



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

GANADERÍA

EVALUACIÓN DE UN INÓCULO BACTERIANO PARA EL TRATAMIENTO DE LA ACIDOSIS LÁCTICA

ISABEL TORRES SALAS

T E S I S

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

MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO

2021

La presente tesis titulada: **Evaluación de un inóculo bacteriano para el tratamiento de la acidosis láctica**, realizada por la alumna: **ISABEL TORRES SALAS**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
GANADERÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO: 
DR. MARIO ANTONIO COBOS PERALTA

ASESOR: 
DR. JOSÉ RICARDO BARCENA GAMA

ASESOR: 
DR. RONALD FERRERA CERRATO

Montecillo, Texcoco, Estado de México, octubre de 2021.

EVALUACIÓN DE UN INÓCULO BACTERIANO PARA EL TRATAMIENTO DE LA ACIDOSIS LÁCTICA

Isabel Torres Salas, M. C.
Colegio de Postgraduados, 2021

RESUMEN

Los rumiantes tienen capacidad para degradar los forrajes lo cual es una ventaja para transformar alimentos en productos de alta calidad. El exceso de demanda por estos productos ha provocado que los ganaderos alimenten a los animales con concentrados para incrementar su producción. Esta práctica trae problemas en el ambiente ruminal como la acidosis, causada por la producción de ácidos orgánicos, como el ácido láctico debido a la fermentación por exceso de almidón en dietas y puede llegar a ser mortal en rumiantes. El objetivo fue aislar una bacteria del rumen y utilizarla en el control y tratamiento de la acidosis. Se aisló una enterobacteria del rumen de una vaca canulada y se midieron las variables fermentativas y microbiológicas (pH, producción de ácido láctico, ácidos grasos volátiles y conteo bacteriano) para conocer el comportamiento en un proceso de acidosis, además se hizo una comparación con bicarbonato de sodio, un buffer utilizado en el control de dicho trastorno digestivo. La enterobacteria (EB) tiene una producción de ácido láctico que mantiene el pH del medio en 6, mientras que con líquido ruminal fresco, el pH disminuye y acidificar el medio. Con bicarbonato hay una capacidad buffer muy marcada, pues, a pesar de que hay una cantidad importante de ácido láctico, el pH nunca se acidificó manteniéndose arriba de 6. La producción de ácidos grasos volátiles (AGV) fue mayor en los tratamientos donde el pH disminuyó por el incremento de las proporciones de ácidos propiónico y butírico principalmente. La EB presentó cierto potencial para disminuir la acidosis ruminal; sin embargo, su actividad no fue suficientemente importante para encontrar efectos significativos en el control de la acidez. Se sugiere que la EB se combine con alguna levadura para que potencialice su efecto pues en este no se observó en cocultivo con bacterias ruminales.

Palabras clave: Enterobacteria, acidosis, ganado lechero, bicarbonato de sodio.

EVALUATION OF A BACTERIAL INOCULUM FOR THE TREATMENT OF LACTIC ACIDOSIS

Isabel Torres Salas, M. C.
Colegio de Postgraduados, 2021

ABSTRACT

Ruminants have the ability to degrade forages which is an advantage in transforming foods of low nutritional value into high quality products for humans. However, the excess demand for these products has caused producers to feed the animals with concentrates to increase their production. This practice brings with it problems in the ruminal environment such as acidosis, which is caused by the production of organic acids, such as lactic acid due to fermentation due to excess starch in diets and can be fatal in ruminants. The objective was to isolate a bacterium from the rumen and use it in the control and treatment of lactic acidosis. An enterobacteria was isolated from the rumen of a cannulated cow and the fermentative and microbiological variables (pH, lactic acid production, volatile fatty acids and bacterial count) were measured to know the behavior in an acidosis process, in addition a comparison was made with bicarbonate sodium, a buffer widely used in the control of this digestive disorder. It was found that the Enterobacteria (EB) has a lactic acid production that maintains the pH of the medium at 6, while with fresh ruminal fluid, the pH decreases, acidifying the medium. With bicarbonate there is a very marked buffer capacity, because, despite the fact that there is a significant amount of lactic acid, the pH never acidified, staying above 6. The production of volatile fatty acids (VFA) was higher in the treatments in the that the pH decreased mainly due to the increase in the proportions of propionic and butyric acids. EB had some potential to reduce ruminal acidosis; however, its activity was not significant enough to find significant effects on acidity control. It is suggested that EB be combined with some yeast to potentiate its effect, since in this it was not observed in coculture with ruminal bacteria.

Key words: Enterobacteria, acidosis, dairy cattle, sodium bicarbonate.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por la beca otorgada para la realización de este trabajo de investigación de mi Posgrado.

Al Colegio de Postgraduados, Institución de Enseñanza e Investigación en Ganadería, por darme la oportunidad de adquirir nuevos conocimientos y facilidades para desarrollar este proyecto de investigación.

Al Dr. Mario A. Cobos Peralta por la confianza y aceptarme como estudiante, y transmitirme parte de su conocimiento y todas las facilidades para realizar este proyecto de investigación. Así como a los integrantes de mi consejo particular, el Dr. José Ricardo Bárcena Gama, el Dr. Ronald Ferrera Cerrato y el Dr. Adrián Raymundo Quero Carrillo, por sus valiosas aportaciones a esta investigación.

Al personal de laboratorio Sr. Agustín y Jorge por el apoyo, disposición y la facilidad de materiales para la realización de este trabajo.

A mis compañeros y amigos que tuve en este camino: Zadi, Edith, Jorge, Samuel, Margarita, Jesús, América, Diego, Sergio, Yamileth, Enrique, Angeles y Liliana por sus experiencias y momentos compartidos.

Sinceramente, Isabel.

DEDICATORIA

A **DIOS** quien me da la oportunidad de vivir y cumplir una meta más en mi vida para mi crecimiento personal.

A mis padres *María Isabel Salas Medina* y *Jorge N. Torres y Uribe* quienes me heredaron una carrera, me guían y apoyan con sus enseñanzas y sabios consejos.

A mi hijo *Santiago Torres Salas* por ser el motivo para seguir adelante y vencer los obstáculos juntos.

A mis hermanos *Verenice* y *Jorge* por motivarme y apoyarme en este camino llamado vida siendo un ejemplo de que si se quiere se puede lograr.

A mis abuelos *Eustolia Medina* y *Sidronio Salas†*; *Carmen Uribe†* y *Timoteo Torres†* quienes desde pequeña me inculcaron la educación y sabios consejos.

A mis tíos, primos y sobrinos que de manera incondicional están presentes siempre.

