 70°C, se dejaron en una desecadora (PIREX®, Estado Unidos de Norteamérica) por 24 h, y se registró su peso constante. Se depositaron 0.2 g de DAG en tubos de cultivo de 18 x 150 mm y se esterilizaron a 121°C y 15 PSI por 15 min. Al término, se agregaron, en cada tubo, 9 mL

de medio de cultivo estéril bajo flujo de CO₂ y se incubaron 24 h para verificar esterilidad. Los medios de cultivo se inocularon con 1 mL del sobrenadante de FR centrifugado y se incubaron a 39 °C. Cada serie se incubo por 24, 48 y 72 h. La degradación *in vitro* de la MS (DEGMS), se calculó como la diferencia entre la materia seca inicial y la residual (Getachew *et al.*, 2004) considerando la siguiente formula:

$$\% \text{ de DEGMS} = \left[\frac{\text{peso inicial} - \text{peso final}}{\text{peso inicial}} \right] \times 100$$

3.3.8 DISEÑO Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El diseño experimental fue completamente al azar. Con cinco tratamientos y tres repeticiones (Sin aditivo, NaHCO₃, Probios Precise[®], P-one[™], DCP[™]). Los promedios se ajustaron por mínimos cuadrados para compararlos con la prueba de Tukey (p≤0.05). Las variables de pH, ácido láctico, AGV y BRT se relacionaron usando la correlación de Pearson (p≤0.05; SAS Institute Inc., 2011).

3.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A pesar de que los tratamientos T4 (P-one[™]) y T5 (DCP[™]) contienen bacterias consumidoras de ácido láctico (Russell y Wilson, 1996; Ghorbani *et al.*, 2002; Goto *et al.*, 2016), el pH disminuyó (p≤0.05) a 6.2 a las 3h de incubación, en los medios de cultivo inoculados con FR (Cuadro 3.4). Para las 4h solo el T3 (Probios Precise[®]) mantiene un pH de 6.2 que resulto mayor (p≤0.05) al de los tratamientos T4 y T5. El tratamiento T3 Probios), contiene *Enterococcus faecium*-EF212, que estimula la actividad de bacterias consumidoras ácido láctico (Seo *et al.*, 2010). Después de 6h de incubación, ningún tratamiento logro mantener un pH mayor a 6.0. Los tratamientos T1 (Testigo), T2

(NaHCO₃) fueron los que presentaron el pH más bajo (5.5), seguido del T4 (5.6), debido a la fermentación por parte de bacterias amilolíticas que produce ácido láctico y disminuye pH (Walker *et al.*, 1965; Aschenbach *et al.*, 2011). El 50% de la capacidad buffer del bicarbonato de sodio se pierde cuando el pH del medio tiene el mismo valor de su pKa=6.1 (Allen, 1997), probablemente la capacidad amortiguadora del T2 fue superada desde las 4h de incubación. En el T4, el descenso del pH pudo favorecer el crecimiento de bacterias ácido lácticas tolerantes a la acidificación que tienen la capacidad de crecer en pH de 4.4 (Reddy *et al.*, 2008).

La producción ruminal de ácido láctico se asocia principalmente con la fermentación del almidón (Walker *et al.*, 1965; Allen, 1997). En vacas lecheras sanas, la concentración ruminal de ácido láctico es de 5 mmol L⁻¹, cuando se presenta una acidosis ruminal, la concentración puede aumentar a 40 mmol L⁻¹ (Dawson *et al.* 1997). En este estudio, la concentración de ácido láctico fue mayor a las 3h (55-62 mM L⁻¹) en los tratamientos T3, T4 y T5, que en T1 y T2 (p≤0.05). Este comportamiento se conservó a las 6 h de incubación. La producción de ácido láctico en rumen, se relaciona con un mayor flujo glucolítico (Counotte y Prins, 1981). *Streptococcus bovis* produce 10 veces más ácido láctico, a una tasa máxima de 0.36 moléculas de maltosa por hora bajo una ruta homofermentativa (Russell *et al.*, 1981; Reddy *et al.*, 2008). El bicarbonato de sodio es un amortiguador común en la alimentación de rumiantes con dietas altas en granos (Russell y Chow, 1993; Mooney y Allen, 2007; Goto *et al.*, 2016). El NaHCO₃ tiene la capacidad de utilizar H⁺ presente en el medio ácido (Russell and Chow, 1993) por tanto, mantiene el pH para la proliferación de bacterias consumidoras de ácido láctico (Reddy *et al.*, 2008). Se esperaba en el T5 (DCP™) una reducción en la concentración de ácido

láctico, mediante su transformación a ácido propiónico por acción de la bacteria *Propionibacterium freudenreichii* (Peters *et al.*, 1990; Luo *et al.*, 2017), lo que no sucedió, bajo las condiciones experimentales de este estudio.

Cuadro 3.4. Producción de pH, ácido láctico, ácidos grasos volátiles (mM L⁻¹) y concentración total de bacterias ruminales (BRT) en los tratamientos evaluados, durante 0, 3, 4,5 y 6 h de incubación a 39°C.

Trat	Hr	pH	Ácido	Acet	Prop	But	AGV	BRT
			láctico				totales	x 10 ⁹
			mM L ⁻¹					
T1	0	6.7ab	42.1ij	8.4hg	2.7jk	1.0j	12.1kl	0.43fgh
	3	6.5bc	40.5j	10.7fgh	4.8gh	2.9fg	18.4i	0.97def
	4	6.0efg	40.9ij	21.0b	10.3bc	6.7c	38.1bc	1.22bcde
	5	6.0efg	62.9bc	18.1c	6.9ef	2.5ghi	27.4gh	1.53abc
	6	5.5j	53.6fgh	13.9de	7.2ef	4.3d	25.4h	1.77ab
T2	0	6.5abc	18.7k	11.0efg	4.9hg	3.0fg	18.9i	0.45fgh
	3	6.4cd	48.1ih	9.7fgh	4.7hg	3.0gf	17.4i	0.90efg
	4	6.0efg	35.3j	26.0a	13.4 ^a	9.0a	48.3a	1.52abcd
	5	6.1efg	60.4cdef	19.5bc	7.7ed	2.7fgh	29.9efg	1.55abc
	6	5.5j	53.9efgh	14.1d	7.2de	4.3d	25.6gh	1.67abc
T3	0	6.8 ^a	9.4l	7.8h	2.5ef	0.8j	11.1l	0.34h
	3	6.5abc	62.0bcd	9.3fgh	3.0ijk	1.0j	13.3jkl	1.30bcde
	4	6.2ef	50.6gh	20.7bc	9.0cd	4.1de	33.8cde	1.72abc
	5	6.1efg	68.7ab	19.0bc	7.6de	3.0fg	29.6efgh	1.77ab
	6	5.7ij	61.6bcd	11.8def	4.9gh	1.9hi	18.7i	1.60abc
T4	0	6.6abc	13.1kl	10.2fgh	4.5gh	2.9fgh	17.6ij	0.33h
	3	6.2ef	62.0bcd	11.1defg	5.0gh	3.1efg	19.2i	1.17cde
	4	5.9ghi	51.1gh	20.2bc	9.9c	6.7c	36.9bcd	1.58abc
	5	5.9ghi	63.9abc	19.0bc	7.4e	2.9fgh	29.3fgh	1.63abc
	6	5.6j	70.5a	10.9efg	4.2c	1.6ji	16.7ij	1.67abc
T5	0	6.6abc	19.6k	10.5fgh	4.6gh	2.9fg	18.1i	0.37gh
	3	6.2ed	55.4defg	9.7fgh	4.1hi	2.3ghi	16.2jik	1.23bcde
	4	5.6j	38.9j	21.7b	11.6b	7.7b	41.1b	1.98 ^a
	5	5.9fgh	61.0cde	20.1bc	9.5hi	3.7def	33.2def	1.55abc
	6	5.7hij	65.0abc	11.9def	5.8fg	2.2ghi	19.8i	1.50abcd
EEM		0.05	2.02	0.6	0.33	0.24	1.1	0.06

Valores promedio con distinta letra en una columna son diferentes ($p \leq 0.05$); EEM=error estándar del valor promedio. Trat = Tratamientos experimentales: T1= Tratamiento

testigo inoculado con el sobrenadante de FR filtrado y centrifugado, T2= T1+1% de bicarbonato de sodio, T3= T1+Probios Precise[®], T4= T1+ P-one [™], T5= T1+DCP

La mayor ($p \leq 0.05$) concentración de ácido acético, propiónico y butírico, con respecto al tiempo se presenta a las 4 h con una concentración promedio de 21.92 mM L⁻¹, 10.48 mM L⁻¹ y 6.76 mM L⁻¹, respectivamente, siendo el T2 el que presentó la mayor ($p \leq 0.05$) concentración de cada AGV. La concentración de ácido propiónico y butírico fue mayor ($p \leq 0.05$) en el T5 (DCP™) que contiene la bacteria consumidora de ácido láctico *Propionibacterium freudenreichii*, además, tiene la ventaja de producir los ácidos propiónico y acético, que son usados como fuente de energía por el rumiante (Peters *et al.*, 1990). Se ha reportado que un aditivo microbiano a base de *Propionibacterium* P169 y levaduras, adicionado a la dieta de novillos de engorda por 21 días, incrementó la proporción molar del ácido propiónico en 9.7% con respecto al tratamiento testigo (Lehloenya *et al.*, 2008). En otro estudio se determinó que un aditivo de *P. freudenreichii* PF 2207 produce la mayor ($p \leq 0.05$) concentración de ácido propiónico (41.46 mmol L⁻¹) y acético (38.17 mmol L⁻¹) a las 48 h de incubación (Luo *et al.*, 2017).