Con cariño
ISABEL

CONTENIDO

RESUMEN	iii
ABSTRACT	iv
AGRADECIMIENTOS	v
DEDICATORIA.....	vi
LISTA DE CUADROS	x
LISTA DE FIGURAS	xi
INTRODUCCIÓN GENERAL	1
JUSTIFICACIÓN	2
OBJETIVOS E HIPÓTESIS.....	2
Hipótesis	2
Objetivos.....	2
Objetivo general.....	2
Objetivos específicos	3
REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
Microbiota, características y funciones	3
Bacterias celulolíticas	3
Bacterias hemicelulolíticas y pectinolíticas	4
Bacterias amilolíticas	4
Bacterias productoras de metano	4
Protozoos del rumen.....	5
Acidosis ruminal.....	8
Tipos de acidosis ruminal	8
Acidosis ruminal clínica o aguda.	9
Acidosis ruminal subclínica.....	9
Ácido láctico.....	11
Toxinas ruminales	12
Control de acidosis ruminal.....	12
Amortiguadores	13
Ionóforos.....	15
Uso de inóculos.	16

Literatura citada	17
CAPÍTULO I. EFECTO DE LA INOCULACIÓN CON LÍQUIDO RUMINAL FRESCO (LRF) EN MEDIOS DE CULTIVO CON DIFERENTES CANTIDADES DE GLUCOSA EN EL pH A TRAVÉS DEL TIEMPO.....	22
1.1. RESUMEN	22
1.2. ABSTRACT.....	22
1.3. INTRODUCCIÓN	23
1.4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
1.4.1. Ubicación geográfica.....	24
1.4.2. Medios de cultivo.....	24
1.4.3. Medición de pH	25
1.4.4. Diseño de análisis estadístico	25
1.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	26
1.6. CONCLUSIONES	27
1.7. LITERATURA CITADA	27
CAPITULO II. TÉCNICA ESPECTROFOTOMÉTRICA PARA DETERMINACIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO CON CLORURO FÉRRICO.....	28
2.1. RESUMEN	28
2.2. ABSTRACT.....	28
2.3. INTRODUCCIÓN	28
2.4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
2.4.1. Ubicación geográfica.....	29
2.4.2. Técnicas espectrofotométricas.....	30
2.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
2.6. CONCLUSIONES	36
2.7. LITERATURA CITADA	36
CAPITULO III. AISLAMIENTO Y LIOFILIZACIÓN DE BACTERIA ÁCIDO LÁCTICA A PARTIR DE UN MEDIO DE CULTIVO GCA-FR.....	38
3.1. RESUMEN	38
3.2. ABSTRACT.....	38
3.3. INTRODUCCIÓN.....	38

3.4.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	39
3.4.1.	Aislamiento de Enterococcus spp. a partir de líquido ruminal de vaca canulada.....	39
3.4.2.	Conservación del cultivo de Enterococcus spp., prueba de viabilidad y crecimiento.....	40
3.5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	41
3.6.	CONCLUSIONES	45
3.7.	LITERATURA CITADA	46
CAPITULO IV. COMPARACIÓN DE DOS INÓCULOS BACTERIANOS Y USO DE BICARBONATO DE SODIO PARA EL CONTROL DE ACIDOSIS IN VITRO.....		48
4.1.	RESUMEN.....	48
4.2.	ABSTRACT.....	49
4.3.	INTRODUCCIÓN.....	49
4.4.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	50
4.4.1.	Bacteria y medio de cultivo.....	50
4.4.2.	Tratamientos	51
4.4.3.	Determinación de ácidos grasos volátiles	52
4.4.4.	Concentración de ácido láctico.....	53
4.4.5.	Diseño y análisis estadístico	53
4.5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	53
4.6.	CONCLUSIONES	59
4.7.	LITERATURA CITADA	60
CONCLUSIÓN		63

LISTA DE CUADROS

Título	pág.
Cuadro 1. Composición de medio de cultivo anaerobio para bacterias totales.	25
Cuadro 2. Cambios de pH con las diferentes dosis de glucosa en medio inoculado con LRF en las diferentes horas del experimento.	26
Cuadro 3. Cantidad de solución estándar por tubo de ensaye para curva de calibración con H ₂ SO ₄	31
Cuadro 4. Concentración de solución estándar por tubo de ensaye para curva de calibración con FeCl ₃ * 6H ₂ O.	32
Cuadro 5. Curva de calibración con FeCl ₃ * 6H ₂ O utilizada para medir ácido láctico.	36
Cuadro 6. Composición del medio sólido de Streptococcus selective (STR) para BAL.	40
Cuadro 7. Composición del medio de cultivo anaerobio rico en glucosa para bacterias totales (BT).	51
Cuadro 8. Cambios de pH y concentración de ácido láctico en medios de cultivo.	56
Cuadro 9. Concentración de ácidos grasos volátiles (AGV) y Totales (mM).	58
Cuadro 10. Concentración de bacterias totales en los medios de cultivo en la hora de inicio (0h) y final (5h) del experimento.	59

LISTA DE FIGURAS

Título	pág.
Figura 1. Variaciones en el pH ruminal durante un periodo de 24 h.....	10
Figura 2. Reacción colorimétrica en tubos con diferentes concentraciones de ácido láctico con técnica de Taylor (1996).	34
Figura 3. Reacción colorimétrica en tubos con diferentes concentraciones de ácido láctico con técnica de Borshchevskaya.	35
Figura 4. Crecimiento bacteriano de la primera siembra obtenida de medios inoculados con LR de las 5 h de incubación para bacterias ácido lácticas (BAL).	42
Figura 5. Crecimiento de colonias en la segunda siembra en medio sólido de Streptococcus (STR).	42
Figura 6. Crecimiento de colonias en la tercera siembra con un tipo de BAL en medio STR.	43
Figura 7. Medios liofilizados de <i>Enterococcus spp.</i> a partir de un medio de cultivo GCA-FR con 0.5% de glucosa.	44
Figura 8. Bacteria aislada de <i>Enterococcus spp.</i> vista al microscopio de contraste Zeiss, magnificación 100x.	45

INTRODUCCIÓN GENERAL

La homeostasis es controlada por factores como: El tipo de alimento, la cantidad consumida, la salivación, la rumia y la difusión-secreción hacia el rumen. Cuando se perturba la homeostasis ruminal, un problema común es la acidosis ruminal (Preston y Leng, 1987).

El proceso de acidosis ruminal deriva del incremento en la proporción de carbohidratos fácilmente fermentables en la dieta, que se traduce en la acumulación excesiva de ácidos grasos volátiles (AGV) y lactato en el rumen llevando a una disminución del pH ruminal. La disminución de pH ruminal desencadena respuestas metabólicas y fisiológicas que disminuyen la eficiencia productiva en rumiantes. Esta enfermedad asintomática reduce el consumo diario de alimento, disminución en la producción de leche y ganancia diaria de peso, menor fertilidad y en casos extremos puede causar la muerte que repercute en la rentabilidad de la empresa ganadera (Nagaraja y Chengappa, 1998).

En México la frecuencia de acidosis ruminal es del 36% en vacas lecheras altas productoras (Paasch *et al.*, 1997). Se estima que entre el 14 y el 42% de las muertes de ganado de corral son debido a trastornos digestivos y que se gastan en promedio 10 dólares por cabeza en su tratamiento (Snyder y Credille 2017).

Las bacterias productoras (*Streptococcus bovis*) y utilizadoras (*Megasphaera elsdenii*, *Selenomonas ruminantium*) de lactato, juegan un papel importante en el desarrollo de la acidosis (Blanch, 2009).

La población de bacterias ácido lácticas (BAL) ruminales aumenta cuando la dieta consumida por los rumiantes contiene una proporción alta de carbohidratos de fermentación rápida (Goad *et al.*, 1998), los cuales son transformados por la actividad homofermentativa de las BAL en ácido láctico principalmente (Yokoyama y Johnson, 1993; Cobos, 2007). Cuando el pH ruminal es de 5.5 se considera una acidosis

subclínica, pero si el pH disminuye a 5.2 se convierte en acidosis clínica (Goad *et al.*, 1998).

JUSTIFICACIÓN

Entre los problemas más comunes de los productores de ganado lechero está el manejo de la alimentación, debido al aumento de granos en las dietas provocando problemas digestivos como la acidosis ruminal subclínica, un problema que afecta gravemente al ganado y se detecta cuando el animal ya se encuentra en un estado avanzado de acidosis, donde los costos promedio de tratamiento ascienden a 10 dólares por cabeza en ganado de carne (Snyder y Credille, 2017) y una disminución en la producción de leche de 3 kg/vaca/día (Stone, 1999), afectando así la economía de los productores.

Por lo anterior, se decidió trabajar con un inóculo a base de bacterias ruminales para disminuir, controlar o reducir la acidosis ruminal que afecta la salud del animal, esto como una alternativa para el control de este trastorno digestivo.

OBJETIVOS E HIPÓTESIS

Hipótesis

La adición de un inóculo bacteriano reduce la producción de ácido láctico de bacterias ácido lácticas desarrolladas en un medio de cultivo anaerobio con alto contenido de glucosa y evita la disminución de pH.

Objetivos

Objetivo general

Evaluar un inóculo de bacterias ruminales para controlar y/o tratar la acidosis láctica.

Objetivos específicos

- Comparar *in vitro* un inóculo bacteriano con un tratamiento comercial a base de bicarbonato de sodio para controlar la acidosis láctica.
- Evaluar *in vitro* la capacidad del inóculo aislado para controlar el pH y ácido láctico.
- Evaluar el inóculo en cocultivo con bacterias ruminales de líquido ruminal fresco para controlar el pH y ácido láctico.

REVISIÓN DE LITERATURA

Microbiota, características y funciones

Los microorganismos ruminales viven en estrecha relación simbiótica (mutualista) con el rumiante. El hospedero les ofrece un nicho ambientalmente favorable, con un suministro continuo de alimentos y remoción de productos finales, mientras que, los microorganismos ayudan a la digestión del alimento y proporciona grandes cantidades de energía metabólica al animal hospedero (González, 2003; citado por Sosa, 2006).

La comunidad microbiana, que habita en el rumen, se caracteriza por su alta densidad de población, diversidad microbiana y complejidad de interacciones. En éste órgano se encuentran representantes de los dominios; bacteria, archea, protozoa, además de hongos anaerobios (González, 2003; citado por Sosa, 2006).

Bacterias celulolíticas

Las especies de bacterias más importantes que degradan la celulosa son: *Ruminococcus flavefaciens*, *Ruminococcus albus*, *Bacteroides succinogenes* y *Butyrivibrio fibrisolvens*. Bajo determinadas condiciones especies tales como *Eubacterium cellulosolvens* puede constituir la bacteria celulolítica más importante en el rumen. Cuando los animales consumen dietas ricas en forrajes se descubre un elevado

número de estas bacterias celulolíticas, aunque también se encuentran en dietas ricas en cereales (Church, 1993).

Bacterias hemicelulolíticas y pectinolíticas

Las principales bacterias hemicelulolíticas del rumen son: *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Bacteroides ruminicola* y *Ruminococcus* spp. La mayoría de las especies predominantes de *Ruminococcus* celulolíticas degradan y utilizan con eficacia la hemicelulosa. Las principales bacterias que degradan la pectina son *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Bacteroides ruminicola* y *Lachnospira multiparus*. (Church, 1993).

Bacterias amilolíticas

Con una alimentación normal, los carbohidratos de fácil fermentación son transformados por bacterias ruminales amilolíticas (*Prevotella ruminicola*, *Bacteroides amylophilus*, *Succinomonas amyloletica*, *Streptococcus bovis*) en ácidos grasos volátiles (AGV) (Cobos *et al.*, 2005). Las bacterias amilolíticas suelen predominar en el rumen cuando se consumen dietas ricas en almidón, aunque algunas bacterias como *B. ruminicola*, son más prevalentes con dietas pobres en almidón (Blanco, 1999).

Arqueas productoras de metano

Las arqueas productoras de metano constituyen una clase especial en la población del rumen por su papel en la regulación de la fermentación total al eliminar H₂ gaseoso. La reducción de CO₂ con H₂ gaseoso es el método primario por el cual se produce CH₄ en el rumen. Algunas especies como *Methanosarcina barkerii*, usan metanol, metilamina y acetato para producir CH₄ (Church, 1993). Al mantener baja la concentración de H₂ en el rumen mediante la formación de CH₄, las arqueas metanógenas promueven el crecimiento de otras especies bacterianas en el rumen y permiten una fermentación más eficaz. Las arqueas metanógenas incluyen: *Methanobrevibacter ruminantium*, *Methanobacterium formicicum* y *Methanomicrobium mobile* (Church, 1993).

Protozoos del rumen

El número de protozoos en el rumen es de unos 10^4 a 10^6 células/mL de contenido ruminal. Todos los protozoos son anaerobios estrictos, la mayoría de las especies son ciliados y flagelados. Los ciliados pertenecen a la familia *Isotrichidae* (géneros *Isotricha* y *Dasytricha* son prevalentes) y a la familia *Ophryoscolecidae* (géneros *Entodinium*, *Diplodinium*, *Epidinium* y *Ophryoscolex*).

Los protozoos están capacitados para almacenar hidratos de carbono en forma de polisacáridos somáticos. El establecimiento de la población de protozoos ciliados depende de la presencia de otros animales que ya tengan protozoos en su rumen. La transferencia horizontal de los animales jóvenes se realiza mediante la saliva, bolos alimenticios, cuando consumen alimentos y también a través del aire (Blanco, 1999). Los protozoos son sumamente sensibles a un pH bajo, se ha encontrado que disminuyen a partir de pH 6 y cuando llega a bajar a 5 desaparecen del rumen (Lettat *et al.*, 2010). Con el consumo de alimentos con menor capacidad para fermentar (ej. forrajes) y el aumento de la secreción de saliva, el pH del rumen se torna más alcalino y entonces pueden establecerse los protozoos con mayor facilidad (Blanco, 1999).

Varios estudios indican que el consumo de alimentos secos es un requisito previo para el desarrollo precoz de una población microbiana en el rumen, y que la cantidad consumida de cereales debe ser menor que la de forraje para asegurar que el pH del rumen sea suficientemente alto como para permitir el establecimiento de bacterias celulolíticas y protozoos (Blanco, 1999).

Los protozoos ciliados son muy versátiles en su capacidad para degradar y fermentar una amplia gama de sustratos. Ingieren las partículas de los alimentos y atacan a la totalidad de los principales componentes de los vegetales, incluyendo celulosa, hemicelulosa, pectina, almidón, azúcares solubles y lípidos. No obstante, hay diferencias entre los géneros por su especificidad a los sustratos (Blanco, 1999).

Generalmente, hay mayor número de protozoos en el rumen cuando los animales reciben dietas muy digestibles. Los protozoarios consumen bacterias. *Entodinium*, engullirá las bacterias y las digerirá en su interior, mientras que *Epidinium* primero las lisa y después digiere los componentes celulares (Blanco, 1999).

Los protozoarios del rumen mejoran la digestibilidad y las ganancias de peso. Las concentraciones de ácidos grasos volátiles son superiores cuando los protozoos están presentes (Blanco, 1999). Un efecto beneficioso de la presencia de los protozoarios es que, al ingerir partículas nutritivas y almacenar polisacáridos de reserva, pueden controlar el nivel de sustratos disponibles y, en consecuencia, mantener una fermentación más uniforme durante los intervalos entre las tomas de alimento. La ingestión de bacterias por los protozoos, mantendría el control sobre la fermentación, sobre todo con dietas ricas en cereales (Blanco, 1999).