Todos los tratamientos mostraron un aumento en la concentración de bacterias ruminales totales a las 6 h de incubación sin diferencias significativas ($p > 0.05$) entre tratamientos. Se estima que se produjo una sucesión bacteriana hacia el desarrollo de una población bacteriana ácido-tolerante (Russell y Baldwin, 1979). Por tanto, no se presentan los efectos negativos de la acidificación sobre la concentración de bacterias totales (Russell y Dombrowski, 1980).

De acuerdo con el coeficiente de correlación entre las variables medidas, al aumentar la producción de ácido láctico y AGV el pH se acidifica (Cuadro 3.5), de igual forma, un aumento en la concentración de BRT se asocia con una disminución del pH en el medio de cultivo. Los AGV producidos el rumen, pueden ser producto del metabolismo

microbiano del ácido láctico, en particular, se ha demostrado la producción de ácido propiónico a partir de ácido láctico (Gill *et al.*, 1986).

Cuadro 3.5. Coeficientes de correlación entre las variables fermentativas y microbiológicas en los factores evaluados.

	pH	Ácido láctico	Acético	Propiónico	Butírico	AGV Totales	BRT
pH	1	-0.59 [†]	-0.48 [†]	-0.54 [†]	-0.42 [†]	-0.50 [†]	-0.82 [†]
Láctico		1	0.21 [¶]	0.12 [¶]	-0.13 [¶]	0.12 [¶]	0.73 [†]
Acético			1	0.95 [†]	0.77 [†]	0.98 [†]	0.62 [†]
Propiónico				1	0.91 [†]	0.99 [†]	0.58 [†]
Butírico					1	0.89 [†]	0.37 [†]
AGV Total						1	0.58 [†]
BRT							1

[†]Coeficiente significativo ($p \leq 0.05$); [¶] Coeficiente no significativo ($p \geq 0.05$); producción de ácido láctico, acético, propiónico y butírico (mM L^{-1}), bacterias ruminales totales (BRT) y pH a las 0, 3, 4, 5 y 6 h de incubación.

Sin embargo, en este estudio no se detectó una correlación negativa entre los ácidos lácticos y propiónico. Posiblemente, como lo explica Kenney *et al.* (2015), el aumento de bacterias productoras de ácido láctico superó el de las bacterias consumidoras de este ácido. (Dijkstra *et al.*, 2012).

La concentración de bacterias ácido lácticas con o sin aditivos microbianos aumentó desde las 3 h y para las 6 h la concentración llega a valores entre 1×10^{13} y 1.5×10^{14} bacterias mL^{-1} del medio MRS. Sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticas entre tratamientos. Se ha reportado que el uso de probióticos de bacterias ácido lácticas, permite que los microorganismos del rumen se adapten al consumo de lactato y eviten la acumulación en rumen de este ácido (Ghorbani *et al.*, 2002; Russell y Wilson, 1996).

Cuadro 3.6 Número más probable (NMP) de bacterias ruminales ácido lácticas (BAL) presentes en los tratamientos evaluados.

Tratamiento	Tiempo	Bacterias/mL medio MRS
T1	0	2.4×10^{11}
	3	2.4×10^{11}
	6	9.3×10^{13}
T2	0	2.0×10^{11}
	3	2.4×10^{11}
	6	1.1×10^{14}
T3	0	1.5×10^{10}
	3	2.9×10^{12}
	6	1.5×10^{14}
T4	0	4.3×10^{10}
	3	2.1×10^{13}
	6	1.5×10^{14}
T5	0	9.3×10^{10}
	3	3.6×10^{13}
	6	1.5×10^{14}

El cálculo del rango estadístico con 95% de confiabilidad se calcula usando la siguiente fórmula: número de bacterias = NMP / 4.68 a NMP x 4.68. T1= Tratamiento testigo inoculado con el sobrenadante de FR filtrado y centrifugado, T2= T1+1% de bicarbonato de sodio, NaHCO₃, T3= T1+Probios Precise® T4= T1+ P-one™, T5= T1+DCP™.

A las cero horas de incubación se determinó una DEGMS de 32.82%, que se explica como el material finamente molido que no fue retenido por el filtro de papel Whatman. Entre las 24 y 48 h de incubación la DEGMS fue similar ($p > 0.05$) entre los tratamientos, y ligeramente menor en el a las 48 y 72 h de incubación en T5 (DCP™) y T4 (P-one™), respectivamente.

A las 72 h de incubación, el T2 (bicarbonato de sodio) el que presentó la mayor degradación, sin embargo, no fue estadísticamente diferente (> 0.05) a la de los otros tratamientos. Por lo que se estima que lo aditivos evaluados no afectan, positiva o negativamente la DEGMS: La degradación ruminal que se determinó en todos los tratamientos, a las 24 h de incubación, es superior a la reportada de 54% en una dieta

adicionada con un probiótico a base de *Enterococcus faecium* EF212 y *Saccharomyces cerevisiae* (Beauchemin *et al.*, 2003). El bicarbonato de sodio es un amortiguador presente en la saliva, pero uso como aditivo para regular el pH ruminal, es común en animales alimentados con dietas con alto contenido de cereales (Russell and Chow, 1993).

Cuadro 3.7 Degradación *in vitro* de la materia seca en los tratamientos evaluados a 0, 24, 48, y 72 horas de incubación a 39°C.

Tratamiento	Hora	%DEGMS
	0	29.3h
1	24	61.4f
	48	72.5abcd
	72	76.6abc
	0	31.4h
2	24	62.3ef
	48	73.8abcd
	72	78.5a
3	0	27.8h
	24	62.4ef
	48	76.8abc
	72	77.4ab
4	0	35.3gh
	24	67.6edf
	48	70.9bcd
5	72	71.7abcd
	0	40.3g
	24	69.7cde
	48	71.4abcd
	72	76.2abc
EEM		2.3

Valores promedio con distinta letra en una columna son diferentes ($p \leq 0.05$); EEM=error estándar del valor promedio. T1= Tratamiento testigo inoculado con el sobrenadante de FR filtrado y centrifugado, T2= T1+1% de Bicarbonato de sodio, NaHCO_3 , T3= T1+Probios Precise[®], T4= T1+ P-one[™], T5= T1+DCP[™].

En este experimento, a pesar de que el T2 contenía 1% de bicarbonato de sodio, no se logró mantener el pH superior a 6.0 después de 6 h de incubación; sin embargo, fue este

tratamiento el que presento la mejor DEGMS a las 72 h de incubación. Posiblemente, las bacterias adaptadas a los cambios de pH conservaron su interacción iónica con las partículas del alimento facilitando su adherencia y degradación (McAllister *et al*, 1994).

3.5 CONCLUSIONES

Ninguno de los aditivos evaluados, logro mantener el pH arriba de 6.0 a las 6 h de incubación. El aditivo Probios Precise® (T3) a base de la bacteria *Enterococcus faecium*-EF212, es el que mantuvo mejor el pH del medio de cultivo con valores superiores a 6.0. Con relación al tratamiento testigo y después de 6 h incubación, los aditivos Probios Precise® (T3), P-one™ (T4) y DCP™ (T5), aumentaron ($p \leq 0.05$) la producción de ácido láctico y disminuyeron la producción total de AGV, resultado contrario a lo que se esperaba. Mientras que, la DEGMS no fue diferente entre el tratamiento testigo y los tratamientos con aditivos microbianos. Se concluye que, a la dosis usada, los aditivos evaluados no tienen un efecto benéfico para evitar la acidosis ruminal.