Las poblaciones de protozoos tampoco sobreviven a una exposición prolongada a un pH inferior a 5.5 (Quinn *et al.*, 1962).

La fermentación ruminal le concede al rumiante una serie de ventajas que no poseen los animales monogástricos dentro de las cuales se encuentran:

- 1) Utilizar alimentos que son muy fibrosos para los no rumiantes.
- 2) Degradar la celulosa liberando el contenido celular, convirtiendo la celulosa en un nutriente primordial.
- 3) Sintetizar proteína microbiana de alto valor biológico a partir de proteína vegetal de bajo valor biológico, del nitrógeno no proteico de la dieta y del reciclaje de productos metabólicos de desecho (urea).
- 4) Proveer todas las vitaminas del complejo B siempre y cuando exista la concentración adecuada de cobalto para la síntesis de vitamina B₁₂ (Blanco, 1999).

Como es de suponer no todo son ventajas por lo que a continuación se relacionan algunas de las desventajas que puede tener la digestión ruminal:

1) El rumiante necesita pasar una buena parte del día (aprox. 8 h) rumiando y debe tener acceso al alimento a intervalos regulares.

2) El rumiante necesita mecanismos complejos para mantener su cámara de fermentación trabajando eficientemente, por ejemplo: a) Adición continua de grandes cantidades de saliva con naturaleza alcalina. b) Movimientos de mezclado con tono marcado de los compartimentos gástricos. c) Mecanismos para la eliminación de gases producto de la fermentación (eructo), para la regurgitación (rumia) y para la absorción de los productos finales de fermentación, así como, para el paso de partículas no digeridas hacia el omaso.

3) Las rutas metabólicas deben ser capaces de utilizar los productos finales de la fermentación, los ácidos grasos volátiles (AGV), de los cuales sólo el ácido propiónico es el único que puede convertirse en glucosa, cuyo requerimiento es elevado en etapas fisiológicas tales como al final de gestación y lactación. Por lo que se considera al proceso de fermentación como ineficiente desde el punto de vista energético, ya que las bacterias gastan energía para su mantenimiento que a su vez se traduce como calor, lo cual se considera una pérdida de energía para el rumiante (Sato *et al.*, 2012).

La producción de AGV por las bacterias del rumen concede energía al animal y se ha encontrado que el exceso de producción de ácidos grasos es considerado la causa por la cual el pH cae cuando las vacas se encuentran en acidosis (Sato *et al.*, 2012). La saliva contiene buffers como el HCO_3 y H_2PO_4 que ayudan a eliminar la acidez y estabilizar el pH (Penner, 2011).

En este contexto, es necesario adaptar los sistemas de alimentación, ya que el aporte exclusivo de forrajes no sería suficiente para cubrir las necesidades del animal, por lo que se ha optado por incrementar el contenido de carbohidratos no fibrosos en la

ración (granos), los cuales incrementan el riesgo de acidosis en el animal. Una de las ventajas es que se genera una velocidad de crecimiento alta, lo cual permite un ciclo de producción relativamente corto. Sin embargo, las cantidades elevadas de concentrado aumentan el riesgo de trastornos digestivos, los cuales suponen el 30% de las bajas registradas durante el ciclo productivo, esto es la acidosis ruminal que afecta directamente la salud del animal y la economía del productor (Blanch, 2009).

Acidosis ruminal

La acidosis ruminal es un trastorno metabólico del rumen de origen alimentario que deriva de la acumulación excesiva de ácido láctico y ácidos grasos volátiles (AGV) en el rumen y de su posterior absorción al torrente sanguíneo (Huintintong, 1988 citado por Blanch, 2009). Esta acumulación se debe a diversos factores como son una ingestión excesiva de carbohidratos fermentables, una aportación insuficiente de sustancias tampón en el rumen y una inadecuada adaptación a dietas altamente fermentables (Oetzel, 2003 citado por Blanch, 2009). Las bacterias celulolíticas son las más sensibles a la caída de pH (Russell y Strobel, 1989).

Cuando se agregan altos niveles de almidón y azúcares, *Streptococcus bovis* comienza a fermentar glucosa a lactato en lugar de AGV, lo que disminuye aún más el pH ruminal y crea un nicho para los lactobacilos que incrementan la producción de lactato y son resistentes a un pH menor a 5.6, llegando a ser predominantes (Nocek, 1997).

Cuando el pH cae por debajo de 5.6, se mejora la absorción de AGV (Nagaraja y Titgemeyer, 2007). Si el pH se mantiene por más de 3 horas en este valor se diagnostica una acidosis (Gozho *et al.*, 2005).

Tipos de acidosis ruminal

Acidosis ruminal clínica o aguda.

Sucede cuando el ganado es sometido a un cambio brusco en la dieta de forrajes a una basada en concentrado, como resultado inicia sobrecrecimiento de *Streptococcus bovis*, que es una bacteria Gram positiva con tolerancia a un pH < 5.5, sin embargo, *S. bovis* es intolerante a pH > 4.5 en este punto el lactobacilo llega a ser el microorganismo dominante lo que provoca una mayor caída de pH (Snyder y Credille, 2017). Este descenso en el pH, va acompañado de un aumento en la concentración de ácido láctico, un aumento en la concentración de AGV y una disminución en la población de protozoos (Nocek, 1997).

Acidosis ruminal subclínica.

No presenta síntomas aparentes y es difícil de diagnosticar. Es consecuencia de la administración continua de dietas ricas en carbohidratos fácilmente fermentables y pobres en componentes fibrosos, que resulta en una elevada producción de AGV. Se caracteriza por caídas intermitentes del pH ruminal a niveles no fisiológicos durante varias horas post-alimentación, y se recupera el pH a los valores normales en cada ciclo de alimentación. Sin embargo, la ingestión de alimento y la producción de los animales se reducen y/o son irregulares lo que ocasiona pérdidas económicas (Blanch, 2009). Los umbrales de pH ruminal para el diagnóstico de acidosis subclínica se han establecido entre 5.5 y 5.8 (Sato *et al.*, 2012).

El pH del rumen de estos animales fluctúa diurnamente entre casi neutro antes de la alimentación matutina y ácido después de la alimentación (Abdela, 2016).

Durante el día se presentan cambios en el pH ruminal y esto es impulsado por la cantidad de carbohidratos fermentables en cada comida. En la Figura 1, se presentan varios cambios en el pH ruminal de una vaca durante todo un día, esta vaca fue alimentada con dietas ricas en granos y forrajes (Krause y Oetzel, 2006).