3.7 LITERATURA CITADA

- Allen, M. S. 1997. Relationship between fermentation acid production in the rumen and the requirement for physically effective fiber. *Journal of Dairy Science* 80(7):1447-1462.
- Aschenbach, J. R., Penner, G. B., Stumpff, F., Gäbel, G. 2011. Ruminant nutrition symposium: Role of fermentation acid absorption in the regulation of ruminal pH. *Journal of Animal Science* 89(4):1092-1107.

- Bailey, C. B., Balch, C.C. 1961. Saliva secretion and its relation to feeding in cattle. 2. The composition and rate of secretion of mixed saliva in the cow during rest. *British Journal of Nutrition* 15:383.
- Beauchemin, K. A., Yang, W. Z., Morgavi, D. P., Ghorbani, G. R., Kautz, W., Leedle, J. A. Z. 2003. Effects of bacterial direct-fed microbials and yeast on site and extent of digestion, blood chemistry, and subclinical ruminal acidosis in feedlot cattle. *Journal of Animal Science*. 81(6), 1628-1640.
- Chiquette, J., Allison, M. J., & Rasmussen, M. A. 2008. *Prevotella bryantii* 25A Used as a Probiotic in Early-Lactation Dairy Cows: Effect on Ruminal Fermentation Characteristics, Milk Production, and Milk Composition¹. *Journal of Dairy Science* 91(9): 3536-3543.
- Chiquette, J., Allison, M. J., Rasmussen, M. 2012. Use of *Prevotella bryantii* 25A and a commercial probiotic during subacute acidosis challenge in midlactation dairy cows. *Journal of Dairy Science* 95(10): 5985-5995.
- Cobos M. A., M. Pérez-Sato, J. Piloni-Martini, S. S. González, and J. R. Bárcena. 2007. Evaluation of diets containing shrimp Shell waste and an inoculum of *Streptococcus milleri* on rumen bacteria and performance of lambs. *Animal Feed Science and Technology* 132:324-330.
- Cobos-Peralta, M. A., Guerra-Medina, E., López-Garrido, S. J., Báez-Pérez, J. L., González-Muñoz, S. S., Mendoza-Martínez, G. D. 2005. Evaluación *in vitro* de dos amortiguadores y un ionóforo sobre variables fermentativas y microbiológicas. *Agrociencia*, 39(1):1-9.

- Counotte, G. H., Prins, R. A. 1981. Regulation of lactate metabolism in the rumen. *Veterinary Research Communications* 5(1):101-115.
- Dawson, K. A., Rasmussen, M. A., Allison, M. J. 1997. Digestive disorders and nutritional toxicity. In: *The rumen microbial ecosystem*. Springer Netherlands, pp. 633-660.
- Dijkstra, J., Ellis, J. L., Kebreab, E., Strathe, A. B., López, S., France, J., Bannink, A. 2012. Ruminant pH regulation and nutritional consequences of low pH. *Animal Feed Science and Technology* 172(1): 22-33.
- Doré, J., Morvan, B., Rieu-Lesme, F., Goderel, I., Gouet, P., Pochart, P. 1995. Most probable number enumeration of H₂-utilizing acetogenic bacteria from the digestive tract of animals and man. *FEMS Microbiology Letters* 130(1): 7-12.
- Emery, R. S., C. K. Smith, R. M. Grimes, C. F. Huffman, and C. W. Duncan. 1960. Physical and chemical changes in bovine saliva and rumen liquid with different hay-grain rations. *Journal of Dairy Science* 43:76
- Getachew G. P. H. Robinson, E. J. DePeters, and S. J. Taylor. 2004. Relationships between chemical composition, dry matter degradation and *in vitro* gas production of several ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology* 111:57-71.
- Ghorbani, G. R., Morgavi, D. P., Beauchemin, K. A., & Leedle, J. A. Z. 2002. Effects of bacterial direct-fed microbials on ruminal fermentation, blood variables, and the microbial populations of feedlot cattle. *Journal of Animal Science* 80(7):1977-1985.
- Gill, M., Siddons, R. C., Beever, D. E., Rowe, J. B. 1986. Metabolism of lactic acid isomers in the rumen of silage-fed sheep. *British Journal of Nutrition* 55(2): 399-407.

- Goto, H., Qadis, A. Q., Kim, Y. H., Ikuta, K., Ichijo, T., Sato, S. 2016. Effects of a bacterial probiotic on ruminal pH and volatile fatty acids during subacute ruminal acidosis (SARA) in cattle. *Journal of Veterinary Medical Science* 78(10):1595-1600.
- Harrigan, W. F. and E. M. McCance. 1979. Laboratory methods in microbiology of foods and milk products. Ed. Academia. Leon, Spain. pp32-35, 361-366.
- Herigstad, B., Hamilton, M., & Heersink, J. 2001. How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria. *Journal of Microbiological Methods* 44(2):121-129.
- Hille, K. T., Hetz, S. K., Rosendahl, J., Braun, H. S., Pieper, R., Stumpff, F. 2016. Determination of Henry's constant, the dissociation constant, and the buffer capacity of the bicarbonate system in ruminal fluid. *Journal of Dairy Science* 99(1): 369-385.
- Jiao, P. X., Wei, L. Y., Walker, N. D., Liu, F. Z., Chen, L. Y., Beauchemin, K. A., Yang, W. Z. 2017. Comparison of non-encapsulated and encapsulated active dried yeast on ruminal pH and fermentation, and site and extent of feed digestion in beef heifers fed high-grain diets. *Animal Feed Science and Technology* 228:13-22.
- Katherine N. B. 2017. Compliance Policy Guides Section. 689.100. FDA. <https://www.fda.gov/iceci/compliancemanuals/compliancepolicyguidancemanual/ucm074707.htm>
- Kenney, N. M., Vanzant, E. S., Harmon, D. L., McLeod, K. R. 2015. Direct-fed microbials containing lactate-producing bacteria influence ruminal fermentation but not lactate utilization in steers fed a high-concentrate diet. *Journal of Animal Science* 93(5):2336-2348.

- Lehloenya, K. V., Krehbiel, C. R., Mertz, K. J., Rehberger, T. G., Spicer, L. J. 2008. Effects of propionibacteria and yeast culture fed to steers on nutrient intake and site and extent of digestion. *Journal of Dairy Science* 91(2): 653-662.
- Long, M., Feng, W. J., Li, P., Zhang, Y., He, R. X., Yu, L. H., Liu, G. W. 2014. Effects of the acid-tolerant engineered bacterial strain *Megasphaera elsdenii* H6F32 on ruminal pH and the lactic acid concentration of simulated rumen acidosis *in vitro*. *Research in Veterinary Science* 96(1): 28-29.
- Luo, J., Ranadheera, C. S., King, S., Evans, C., & Baines, S. 2017. *In vitro* investigation of the effect of dairy propionibacteria on rumen pH, lactic acid and volatile fatty acids. *Journal of Integrative Agriculture* 16(7): 1566-1575.
- Madrid, J., Martínez-Teruel, A., Hernández, F., & Megías, M. D. 1999. A comparative study on the determination of lactic acid in silage juice by colorimetric, high-performance liquid chromatography and enzymatic methods. *Journal of Science of Food and Agriculture* 79(12): 1722-1726.
- McAllister, T. A., Bae, H. D., Jones, G. A., Cheng, K. J. 1994. Microbial attachment and feed digestion in the rumen. *Journal of Animal Science* 72(11):3004-3018.
- Mooney, C. S., Allen, M. S. 2007. Effect of dietary strong ions on chewing activity and milk production in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 90(12): 5610-5618.
- Nagaraja T.G. 2016. Microbiology of the Rumen. In: Millen D., De Beni Arrigoni M., Lauritano Pacheco R. (eds.) *Rumenology*. Springer, Cham. 39-61

- Peters, J. P., Shen, R. Y., Robinson, J. A., Chester, S. T. 1990. Disappearance and passage of propionic acid from the rumen of the beef steer. *Journal of Animal Science* 68(10): 3337-3349.
- Plaizier, J. C., Keunen, J. E., Walton, J. P., Duffield, T. F., McBride, B. W. 2009. Effect of subacute ruminal acidosis on in situ digestion of mixed hay in lactating dairy cows. *Can. Journal of Animal Science* 81(3): 421-423.
- Reddy, G., Altaf, M. D., Naveena, B. J., Venkateshwar, M., Kumar, E. V. 2008. Amylolytic bacterial lactic acid fermentation: a review. *Biotechnology Advances* 26(1): 22-34.
- Russell, J. B., Baldwin, R. L. 1979. Comparison of substrate affinities among several rumen bacteria: a possible determinant of rumen bacterial competition. *Applied and Environmental Microbiology* 37(3): 531-536.
- Russell, J. B., Bottje, W. G., Cotta, M. A. 1981. Degradation of protein by mixed cultures of rumen bacteria: identification of *Streptococcus bovis* as an actively proteolytic rumen bacterium. *Journal of Animal Science* 53(1): 242-252.
- Russell, J. B., Chow, J. M. 1993. Another theory for the action of ruminal buffer salts: Decreased starch fermentation and propionate production. *Journal of Dairy Science* 76(3): 826-830.
- Russell, J. B., Dombrowski, D. B. 1980. Effect of pH on the efficiency of growth by pure cultures of rumen bacteria in continuous culture. *Applied and Environmental Microbiology* 39(3): 604-610.
- Russell, J. B., Wilson, D. B. 1996. Why are ruminal cellulolytic bacteria unable to digest cellulose at low pH? *Journal of Dairy Science* 79(8): 1503-1509.

- SAS. Institute Inc. 2011. Statistical Analysis System, SAS, User's Guide: SAS Inst., Cary, NC. pp: 3154-3339.
- Seo, J. K., Kim, S. W., Kim, M. H., Upadhaya, S. D., Kam, D. K., Ha, J. K. 2010. Direct-fed microbials for ruminant animals. *Asian-Austral. Journal of Animal Science* 23(12): 1657-1667.
- Shen, Y., Jiao, P., Wang, H., Chen, L., Walker, N. D., Yang, W. 2017. 648 Validation of micro-encapsulation method to protect probiotics and feed enzyme from rumen degradation. *Journal of Animal Science* 95(supplement4): 317-318.
- Silanikove, N. I. S. S. I. M., Tadmor, A. M.N.O.N. 1989. Rumen volume, saliva flow rate, and systemic fluid homeostasis in dehydrated cattle. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 256(4): R809-R815.
- Taylor, K. A. 1996. A simple colorimetric assay for muramic acid and lactic acid. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 56(1): 49-58.
- Walker, G. J. 1965. The cell-bound α -amylases of *Streptococcus bovis*. *Biochemical Journal* 94(2): 289.
- Yang, W. Z., Beauchemin, K. A., Vedres, D. D., Ghorbani, G. R., Colombatto, D., Morgavi, D. P. 2004. Effects of direct-fed microbial supplementation on ruminal acidosis, digestibility, and bacterial protein synthesis in continuous culture. *Animal Feed Science and Technology* 114(1): 179-193.

CAPITULO IV. EFECTO *IN VITRO* DE ADITIVOS MICROBIANOS PARA REDUCIR LA ACIDOSIS LÁCTICA PRODUCIDA POR *Pediococcus acidilactici*

4.1 RESUMEN

Se comparó la capacidad de tres aditivos microbianos para evitar la acidificación de un medio de cultivo anaerobio formulado con una dieta alta en granos (DAG) inoculada con *Pediococcus acidilactici*. El tratamiento control (T1) no contenía aditivos, el T2= T1 + bicarbonato de sodio (control positivo), T3= T1+ Probios Precise® (*Enterococcus faecium* EF212), T4= T1+P-one™ (*Pediococcus pentosaceus*, *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus brevis*) y T5= T1+DCP™ (*Propionibacterium freudenreichii*). En todos los tratamientos se mantuvo un pH entre 6.3 y 6.4 después de 6 h de incubación ($p \geq 0.05$). La concentración de ácido láctico inicial aumento desde las 3 h de incubación, con un valor promedio inicial y final de 8.75 y 28.66 mmol L⁻¹. En este mismo periodo la concentración de acetato, propionato y butirato incremento ($p \leq 0.05$) en los tratamientos T3 (Probios Precise®), T4 (P-one™) y T5 (DCP™). El pH presentó una correlación negativa con la concentración de ácido láctico y la concentración de *P. acidilactici*. La concentración de bacterias totales aumento ($p \leq 0.05$) desde las 4 h de incubación en todos los tratamientos. La concentración de bacterias ácido lácticas (BAL) fue similar ($p \geq 0.05$) entre todos los tratamientos. No fue posible romper la capacidad amortiguadora y establecer una acidosis en los medios de cultivo DAG. Por tanto, los aditivos microbianos no mostraron su potencial para evitar la acidificación causada por la actividad de la bacteria *P. acidilactici* sobre los carbohidratos de fácil fermentación.

Palabras claves: Ácido láctico, bacterias ácido lácticas, probióticos.

ABSTRACT

The capacity of three microbial additives to avoid acidification of an anaerobic culture medium formulated with a high-grain diet (DAG) inoculated with *Pediococcus acidilactici* was compared. The control treatment (T1) had DAG and no additives, T2 = T1 + sodium bicarbonate (positive control), T3 = T1 + Probios Precise® (*Enterococcus faecium* EF212), T4 = T1 + P-one TM (*Pediococcus pentosaceus*, *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus brevis*) and T5 = T1 + DCP TM (*Propionibacterium freudenreichii*). All of the treatments had a pH between 6.3 and 6.4 after 6 h of incubation ($p \geq 0.05$). The lactic acid concentration increased from 0 to 3 h of incubation, from 8.75 to 28.66 mmol L⁻¹. In the same period the concentration of acetate, propionate and butyrate increased ($p \leq 0.05$) in the treatments T3 (Probios Precise®), T4 (P-one TM) and T5 (DCP TM). The pH presented a negative correlation with the concentration of lactic acid and that of *P. acidilactici*. The concentration of total bacteria increased ($p \leq 0.05$) after 4 h of incubation in all treatments. The concentration of lactic acid bacteria (LAB) was similar ($p \geq 0.05$) among all treatments and times of incubation. It was not possible to break the buffer capacity and to establish an acidosis in the culture media DAG. Therefore, the microbial additives tested did not show their potential to prevent acidification caused by the activity *P. acidilactici* on easily fermented carbohydrates.

Key words: Lactic acid, lactic acid bacteria, probiotics

4.2 INTRODUCCIÓN

La fermentación ruminal de dietas con alta concentración de carbohidratos y baja cantidad de forraje (p. ej. 71% maíz) incrementa la concentración de AGV y disminuye el pH ruminal, y aumenta el riesgo de acidosis, ya que favorece la ruta homofermentativa de bacterias amilolíticas que producen cerca del 85% de ácido láctico a partir de glucosa (Mackie *et al.*, 1979, Kandler, 1983 y Poolman, 1993; Reddy *et al.*, 2008). La acidificación ruminal puede afectar el metabolismo energético (gradiente motriz) de bacterias sensibles a los cambios de pH (Garland, 1977) en donde la energía derivada del transporte de electrones es utilizada para producir ATP a partir de ADP y Pi (Mitchell, 1961). En animales sanos, la concentración de ácido láctico en el rumen no excede 5 mmol L⁻¹, al bajar el pH (≤ 5.0) la concentración aumenta a 40 mmol L⁻¹ (Dawson *et al.*, 1997). Los aditivos microbianos con bacterias consumidoras de ácido láctico (p. ej. *Propionibacterium* sp.) así como productoras de ácido láctico (p. ej. *Enterococcus* sp.) pueden reducir la acidosis ruminal subclínica (ARS; Russell y Wilson, 1996; Ghorbani *et al.*, 2002; Plaizier *et al.*, 2008). *Pediococcus acidilactici*, produce ácido L (+)-láctico, por acción de la enzima lactato deshidrogenasa a partir de la fructosa-1,6-difosfato (Dellaglio *et al.*, 1981). Esta bacteria presenta un metabolismo de la glucosa homofermentativo usando la ruta Embden–Meyerhof (Grimaldi *et al.*, 2005). En el rumen, esta bacteria puede estar asociada a la acidosis ruminal (Cobos *et al.*, 2011). El presente estudio se diseñó con el objeto de evaluar *in vitro* tres aditivos microbianos comerciales y su capacidad para reducir la acidosis láctica producida por la bacteria *Pediococcus acidilactici*.

4.3 MATERIALES Y MÉTODOS

4.3.1 Ubicación geográfica del estudio

El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Microbiología Ruminal y Genética Microbiana del programa de Ganadería, Colegio de Postgraduados, ubicado en Montecillo, Texcoco, Estado de México.