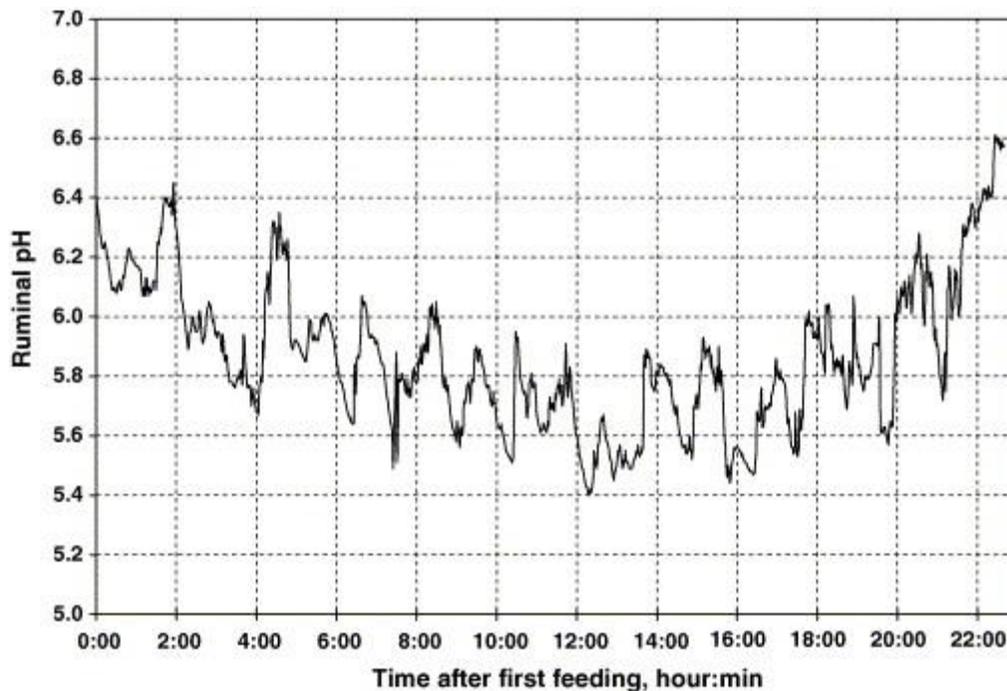


Figura 1. Variaciones en el pH ruminal durante un periodo de 24 h.

Cuando el pH se encuentra por debajo de 6 hay un cambio en la digestibilidad de la Fibra Detergente Neutro (FDN) y la población de bacterias celulolíticas, en 5.5 hay una sobreproducción y acumulación de ácido butírico, mientras que, la acumulación de propiónico aumenta a pH de 5 a 5.5 (Abdela *et al.*, 2016).

La rumenitis es la lesión fundamental de acidosis subaguda, una vez que se inflama el epitelio ruminal, el animal tiende a disminuir su consumo, y algunas bacterias pueden colonizar las papilas y filtrarse hacia la circulación portal (Krause y Oetzel, 2006). También se puede presentar una paraqueratosis, erosión y ulceración del epitelio ruminal (Oetzel, 2007).

Las razones de la depresión en la ingesta de alimento pueden incluir la reducción de la digestibilidad de la fibra y el aumento de los ácidos grasos volátiles, especialmente el propionato y de la osmolaridad en el rumen (Khafipour *et al.*, 2009).

Esta condición de acidosis afecta a más del 20% de las vacas (Khafipour *et al.*, 2009). Un estudio de campo en una granja lechera en el estado de Nueva York se encontró que la acidosis subaguda redujo la producción de leche en 2.7 kg/ día, y de grasa en 0.3% (Stone, 1999). Esto puede representar una pérdida financiera de hasta \$400 dólares por vaca por lactancia.

Una característica común de ambas formas de acidosis, que puede ser un indicador microbiano de un rumen acidótico, es la disminución de la población de protozoarios ciliados (Nagaraja y Titgemeyer, 2007).

Ácido láctico

Hay dos formas quirales de lactato producidas en el rumen: D y L este último es producido por los mamíferos, mientras que la forma D se produce principalmente por microbios. El L-lactato es fácilmente metabolizado por el corazón de mamíferos y tejidos hepáticos. El D- lactato no se metaboliza tan eficazmente como el L- lactato y se acumula en la circulación sanguínea cuando baja el pH del rumen. El lactato en cualquier isómero se absorbe con menos facilidad a través de la pared del rumen que los AGV. Un aumento de la actividad de la piruvato deshidrogenasa en el ambiente ácido, promueve la mayor acumulación de lactato. (Snyder y Credille, 2017).

El lactato tiene un pKa de 3.86 mientras que los AGV tienen un pKa entre 4.7 y 4.9 por ello la caída de pH se asocia más a este ácido (Russell y Chow, 1993). El pH óptimo para la utilización de lactato se encuentra entre 5.9 y 6.2 (Counotte y Prins, 1979). Cuando el pH se mantiene en 5.0 por largos periodos se inhibe el crecimiento de bacteria fermentadora de lactato y por tanto este se acumula (Nagaraja y Titgemeyer, 2007).

El lactato es un agente corrosivo que puede causar daños severos al epitelio del rumen, lo que resulta en un aumento de la osmolaridad del rumen y la proliferación de hongos resistentes a la acidez entre ellos se encuentra el *Fusobacterium necrophorum* que invade la sangre y llega a hígado desarrollando los abscesos (Snyder y Credille,

2017). Su contenido normal en rumen es 10^2g^{-1} y puede incrementar hasta 10^6g^{-1} su cantidad cuando hay acidosis, este hongo se alimenta de lactato como su mayor fuente de energía y no utiliza ningún tipo de azúcar. El pH al que se desarrolla *F. necrophorum* va de 7.4 a 5.6 por debajo de este se inhibe su crecimiento (Tan *et al.*, 1996).

Por otra parte, se provoca la deshidratación por el cambio en la osmolaridad se pierde agua de la circulación al rumen (Snyder y Credille, 2017).

Toxinas ruminales

Las principales toxinas producidas en el rumen y conocidas son el etanol, las aminas y las endotoxinas. El etanol es producto de la fermentación heterofermentativa de los lactobacilos y se produce en cantidades pequeñas que puede metabolizarse fácilmente (Nagaraja y Titgemeyer, 2007).

Las aminas entre las cuales se encuentra histamina, tiramina y triptamina son producidas por descarboxilación de precursores de aminoácidos. Las histaminas son las más estudiadas son producidas por *Allisonella histaminiformans* una bacteria Gram positiva que prospera a un pH de 4.5, se cree que es la principal bacteria en la producción de histamina ruminal. La histamina causa vasodilatación y arteroconstricción y un incremento en la permeabilidad vascular (Garner y Rusell, 2002). Estos efectos son los responsables de la laminitis, ya que se destruye la microcirculación del corion de la pezuña lo que conlleva a una necrosis de la unión entre tejidos provocando dolor y reducción del consumo (Acuña, 2004).

Control de acidosis ruminal

Los rumiantes estabilizan el pH ruminal amortiguando los ácidos orgánicos. Las vacas producen una gran cantidad de amortiguadores a través de la saliva, esta es rica en sodio, potasio, bicarbonatos y fosfatos, y aporta aproximadamente la mitad del

bicarbonato que ingresa al rumen (Owens *et al.*, 1998). La producción de saliva está determinada por la cantidad de tiempo que la vaca pasa comiendo, rumiando y descansando (Maekawa *et al.*, 2002).

Algunos de los factores que pueden ser modificados para controlar la acidosis son:

1. Composición de la dieta. Ahora que se ocupa más grano que forraje es cuando sale de los límites marcados por el NRC (2001), lo que provoca aumento en la incidencia de acidosis, además del tipo de grano, el tipo de conservación y procesado, la estructura del mismo todo ello determinará el perfil y la velocidad de fermentación del mismo. También, tanto los procesados térmicos como las moliendas finas aumentan el riesgo de acidosis (Blanch, 2009).
2. Manejo de los animales. Este factor engloba el carácter de los animales, si existe competencia entre ellos, la accesibilidad a los comederos (*ad libitum* o no), el número y el tamaño de las comidas (Blanch, 2009).

Cuando los animales se adaptan a las dietas altas en concentrado las papilas del rumen tienden a alargarse para tener mayor superficie de absorción permitiendo la mayor capacidad de absorción de AGV en el rumen, ya que los ácidos grasos se absorben pasivamente a través del rumen (Dirksen *et al.*, 1985).

3. La frecuencia de las comidas. Este factor impacta en el pH ruminal. Es recomendable ofrecer la ración a los animales en varias tomas al día, ya que se ha observado que aumentar la frecuencia de alimentación disminuye el riesgo de acidosis (Kaufmann, 1976; French y Kenelly, 1990 citado por Blanch, 2009).
4. Fibra efectiva. Este factor implica asegurar la fibra para mantener la rumia (Snyder y Credille, 2017; Krause y Oetzel, 2006).

Amortiguadores

La saliva es el mejor amortiguador endógeno que tiene el rumiante para mantener las condiciones ruminales, sin embargo, esta es secretada en cantidades limitadas (Nagaraja y Titgemeyer, 2007). El rumiante tiene la capacidad de hacer selección de partículas más largas y más fibrosas en la ración para compensar un poco la acidez evitando las partículas finas ricas en almidón (Bretschneider, 2020).

Los alimentos con altas concentraciones de proteínas degradables pueden aliviar la disminución de pH causada por la fermentación rápida de carbohidratos, ya que los productos de degradación de proteínas (amoníaco) pueden neutralizar la acidez hasta cierto punto mediante la reducción de amoníaco en amonio (Dijkstra *et al.*, 2012).

El uso de amortiguadores se ha aplicado para neutralizar la acidez ruminal, pero no afecta la bacteria causante de la acidosis (*S. bovis*) ni la producción de lactato. Russell y Chow (1993) mencionan que la acción del bicarbonato de sodio se puede explicar, en gran parte, por los efectos indirectos que produce en los animales como, por ejemplo, un aumento en el consumo de agua, la dilución del fluido ruminal aumentando el porcentaje de almidón no degradado en rumen.

El bicarbonato de sodio incrementa el consumo y previene la caída de grasa en leche, esto por el incremento en la capacidad buffer (Russell y Chow, 1993). El uso de sesquicarbonato sódico, resulta en una mejora en la producción de leche corregida por grasa (Solórzano *et al.*, 1989).

El uso de alcalinizante es otra alternativa, el más común es el óxido de magnesio (MgO), que mejora el pH ruminal de manera lenta y progresiva, y solo es aparente después de 24 h de su suplementación, lo que no coincide con el efecto alcalinizante inmediato que se le atribuye con frecuencia (Le Ruyet y Tucker, 1992). Desafortunadamente el MgO en condiciones prácticas es poco palatable por lo que su incorporación se limita a 0.1 – 0.4% de la dieta (Belibasakis y Triantos, 1991).

Un nutriente esencial para las bacterias utilizadoras de ácido láctico es el ácido málico pues permite la actividad de sus principales vías metabólicas. Ciertos ácidos dicarboxílicos, como el fumarato y el malato, disminuyen la producción de lactato e incrementan el pH en ensayos *in vitro*, probablemente porque estimulan a los microorganismos consumidores de lactato (Martin y Streeter, 1995).

La tiamina es el cofactor primordial que se requiere para el metabolismo de los hidratos de carbono. En un estudio realizado por Wang *et al.*, (2015) encontraron que la suplementación con 180mg kg⁻¹ de MS de tiamina redujo la población de *S. bovis* y *Lactobacillus*, mientras que *Megasphaera elsdenii* aumentó drásticamente, lo que podría ayudar a aliviar la acidosis al aumentar el pH del rumen y equilibrar la población de bacterias productoras y consumidoras de ácido láctico.

La suplementación con **levaduras** específicas puede mejorar la utilización de lactato bajo ciertas condiciones de dieta. La inclusión de cultivos de levaduras en la dieta puede atenuar la fermentación ruminal, la producción de ácido láctico (utilizadores de lactato) y ayudar a mantener el pH ruminal más elevado (Cooper y Klopfenstein, 1996). En algunos estudios realizados por Marden *et al.*, (2008) compararon los efectos de las levaduras frente al bicarbonato observaron que ambos tratamientos causan un incremento en el pH, pero la concentración de ácido láctico se redujo y la digestibilidad de la fibra aumentó únicamente cuando se añadieron las levaduras, lo que indica un efecto combinado que incluye el cómo se fermenta el sustrato y las modificaciones de la población microbiana derivada de la disponibilidad de sustratos.

Se han usado aditivos de “microorganismos de alimentación directa” que pueden estabilizar el lactato en el rumen. Un ejemplo de ello es *Selenomona ruminantium* que convierte el lactato en AGV (Nocek *et al.*, 1999).

Henning *et al.* (2010) midieron el potencial de *Megasphaera elsdenii* para controlar la acidosis ruminal reduciendo la concentración de ácido láctico en 10 mmolL⁻¹.

Ionóforos

Los ionóforos colapsan la fuerza motriz de protones en bacterias Gram positivas, disminuyendo la actividad de las principales bacterias productoras de lactato (Schwingel *et al.*, 1989). Así mismo, disminuyen la producción de metano hasta un 30%, debido a un descenso en la producción de hidrógeno que es el sustrato de las arqueas metanogénicas (Russell y Strobel, 1989)

En la alimentación de rumiantes los ionóforos más utilizados son los carboxílicos: monensina y lasolacida, cuyos efectos principales son:

- a) Mejoran la proporción de acetato: propionato.
- b) Aumentan la proporción de lactato para propionato.
- c) Reducen la desaminación y degradación de proteínas en el rumen.
- d) Disminuyen la generación de metano debido a la menor disponibilidad y transferencia de H⁺.
- e) Reducen la producción de ácido láctico
- f) Disminuyen la viscosidad del fluido ruminal (Pinos y González, 2000).

La bacteria *Streptococcus bovis* crece rápidamente cuando se aumenta la disponibilidad de almidón en rumen y la producción de lactato por esta especie es la que frecuentemente disminuye el pH. Afortunadamente es sensible a la monensina (Russell y Strobel, 1989).

Uso de inóculos.

Una vez que un medio de cultivo ha sido preparado y se ha esterilizado para eliminar todos los microorganismos, puede ser inoculado con microorganismos (es decir, se añaden al medio) y, a continuación, el cultivo es incubado en condiciones que favorezcan el crecimiento microbiano (Madigan *et al.*, 2009). El inóculo debe ser representativo del medio ambiente con respecto a las especies microbianas y su

concentración, siendo su propósito principal generar una microflora adecuada para la fermentación o degradación de alimento a través del tiempo (Mould *et al.*, 2005).

Los microorganismos ruminales se usan como inóculo para simular las condiciones del rumen (Dhanao *et al.*, 2004; Váradyová *et al.*, 2005 citado por Sánchez *et al.*, 2016). Los métodos *in vitro* son adecuados para comparar la degradación de sustratos celulósicos y la formación de productos derivados de la fermentación. Los AGV producto de fermentaciones *in vitro* difieren según las condiciones experimentales (Weimer *et al.*, 2011 citado por Sánchez *et al.*, 2016).