4.3.2 Medio de cultivo DAG-FR

Como fuente de energía, se usó una dieta alta en granos (DAG), en el Cuadro 4.1 se muestra la composición de la dieta.

Cuadro 4.1 Composición de la dieta alta en granos (DAG)

Ingrediente	g/ kg BS
Sorgo	448
Maíz	275
Harina de soya	139
Silo de Maíz	57
Rastrojo de maíz	61
Mezcla mineral ^a	20
EM (Mcal Kg ⁻¹) ^b	2.9
PC (%) ^b	12.0

^a Contiene por cada 1000g, calcio, 130g; fosforo, 50g; sodio, 109 g, cloro 200g; hierro, 4.3g; magnesio, 3.3g; manganeso, 0.2 g; cobre, 0.08 g; cobalto, 0.067g; yodo, 0.004g; zinc, 0.008 g.

^b De acuerdo a los requerimientos nutricionales para engorda de borregos NRC 2007.

En tubos de cultivo de 18 x 150 mm (Pyrex®, EUA) se agregaron 0.2 g de DAG y 9 mL de los otros componentes del medio de cultivo DAG-FR (Cuadro 4.2). El llenado de los

tubos de cultivo se realizó bajo flujo de CO₂ y se incubaron a 39 °C por 24 h para comprobar su esterilidad (Hungate, 1950; Cobos *et al.*, 2007).

Cuadro 4.2 Composición del medio anaerobio DAG-FR

Componente	DAG-FR/100 mL
Extracto de levadura, g	0.1
Tripticasa-peptona, g	0.2
DAG ^a , g	0.2
Solución mineral I ^b , mL	5.0
Solución mineral II ^c , mL	5.0
Líquido ruminal clarificado ^d , mL	30.0
Solución de cisteína-sulfido ^e , mL	2.0
Solución de carbonato de sodio al 8 %, mL	5.0
Agua destilada, mL	52.6
Solución de resazurina al 0.1 %, mL	0.1

^a DAG= Dieta alta en granos.

^b Contiene por 1000 mL K₂HPO₄, 6.0 g.

^c Contiene por 1000 mL K₂HPO₄, 6.0 g; (NH₄)₂SO₄, 6 g; NaCl, 12 g; MgSO₄, 2.45 g y Ca Cl₂·H₂O, 1.6 g.

^d Previamente filtrado a través de gasa y centrifugado a 23,000 X g por 20 min a 8°C y esterilizado a 121°C y 15 psi por 15 min.

^e Se disolvieron 2.5 g de L-cisteína- HCl·2H₂O en 50 mL de H₂O destilada, ajustando el pH de la mezcla a 10 con NaOH (2N); se agregaron 2.5 g de Na₂S·9H₂O y se aforó a 200 mL con H₂O destilada; la solución estuvo en ebullición por 5 min con flujo de N₂ y se depositó en tubos con tapón de neopreno.

4.3.3. Preparación del inóculo de la bacteria *P. acidilactici*

El inóculo de *Pedococcus acidilactici* se obtuvo por hidratación del material liofilizado en medio glucosa, celobiosa, almidón y líquido ruminal clarificado (GCA-FR). La composición del medio GCA-FR es similar a la del medio DAG-FR, la diferencia es que, se le adiciona glucosa, celobiosa y almidón (0.06 g 100 mL⁻¹ de cada uno), en lugar de la dieta alta en grano (Cobos *et al* 2007). Para el revivir la cepa de la bacteria *P. acidilactici* conservada por liofilización, se mezcló 0.1 g del liofilizado con 3 mL del medio GCA-FR y se incubo a 39° C durante 3 h. Posteriormente con ayuda de una micropipeta,

se depositaron 10 μ L en cajas Petri con medio sólido MRS (Cuadro 4.3), de acuerdo con la metodología descrita por Herigstad *et al.* (2001) y se incubaron a 39°C por 72 h. De las colonias desarrolladas más definidas y separadas entre sí, se tomó una muestra con asa bacteriológica y se inoculó en tubos de cultivo que con 9 mL medio de cultivo GCA-FR+5% de glucosa. Después de 24 h de incubación a 39°C, el volumen total del tubo de cultivo transfirió a un matraz Erlenmeyer con 250 mL de medio GCA-FR+5% de glucosa y se incubó durante 12 h (Lederberg y Lederberg, 1952; Leedle y Hespell, 1980; Lederberg, 1989). Este medio se usó como inóculo para la prueba. Se agregó 1 mL por cada tubo de cultivo con 9 mL de medio DAG-FR (Cuadro 4.2).

Cuadro 4.3. Componentes del medio de cultivo Agar MRS (Difco®, EUA).

Componente	g/L
Proteasa Peptona	10
Extracto de carne	10
Extracto de levadura	5.0
Dextrosa	20
Polisorbato 80	1.0
Citrato amónico	2.0
Acetato de sodio	5.0
Sulfato de Magnesio	0.1
Sulfato de Manganeso	0.05
Fosfato dipotásico	2.0
Agar	15

4.3.4 Evaluación de Variables fermentativas

Se tomaron muestras a las 0, 3, 4, 5 y 6 h de incubación, El pH se midió con un potenciómetro Orion 250^a (Thermo Fisher Scientific, EUA) y un electrodo para detección de pH 9170 BN ATC (Thermo Fisher Scientific, EUA) calibrado a pH 4 y 7 con soluciones de pH Orion™ (Thermo Fisher Scientific, EUA).

La concentración de ácido láctico, se determinó por el método colorimétrico descrito por Taylor (1996) y Madrid *et al.* (1999). Se depositó 1 mL de muestra en tubos de cultivo con tapón de rosca Kimax[®] de 20 mm x 150 mm (Kimble Glass[®], EUA). Inmediatamente, se agregaron 6 mL de ácido sulfúrico J.T. Baker[®] al 96% (J.T.Baker[®], EUA). Después, las muestras se mantuvieron a 96°C por 15 min en un baño seco análogo (Diagger, EUA). Posteriormente los tubos se dejaron enfriar a temperatura ambiente. A continuación, se agregaron 100µL de sulfato de cobre al 4% (Sigma aldrich[®], EUA) y 200µL de 1.5% parafenilfenol (Sigma aldrich[®], EUA) en 95% de etanol Fermont (PQM, México). Se agito la mezcla vigorosamente con un vortex análogo (VWR[®], EUA) y se dejó en reposo por 30 min a temperatura ambiente. Finalmente, se midió la absorbancia a 570 nm en un espectrofotómetro Lambda 40 (Perkin Elmer, EUA).

Para la determinación de AGV, 1mL de muestra se depositó en un vial Eppendorf de 2.5 ml (Eppendorf, Alemania), se adiciono 0.25 mL de ácido metafosfórico al 25 % (proporción 4:1), y se mezclaron en un Vortex. Posteriormente, los tubos se centrifugaron a 18,800 X g por 10 min en una centrifuga (Hettich[®] EBA 21, Alemania), el sobrenadante se colocó en viales para cromatografía (1.5 mL, Perkin Elmer, EUA). La concentración de AGV se determinó en un cromatógrafo de gases Clarus 500 (Perkin Elmer[®], EUA) equipado con detector de ionización de flama, una columna capilar (Elite FFAP, Perkin-Elmer, EUA) de 15 m de longitud y 0.32 mm de diámetro. Se usó nitrógeno como gas acarreador con flujo de 4 mL/min y aire y H₂ grado cromatográfico para generar una flama con flujo de 45 y 450mL min. Las temperaturas del horno, inyector y columna fueron 120, 250 y 250°C, respectivamente y se inyectó 1 µL de muestra. Con este método

cromatográfico, los tiempos de retención para acetato, propionato y butirato son de 2.16, 2.59 y 3.11 min (Cobos *et al.*, 2007).

4.3.5. Evaluación de variables microbiológicas

El conteo de bacterias ruminales totales, se hizo por conteo directo, 1 mL del medio de cultivo se fijó con 0.25 mL de una solución de formaldehído al 37% (J.T.Baker, EUA) diluido al 10%. Para el conteo, se usó una cámara Petroff-Hausser (Hausser Scientific, EUA) y un microscopio Olympus BX51 (Olympus, Japón) a una magnificación de 1000 x (Harrigan y McCance, 1979). Las diferentes muestras se tomaron a las 0, 3, 4, 5 y 6 h de incubación. La fórmula para estimar la concentración de bacterias ruminales totales por mL de medio de cultivo fue la siguiente:

$$\text{Bacterias ruminales totales mL}^{-1} = (\bar{X}) (\text{F.D}) (2 \times 10^7)$$

Dónde:

\bar{X} = promedio de bacterias en la cámara Petroff-Hausser.

F.D = factor de dilución.

2×10^7 = factor de corrección del volumen de la cámara Petroff-Hausser.

Para la determinación de bacterias ácido lácticas se usó el caldo de cultivo MRS (Man-Rogosa-Sharp; Difco®, EUA; Cuadro 4.3). Se realizaron diluciones decuples (10^{-1} hasta 10^{-12}). Se depositaron 10 μL de cada dilución en cajas Petri con medio sólido MRS, se incubaron 24 h a 39 °C y se estimó la concentración de unidades formadoras de colonias (Harrigan y McCance, 1979; Doré *et al.*, 1995; Herigstad *et al.*, 2001). Esta prueba microbiológica se realizó a las 0, 3, y 6 h de incubación.

4.3.6 Diseño experimental

El diseño experimental fue completamente al azar. Con cinco tratamientos y tres repeticiones (Sin aditivo, NaHCO₃, Probios Precise[®], P-one[™], DCP[™]). Los promedios se ajustaron por mínimos cuadrados para compararlos con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). Las variables de pH, ácido láctico, AGV y BRT se relacionaron usando la correlación de Pearson ($p \leq 0.05$; SAS Institute Inc., 2011).

4.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A partir de las 3 horas de incubación el pH descendió a 6.5 ($p \leq 0.05$) en los tratamientos T4 y T5, que contenían bacterias productoras y consumidoras de ácido láctico, respectivamente. En probióticos para rumiantes, las BAL más usadas son *Lactobacillus plantarum* y *Enterococcus faecium* (Chiquette *et al.*, 2012). Por tanto, el descenso del pH pudo estar relacionado con el metabolismo homofermentativo de estas bacterias amilolíticas productoras de ácido láctico (Ghorbani *et al.*, 2002; Russell y Wilson, 1996). Se ha estimado que las bacterias consumidoras de ácido láctico son del genero *Propionibacterium* (Ghorbani *et al.*, 2002) y junto con las BAL permiten la adaptación paulatina de los microorganismos ruminales a la presencia de ácido láctico (Ghorbani *et al.*, 2002; Russell y Wilson, 1996). El pH del T5 (DCP[™]) fue mayor (6.7, $p \leq 0.05$) a las 4 h. El DCP contiene la bacteria consumidora de ácido láctico *Propionibacterium freudenreichii*, la cual redujo la concentración del lactato ($p \leq 0.05$), resultado similar al reportado por Luo *et al.* (2017) quienes determinaron una reducción en la concentración de ácido láctico de 72 % a las 24 h de incubación. A las 6 h de incubación, el tratamiento testigo (T1=*Pediococcus acidilactici* sin aditivos) fue el que presento el menor pH, aunque sin diferencias significativas entre tratamientos (6.3; $p \geq 0.05$). El uso de aditivos

microbianos *in vitro* puede estimular las bacterias consumidoras de ácido láctico, estabilizando el pH (Seo *et al.*, 2010). Sin embargo, en este estudio el pH en los medios de cultivo de los diferentes tratamientos siempre fue igual o superior a 6.3, por tanto, nunca se estableció una acidosis.

La concentración de ácido láctico, incremento en promedio, a 24.52 mM/L a las 3 h de incubación, sin diferencias significativas ($p \geq 0.05$) entre los tratamientos T1 y T2. Los tratamientos T3, T4 y T5 tuvieron valores más altos ($p \leq 0.05$) de ácido láctico a las 3 h de incubación que T1 y T2, sin diferencias significativas entre ellos. Este resultado, se puede relacionar con la degradación de carbohidratos solubles, como el almidón, en donde se mantiene un flujo glucolítico homofermentativo que produce ácido láctico (Counotte y Prins, 1981). Asanuma *et al.* (1999) reporta que cuando se cultivó *S. bovis* en un medio con 5 g de glucosa por litro, se produjeron 23.0 mM/L de ácido láctico y disminuyó el pH del medio a 4.5. En el presente estudio, a partir de las 4 h de incubación, el T3 (Probios Precise[®]) presentó la mayor ($p \leq 0.05$) producción de ácido láctico. Una concentración de ácido láctico mayor a 20 mM se asocia con un pH ≤ 5.0 . Se ha reportado que, aunque la concentración aumente a 80mM, el pH de rumen no desciende de 4.35 (Briggs *et al.*, 1975). Se ha determinado, que los probióticos de bacterias utilizadores de ácido láctico, metabolizan este ácido orgánico y evitan la disminución del pH ruminal a valores ≥ 6.0 en vacas que ingirieron 20, 50 y 100 g de aditivos microbianos por día (Goto *et al.*, 2016). A las 3 h de incubación, la concentración de ácido acético incrementó ($p \leq 0.05$) en los tratamientos T3, T4 y T5, este mismo tratamiento presenta mayor ($p \leq 0.05$) concentración de acético a las 5h. La producción de ácido propiónico y acético en medios de cultivo

inoculados con *Propionibacterium freudenreichii* PF 2207 a las 48 h fue de 41.46 and 38.17 mmol L⁻¹, respectivamente (Luo *et al.*, 2017). En esta prueba el ácido propiónico aumenta ($p \leq 0.05$) en T3, T4 y T5 desde las 3h. Finalmente para las 6 h de incubación la producción de ácido propiónico disminuyó a ≤ 2.2 mM L⁻¹ con relación a la hora “cero” de incubación. Este resultado no se esperaba, ya que, lo que normalmente se ha reportado es el uso del ácido láctico por parte de *Propionibacterium* sp., que resulta en la producción de ácido propiónico y ácido acético (Peters *et al.*, 1990; Koniarova, 1993). De igual forma, al incluir la cepa *Propionibacterium* P169 y levaduras en la dieta de novillos de engorda por 21 días se aumenta la proporción molar del ácido propiónico en 9.7% (Lehloenya *et al.* 2008). En vacas lecheras esta misma cepa aumenta la producción ruminal de propionato (Stein *et al.*, 2006). La concentración de ácido butírico en T3, T4 y T5 aumenta ($p \leq 0.05$) a las 3h. Finalmente para las 6h de incubación la concentración de ácido butírico en todos los tratamientos disminuye ($p \geq 0.05$). La concentración total de AGV aumenta ($p \leq 0.05$) a las 3h de incubación. Al incrementar la fermentación de carbohidratos se inicia la acidosis ruminal y el pH desciende por debajo de 6.0, lo cual, ocasiona una disminución en la producción de ácido acético y butírico, y aumento la del ácido propiónico (Bannink *et al.*, 2008). A partir de 1mol de hexosa se producen 2 moles de propiónico o acético y 1mol de butírico, la cual disminuye el pH (Mentschel *et al.*, 2001). El valor de pKa para los ácidos grasos volátiles es de 4.76, 4.87, 4.82 para acético propiónico y butírico, respectivamente (Kristensen, 2005). Debido a que el ácido láctico es un ácido más fuerte ($pK_a=3.86$) que los ácidos grasos volátiles, su acumulación causa la disminución del pH (Counotte and Prins, 1979).

Cuadro 4.4 pH, ácido láctico, ácidos grasos volátiles (AGV) mM L⁻¹ y concentración total de bacterias ruminales totales (BRT) a 0, 3, 4,5 y 6 h de incubación a 39°C.