Se han realizado estudios basados en bacterias que utilizan el lactato inoculando estas bacterias en líquido ruminal, concretamente de *Megasphaera elsdenii* y *Selenomona ruminantium*. Estas bacterias Gram negativas (Kung y Hession, 1995; Blanch, 2009) son resistentes a la monensina (Russell y Strobel, 1989). Esta estrategia tiene como objetivo prevenir la acidosis ruminal disminuyendo la acumulación de ácido láctico mediante su metabolismo en ácido propiónico por parte de *M. elsdenii*, la principal bacteria utilizadora de lactato fermenta de 60 a 80% de lactato en el rumen (Counotte *et al.*, 1981).

LITERATURA CITADA

- Abdela, N. 2016. Subacute ruminal acidosis (SARA) and its consequence in dairy cattle: A review of past and recent Research at global prospective. *Achievements in the Life Sciences*. 10:187-196.
- Acuña, R. 2004. Pododermatitis aséptica difusa-laminitis y cojeras del bovino. *Fisiopatología y profilaxis*. Ed. Inter-Médica Buenos Aires, Argentina. Cap 7 p.45-61.
- Belibasakis, N. G., Triantos, A. 1991. Effects of sodium carbonate on milk yield, milk composition, and blood components of dairy cows in early lactation. *Journal of Dairy Science* 74: 467- 472.
- Blanch, S. M. 2009. Estudio de la acidosis ruminal y nuevas estrategias de prevención. Bellaterra, Facultad de Veterinaria de Barcelona 244p.
- Blanco, M de R. 1999. Bacterias ruminales. *Producción animal Argentina* 5p

- Bretschneider, G. 2020. Impacto de la severidad de la acidosis ruminal sobre la selección de componentes de la dieta en vacunos para carne. Acidosis ruminal y sabiduría nutricional. Ciencia a Tierra. INTA Balcarce. Argentina
- Church, D. 1993. Fisiología digestiva y nutrición: Zaragoza.
- Cobos, M. A. 2007. Interacción entre microorganismos ruminales. In: Ferrera-Cerrato, R., y A. Alarcón (eds). Microbiología Agrícola. Hongos, Bacterias, Micro y Macrofauna, Control Biológico y Planta-Microorganismo. Ed. Trillas, México D.F. pp: 498-516.
- Cobos, M. A., Guerra, M., López, S., Baez, J. L., González, S., Mendoza, G. D. 2005. Evaluación *in vitro* de dos amortiguadores y un ionóforo sobre variables fermentativas y microbiológicas. Agrociencia. Vol. 39 No. 1 pp 1-9.
- Counotte, G. H. M., Prins, R. A. 1979. Regulation of rumen lactate metabolism and the implication of lactic acid in nutritional disorders of ruminants Veterinary Science Commun. 2 pp. 277-303.
- Cooper, R. y Klopfenstein, T. 1996. Effect of rumensin and feed intake variation on ruminal pH. In. Scientific Update on Rumensin/Tylan/Mycotil for the Professional Feedlot Consultant. pp A1-A14. Elanco Animal Health, Indianapolis, IN.
- Counotte, G. H. Prins, R. A., Janssen, R. H. and De Bie, M. J. 1981. Role of *Megasphaera elsdenii* in the fermentation of DL- lactate in the rumen of dairy cattle. Applied Environment Microbiology. 42: 649-655.
- Dijkstra, J., Ellis, J. L., Kebreab, E., Strathe, A. B., López, S., France, J., Bannink, A. 2012. Ruminal pH regulation and nutritional consequences of low pH. Animal Feed Science and Technology 172(1): 22-33.
- Dirksen, G. U. Liebich, H. G., Mayer, E. 1985. Adaptive changes of the ruminal mucosa and their functional and clinical significance. Bovine Practitioner 20:116- 120.
- Garner, M.R. Flint J. F, Russell J. B. 2002. *Allisonella histaminiformans* gen. nov., sp. A novel bacterium that produces histamine, utilizes histidine as its sole energy source, and could play a role in bovine and equine laminitis. Systematic and applied Microbiology. 25:498-506.
- Goad, D. W., Goad, C. L. and T. G. Nagaraja. 1998. Ruminal microbial and fermentative changes associated with experimentally induced subacute acidosis in steers. Journal of Animal Science. 76: 234-241.
- Gozho, G., Plaizier, C., Krause, D.O., Kennedy, A. D., Wittenberg, K.M. 2005. Subacute ruminal acidosis induces ruminal lipopolysaccharide release and triggers an inflammatory response. Journal of Dairy Science. 88:1399-1403.
- Henning, P.H., Horn, C.H., Steyn, D.G., Meissner, H.H., Hagg, F.M. 2010. The potential of *Megasphaera elsdenii* isolates to control ruminal acidosis. Animal Feed Science and Technology 157:13-19.

- Khafipour, E., Li, S., Plaizier, J. C. and Krause, D.O. 2009. Rumen microbiome composition determined using two nutritional models of subacute ruminal acidosis. *Applied and environment microbiology*. 75 (22): 7115-7124.
- Krause, K. M. and Oetzel R. G. 2006. Understanding and preventing subacute ruminal acidosis in dairy herds: A review. *Animal Feed Science and Technology*. 126:215-236.
- Kung, L. and Hession, A. O. 1995. Preventing *in vitro* lactate accumulation in ruminal fermentations by inoculation with *Megasphaera elsdenii*. *Journal of Animal Science* 73:250-256.
- Le Ruyet, P. and Tucker, W. B. 1992. Ruminal buffers: Effects on Buffering Capacity and pH of Ruminal from Cows Fed a High Concentrate Diet. *Journal Dairy Science* 75:1069- 1077.
- Lettat, A. P., Noziere, M., Silberberg, D. P., Morgavi, C., Berger and Martin, C. 2010. Experimental feed induction of ruminal lactic, propionic, or butyric acidosis in sheep. *Journal Animal Science*. 88: 3041-3046.
- Madigan, M. T., J. M. Martinko, K. S. Bender, D. H. Buckley, and D. A. Stahl. 2009. *Brock Biología de los microorganismos* 12 ed. Pearson Education, Inc., Madrid, España.
- Maekawa, M., Beauchemin, K. A. Christensen, D. A. 2002. Effect of concentrate level and feeding management on chewing activities, saliva production, and ruminal pH of lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 85:1165-1175.
- Marden, J. P., Julien, C., Monteils, V., Auclair E., Monocoulon, R., Bayouthe, C. 2008. How does live yeast differ from sodium bicarbonate to stabilize ruminal pH in High-Yielding dairy cows. *Journal Dairy Science* 91: 3528- 3535.
- Martin, S. A. y Streeter, M. N. 1995. Effect of malate on *in vitro* mixed ruminal microorganism fermentation. *Journal Animal Science* 73: 2141-2145.
- Mould, F. L., Kliem, K. E., Morgan, R., Mauricio, R. M. 2005. *In vitro* microbial inoculum: A review of its function and properties. *Animal Feed Science Technology* 123- 124: 31-50.
- Nagaraja T.G., and Chengappa, M.M. 1998. Liver abscesses in feedlot cattle: a review. *Journal of Animal Science* 76: 287-298.
- Nagaraja, T. G., Titgemeyer E. C. 2007. Ruminal acidosis in beef cattle: the current microbiological and nutritional Outlook. *Journal of Dairy Science*. (Suppl 1): E17-38.
- Nocek, J. E. 1997. Bovine Acidosis: Implications on Laminitis. *Journal of Dairy Science*, 80(5): 1005–1028.