Trat	Hr	pH	Ácido Láctico	Acet	Prop	But	AGV totales	BRT
			mML ⁻¹					x 10 ⁸
T1	0	7.0a	12.0hi	13.2b	4.9b	2.7b	20.8b	1.80fg
	3	6.6bcdef	17.2gh	13.1b	4.7b	2.6bcde	20.4b	4.00bcde
	4	6.4hg	23.1efg	10.7c	5.2b	3.4b	19.3b	5.08bcd
	5	6.4fgh	17.5gh	8.1efg	2.9cd	1.5ef	12.5cdef	4.50bcd
	6	6.3h	24.2def	7.7efg	2.5cd	1.2f	11.4cdef	6.08ab
T2	0	7.1a	4.7j	13.7b	4.9b	2.6bcd	21.1b	1.40g
	3	6.7bcde	23.1efg	13.5b	4.9b	2.6bc	21.1b	3.25defg
	4	6.6cdefg	28.2bcdef	10.6cd	4.7b	2.6bcd	17.9b	4.42bcd
	5	6.5efgh	25.1edf	9.1ed	3.2c	1.7cdef	14.0c	4.42bcd
	6	6.4fgh	24.1def	6.8g	2.2cd	1.1f	10.1def	6.08ab
T3	0	6.9ab	8.2ij	13.3b	4.4b	1.0f	18.7b	1.40g
	3	6.6defgh	28.4bcdef	17.3a	8.5a	5.6a	31.4a	3.50cdefg
	4	6.5defgh	29.5bcd	9.0e	2.8cd	0.6f	12.4cdef	4.42bcd
	5	6.4fgh	33.7ab	9.1e	3.2cd	1.6cdef	13.9c	4.50bcd
	6	6.4fgh	36.2a	8.6ef	2.2cd	1.1f	10.1edf	6.00ab
T4	0	6.8abc	12.0hi	13.5b	4.4b	1.0f	18.9b	1.7fg
	3	6.5efgh	29.1bcde	17.2 ^a	8.4a	5.6a	31.2a	3.50cdefg
	4	6.5efgh	22.2fg	8.6ef	3.0cd	1.6efd	13.2cde	4.42bcd
	5	6.4fgh	29.1bcde	6.8g	3.1cd	1.6cdef	13.3cd	4.83bcd
	6	6.4fgh	26.8cdef	6.6g	2.2d	1.1f	9.8f	5.50abc
T5	0	6.8bcd	6.8ij	14.3b	4.5b	1.0f	19.8b	2.00efg
	3	6.5efggh	24.8def	17.4a	8.4a	5.6a	31.4a	3.42cdefg
	4	6.7bcd	26.0cdef	7.5fg	2.7cd	1.4f	11.6cdef	3.67cdef
	5	6.4gh	28.8bcde	9.0e	3.2cd	1.6cdef	13.8c	7.42a
	6	6.4gh	32.0abc	6.6g	2.2cd	1.1f	9.9ef	7.25a
EEM		0.03	0.99	0.4	0.22	0.17	0.76	0.2

Valores promedio con distinta letra en una columna son diferentes ($p \leq 0.05$); EEM=error estándar de la media. Trat= Tratamiento experimental: T1= Trat testigo inoculado con *Pediococcus acidilactici* 1×10^8 bacterias mL⁻¹ de medio cultivo, T2= T1+1% de bicarbonato de sodio, T3= T1+Probios Precise[®], T4= T1+ P-one[™], T5= T1+DCP[™].

Aunque durante la acidosis ruminal subaguda la concentración de ácido láctico sea baja, p. ej. de 2mM/L puede bajar el pH a 5.7 (Counotte y Prins, 1979). En general, la relación entre el incremento de los ácidos grasos volátiles y el descenso del pH es inversamente proporcional, pero, esta relación puede ser débil cuando la dieta incluye amortiguadores de pH (Dijkstra *et al.*, 2012).

Cuadro 4.5 Coeficientes de correlación entre las variables fermentativas y microbiológicas.

	pH	Ácido láctico	Ácido acético	Ácido Propiónico	Ácido Butírico	AGV Totales	BT
pH	1	-0.71 [†]	0.06 [¶]	0.07 [¶]	0.16 [¶]	0.09 [¶]	-0.77 [†]
Ácido láctico		1	-0.20 [¶]	-0.13 [¶]	-0.10 [¶]	0.44 [¶]	0.70 [†]
Acético			1	0.93 [†]	0.75 [†]	0.97 [†]	-0.04 [¶]
Propiónico				1	0.93 [†]	0.99 [†]	-0.05 [¶]
Butírico					1	0.89 [†]	-0.10 [¶]
AGV Totales						1	
BT							1

[†]Coeficiente significativo ($p \leq 0.05$); Coeficiente no significativo ($p \geq 0.05$); pH durante 0, 3, 4, 5 y 6h de incubación; producción de ácido láctico (mM L^{-1}) durante 0, 3, 4, 5 y 6h de incubación; Acetato (mM L^{-1}) durante 0, 3, 4, 5 y 6h de incubación; Propionato (mM L^{-1}) durante 0, 3, 4, 5 y 6h de incubación; Butirato (mM L^{-1}) durante 0, 3, 4, 5 y 6h de incubación y Bacterias totales (BT) durante 0, 3, 4, 5 y 6h de incubación. Tratamientos: T1= Tratamiento testigo inoculado con 1×10^8 bacterias de *Pediococcus acidilactici* por mL de medio cultivo, T2= T1+1% de Bicarbonato de sodio, NaHCO_3 , T3= T1+Probios Precise[®], T4= T1+ P-one[™], T5= T1+DCP[™].

Al aumentar el ácido láctico y la concentración total de *P.acidilactici* el pH de los medios de cultivo se acidifica y conforme la bacteria ácido láctica prolifera produce más ácido láctico. La concentración de bacterias totales desde el inicio del experimento fue de 1×10^8 bacterias de *P. acidilactici* mL^{-1} de medio de cultivo, esta concentración aumento a las 3 h de incubación a valores $\geq 3.25 \times 10^8$ bacteria/mL de medio cultivo, siendo el tratamiento testigo el que presento la mayor ($p \leq 0.05$) población de *P. acidilactici*. Durante las 5 h el

tratamiento T5 presenta la mayor concentración de bacterias ($p \leq 0.05$) manteniéndose así hasta el final del experimento. El crecimiento de la bacteria es constante hasta las 6 h de incubación.

Cuadro 4.6 Número más probable (NMP) de bacterias ácido lácticas (BAL) a las 0, 3 y 6 h de incubación.

Tratamiento	hora	NMP
T1	0	1.5×10^{10}
	3	1.1×10^{11}
	6	1.5×10^{12}
T2	0	2.4×10^{10}
	3	2.4×10^{12}
	6	2.8×10^{13}
T3	0	4.6×10^{10}
	3	1.1×10^{13}
	6	9.3×10^{13}
T4	0	9.3×10^{10}
	3	1.5×10^{12}
	6	7.5×10^{12}
T5	0	4.60×10^{10}
	3	2.0×10^{12}
	6	9.3×10^{12}

El cálculo del rango estadístico con 95% de confiabilidad se calcula usando la siguiente fórmula: número más probable = $NMP / 4.68$ a $NMP \times 4.68$. Tratamientos: T1= tratamiento testigo inoculado con *P. acidilactici*, con una concentración de 1.1×10^9 bacterias/mL de medio de cultivo GCA-FR con 5%, T2= T1+1% de Bicarbonato de sodio, NaHCO_3 , T3= T1+Probios Precise®, T4= T1+ P-one™, T5= T1+DCP™.

La concentración de bacterias ácido lácticas fue mayor a partir de las 3h de incubación, en todos los tratamientos con y sin aditivos microbianos. A las 6 h de incubación la concentración de BAL vario entre 1.5×10^{12} a 9.3×10^{13} BAL/ mL de medio de cultivo MRS, sin diferencias significativas entre tratamientos. La administración probióticos de

bacterias ácido lácticas estimula la adaptación de los microorganismos ruminales, para metabolizar el ácido láctico producido por bacterias ácido lácticas y previene la acumulación de lactato en el rumen (Russell y Wilson, 1996; Ghorbani *et al.*, 2002; Seo *et al.*, 2010).

4.5 CONCLUSIONES

Después de 6 h de incubación el pH de los medios de cultivo fue entre 6.3 y 6.4, por tanto, no se logró establecer una acidosis con o sin la presencia de los aditivos microbianos evaluados. El uso *in vitro* de aditivos microbianos reduce la acidificación de los medios de cultivo causada por *P. acidilactici*. En general, los aditivos microbianos (T3, T4 y T5), no tuvieron una diferencia significativa con el tratamiento testigo (T1) con respecto a las variables de respuesta evaluadas (concentración de ácido láctico, acético, propiónico, butírico, y bacterias lácticas). El ácido láctico presenta una correlación positiva con la concentración de *P. acidilactici* por mL de medio de cultivo.

4.6 LITERATURA CITADA

- Asanuma, N., Iwamoto, M., & Hino, T. 1999. Structure and transcriptional regulation of the gene encoding pyruvate formate-lyase of a ruminal bacterium, *Streptococcus bovis*. *Microbiology* 145(1): 151-157.
- Bannink, A., France, J., Lopez, S., Gerrits, W. J. J., Kebreab, E., Tamminga, S., Dijkstra, J. 2008. Modelling the implications of feeding strategy on rumen fermentation and functioning of the rumen wall. *Animal Feed Science and Technology* 143(1): 3-26.
- Briggs, P. K., Hogan, J. P., Reid, R. L. 1957. Effect of volatile fatty acids, lactic acid and ammonia on rumen pH in sheep. *Australian Journal of Agricultural Research* 8(6): 674-690.

- Chiquette, J., Allison, M. J., Rasmussen, M. 2012. Use of *Prevotella bryantii* 25A and a commercial probiotic during subacute acidosis challenge in midlactation dairy cows. *Journal of Dairy Science* 95(10):5985-5995.
- Cobos M. A., M. Pérez-Sato, J. Piloni-Martini, S. S. González, and J. R. Bárcena. 2007. Evaluation of diets containing shrimp Shell waste and an inoculum of *Streptococcus milleri* on rumen bacteria and performance of lambs. *Animal Feed Science and Technology* 132:324-330.
- Cobos M.A., Ley de Coss A., Ramirez N.D., Gonzalez S.S., Ferrera Cerrato R. 2011. *Pediococcus acidilactici* isolated from the rumen of lambs with rumen acidosis, 16S rRNA identification and sensibility to monensin and lasalocid. *Research in Veterinary Science* 90: 26–30.
- Counotte, G. H. M., Prins, R. A. 1979. Regulation of rumen lactate metabolism and the role of lactic acid in nutritional disorders of ruminants. *Veterinary Research Communications* 2(1):277-303.
- Counotte, G. H., Prins, R. A. 1981. Regulation of lactate metabolism in the rumen. *Veterinary Research Communications* 5(1): 101-115.
- Dawson, K. A., Rasmussen, M. A., Allison, M. J. 1997. Digestive disorders and nutritional toxicity. In *The rumen microbial ecosystem*. Springer Netherlands: pp. 633-660.
- Dellaglio, F., Trovatelli, L.D., Sarra, P.G. 1981. DNA-DNA homology among representative strains of the genus *Pediococcus*. *Zentralblatt für Bakteriologie Mikrobiologie und Hygiene: I. Abt. Originale C: Allgemeine, angewandte und ökologische Mikrobiologie* 2(2): 140-150.

- Dijkstra, J., Ellis, J. L., Kebreab, E., Strathe, A. B., López, S., France, J., Bannink, A. 2012. Ruminant pH regulation and nutritional consequences of low pH. *Animal Feed Science and Technology* 172(1): 22-33.
- Doré, J., Morvan, B., Rieu-Lesme, F., Goderel, I., Gouet, P., Pochart, P. 1995. Most probable number enumeration of H₂-utilizing acetogenic bacteria from the digestive tract of animals and man. *FEMS Microbiology Letters* 130(1): 7-12.
- Garland, P. B. 1977. Energy transduction in microbial systems. *Symposium of the Society for General Microbiology* (27):1-21.
- Ghorbani, G. R., Morgavi, D. P., Beauchemin, K. A., Leedle, J. A. Z. 2002. Effects of bacterial direct-fed microbials on ruminal fermentation, blood variables, and the microbial populations of feedlot cattle. *Journal of Animal Science* 80(7): 1977-1985.
- Goto, H., Qadis, A. Q., Kim, Y. H., Ikuta, K., Ichijo, T., Sato, S. 2016. Effects of a bacterial probiotic on ruminal pH and volatile fatty acids during subacute ruminal acidosis (SARA) in cattle. *The Journal of Veterinary Medical Science* 78(10): 1595-1600.
- Grimaldi, A., Bartowsky, E., Jiranek, V. 2005. Screening of *Lactobacillus* spp. and *Pediococcus* spp. for glycosidase activities that are important in oenology. *Journal of Applied Microbiology* 99(5): 1061-1069.
- Harrigan, W. F. and E. M. McCance. 1979 *Laboratory methods in microbiology of foods and milk products*. Ed. Academia. Leon, Spain. pp32-35, 361-366.
- Herigstad, B., Hamilton, M., Heersink, J. 2001. How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria. *Journal of Microbiological Methods* 44(2):121-129.
- Herigstad, B., Hamilton, M., Heersink, J. 2001. How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria. *Journal of Microbiological Methods* 44(2): 121-129.

- Kandler, O. 1983. Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 49(3): 209-224.
- Koniarova, I. 1993. Koniarova, I. (1993). Biochemical and physiologic properties of strains of *Propionibacterium acnes* isolated from the rumen of calves and lambs. *Veterinarni medicina* 38(1), 43-52. *Vet. Med.* 38(1): 43-52.
- Kristensen, N. B. 2005. Splanchnic metabolism of volatile fatty acids in the dairy cow. *Journal of Animal Science*. 80(1): 3-10.
- Lederberg, J. 1989. Replica plating and indirect selection of bacterial mutants: isolation of preadaptive mutants in bacteria by sib selection. *Genetics* 121(3): 395.
- Lederberg, J., Lederberg, E. M. 1952. Replica plating and indirect selection of bacterial mutants. *Journal of Bacteriology* 63(3): 399.
- Leedle, J. A., Hespell, R. B. 1980. Differential carbohydrate media and anaerobic replica plating techniques in delineating carbohydrate-utilizing subgroups in rumen bacterial populations. *Applied and Environmental Microbiology* 39(4): 709-719.
- Lehloenya, K. V., Krehbiel, C. R., Mertz, K. J., Rehberger, T. G., Spicer, L. J. 2008. Effects of propionibacteria and yeast culture fed to steers on nutrient intake and site and extent of digestion. *Journal of Dairy Science* 91(2): 653-662.
- Luo, J., Ranadheera, C. S., King, S., Evans, C., Baines, S. (2017). *In vitro* investigation of the effect of dairy propionibacteria on rumen pH, lactic acid and volatile fatty acids. *Journal of Integrative Agriculture* 16(7): 1566-1575.
- Mackie, R. I., Gilchrist, F. M., Robberts, A. M., Hannah, P. E., Schwartz, H. M. 1979. Microbiological and chemical changes in the rumen during the stepwise adaptation

- of sheep to high concentrate diets. *The Journal of Agricultural Science* 90(2): 241-254.
- Madrid, J., Martínez-Teruel, A., Hernández, F., & Megías, M. D. 1999. A comparative study on the determination of lactic acid in silage juice by colorimetric, high-performance liquid chromatography and enzymatic methods. *Journal of Science of Food and Agriculture* 79(12): 1722-1726.
- Mentschel, J., Leiser, R., Mülling, C., Pfarrer, C., Claus, R. 2001. Butyric acid stimulates rumen mucosa development in the calf mainly by a reduction of apoptosis. *Archives of Animal Nutrition* 55(2): 85-102.
- Mitchell, P. 1961. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature* 191(4784): 144-148.
- Peters, J. P., Shen, R. Y., Robinson, J. A., Chester, S. T. 1990. Disappearance and passage of propionic acid from the rumen of the beef steer. *Journal of Animal Science* 68(10): 3337-3349.
- Plaizier, J. C., Krause, D. O., Gozho, G. N., & McBride, B. W. 2008. Subacute ruminal acidosis in dairy cows: The physiological causes, incidence and consequences. *The Veterinary Journal* 176(1): 21-31.
- Poolman, B. 1993. Energy transduction in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 12(1-3): 125-147.

- Reddy, G., Altaf, M. D., Naveena, B. J., Venkateshwar, M., & Kumar, E. V. 2008. Amylolytic bacterial lactic acid fermentation-a review. *Biotechnology Advances* 26(1): 22-34.
- Russell, J. B., & Wilson, D. B. 1996. Why are ruminal cellulolytic bacteria unable to digest cellulose at low pH? *Journal of Dairy Science* 79(8): 1503-1509.
- SAS. Institute Inc. 2011. *Statistical Analysis System, SAS, User's Guide*: SAS Inst., Cary, NC. pp: 119-130.
- Seo, J. K., Kim, S. W., Kim, M. H., Upadhaya, S. D., Kam, D. K., & Ha, J. K. 2010. Direct-fed microbials for ruminant animals. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 23(12): 1657-1667.
- Stein, D. R., Allen, D. T., Perry, E. B., Bruner, J. C., Gates, K. W., Rehberger, T. G., & Spicer, L. J. 2006. Effects of feeding *propionibacteria* to dairy cows on milk yield, milk components, and reproduction. *Journal of Dairy Science* 89(1): 111-125.
- Taylor, K. A. 1996. A simple colorimetric assay for muramic acid and lactic acid. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 56(1): 49-58.