- Oetzel, G.R. 2007. Subacute ruminal acidosis in dairy herds: physiology, pathophysiology, milk fat responses, and nutritional management Proc. AABP 40th Annual Conference, Vancouver, BC, Canada pp. 89-119 de ABDELA
- Owens, F. N., Secrist, D.S., Hill, W.J., Gill, D. R. 1998. Acidosis in cattle: a review. Journal of Animal Science. 76: 275 – 286.
- Paasch, M.L., J. Bouda, O. V. Velásquez, y O.A. Yabuta. 1997. Acidosis ruminal crónica y hallazgos patológicos en vacas lecheras de alta producción. Memorias del XIX Congreso de Buiatría. México, D.F. pp 170-174.
- Penner, G., Steele, J., Aschenbach R. and Mc bride W. 2011. Ruminant nutrition symposium: Molecular adaptation of ruminal epithelia to highly fermentable diets. Journal of Animal Science. 89: 1108-1119.
- Pinos, R. J. M., y González, M. 2000. Efectos biológicos y productivos de los ionóforos en los rumiantes. Interciencia. 25 (8): 379-385.
- Preston, T. R., Leng, R. A. 1987. Matching Ruminant Products Systems with available resources in the tropics and subtropics. Penambul Books, Armidale CTA, Wageningen.
- Quinn, L.Y., Burroghs, W., Christiansen, W. C. 1962. Continuous culture of ruminal microorganisms in chemically defined medium. II. Culture medium studies. Applied Microbiology 10, 583-592.
- Russell, J. B., and Chow, J. M. 1993. Another theory for the action of ruminal buffer salts: decreased starch fermentation and propionate production. Journal of Dairy Science. 76: 826-830.
- Russell, J. and Strobel, H. 1989. Effect of ionophores on ruminal fermentation. Applied Environment and Microbiology. 55: 1-6.
- Sato, S., Ikuta, M. A., Yoshiyuld, T., Murayama, I., Masahiro, K., Okada, K., Mizuguchi, H. 2012. Diagnosis of subacute ruminal acidosis (SARA) by continuous reticular pH measurements in cows. Veterinary Research Communications 36: 201-205.
- Stone W. C. 1999. The effect of subclinical rumen acidosis on milk components Proceedings of the Cornell Nutrition Conference of Feed Manufacturers, Syracuse, N.Y, Cornell University, Ithaca, NY, USA. pp. 40-46 de ABDIELA
- Sánchez, P. y Cobos, M. A. 2016. Producción *in vitro* de ácidos grasos volátiles de bacterias celulolíticas de bacterias reactivadas y bacterias ruminales totales en sustratos celulósicos. Agrocienca 50:565-574
- Schwingel, W. R., Bates, D. B., Denham, S. C. and Beede, D. K. 1989. Lasalocid-catalyzed proton conductance in *Streptococcus bovis* as affected by extracellular potassium. Applied Environment Microbiology. 55: 259-260.

- Snyder, E. and Credille, B. 2017. Diagnosis and treatment of clinical rumen acidosis. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. 33: 451-461.
- Solórzano, L. C., Armentano, L. E., Grummer, R. R. and Dentine, M. R. 1989. Effects of sodium bicarbonate or sodium sesquicarbonate on lactating Holsteins fed a high grain diet. *Journal Dairy Science*. 72: 453- 461.
- Sosa, A. 2006. Efecto de *Aspergillus oryzae* como activador de la fermentación ruminal de *Pennisetum purpureum* en condiciones *in vitro*. Tesis en opción al título académico de Master en Microbiología. Instituto de ciencia animal. La Habana Cuba, 56p.
- Tan, Z. L., Nagaraja, T. G. and Chengappa, M. M. 1996. *Fusobacterium necrophorum* infections: Virulence factors, pathogenic mechanism and control measures. *Veterinary. Research Communications*. 20: 113 – 140.
- Wang, H., Pan, X., Wang, C., Wang, M. and Yu, L. 2015. Effects of different dietary concentrate to forage ratio and thiamine supplementation on the rumen fermentation and ruminal bacterial community in dairy cows. *Animal Production Science* 55: 189-193.
- Yokoyama, M. T., y Johnson. K. A. 1993. Microbiología del rumen e intestino delgado. In: Church, D. C. (ed). *El Rumiante, Fisiología y Nutrición*. Ed. Acribia, Zaragoza, España. pp:137-57.

CAPÍTULO I. EFECTO DE LA INOCULACIÓN CON LÍQUIDO RUMINAL FRESCO (LRF) EN MEDIOS DE CULTIVO CON DIFERENTES CANTIDADES DE GLUCOSA EN EL pH A TRAVÉS DEL TIEMPO.

1.1. RESUMEN

En este estudio se evaluó el efecto de inocular LRF (líquido ruminal fresco) como fuente rica de bacterias ruminales en medios de cultivo GCA-FR (Glucosa-Celobiosa-Almidón, Fluido Ruminal) con diferentes cantidades de glucosa (0, 0.5, 1, 1.5 y 5 g). El objetivo fue conocer el tiempo en que el pH disminuye a valores de ≤ 5.8 y establecer un modelo de acidosis *in vitro*. El experimento consistió en medir el pH a las 0, 1, 2, 3 y 4 h de incubación a 39°C en medios de cultivo inoculados con LRF en las diferentes dosis suministradas de glucosa. Para el análisis estadístico se usó un diseño factorial. Se determinó que el mejor medio de cultivo para trabajar en el control y tratamiento de acidosis es el que contiene 1g/100mL de glucosa donde la acidez que se desea, se presentó en la cuarta hora de incubación del medio.

Palabras clave: acidosis, pH, glucosa, líquido ruminal

1.2. ABSTRACT

In this study, the effect of inoculating LRF (fresh ruminal fluid) as a source of ruminal bacteria in GCA-FR (Glucose-Cellobiose-Starch, Ruminal Fluid) culture media with different amounts of glucose (0, 0.5, 1, 1.5 and 5 g). The objective was to know the time in which the pH decreases to values of ≤ 5.8 and to establish an *in vitro* acidosis model. The experiment consisted of measuring the pH at 0, 1, 2, 3 and 4 h of incubation at 39 °C in culture media inoculated with LRF in the different doses supplied of glucose. A factorial design was used. It was determined that the best culture medium to work in the control and treatment of acidosis is the one that contains 1g / 100mL of glucose where the desired acidity was presented after fourth hour of incubation.

Keywords: acidosis, pH, glucose, ruminal liquid.

1.3. INTRODUCCIÓN

Las vacas lecheras son suplementadas con raciones ricas en carbohidratos, a través del uso de granos y cereales, que pueden fermentarse rápidamente en el rumen, lo que incrementa la producción de ácidos grasos volátiles y lactato, que a su vez se traduce en cambios en el ambiente ruminal provocando principalmente la disminución de pH. Este pH es un parámetro clave en el control del equilibrio ruminal que repercute en la salud de las vacas, ya que de este depende directa o indirectamente la supervivencia de las bacterias y el equilibrio de la microbiota ruminal (Hall, 2001). Cuando el pH disminuye a <5.6 se favorece el desarrollo de microorganismos que alteran el patrón metabólico del rumen y enferman al rumiante. La cantidad de H⁺ producidos dependerá del tipo de dieta y de microorganismos que fermenten dicho nutriente lo cual se verá reflejado en la producción de AGV (Relling y Mettoli, 2002). La implicación de los diferentes glúcidos en los procesos acidogénicos es muy variable, por una parte, los de reserva, que son el principal componente del contenido celular, tienen un gran potencial de fermentación y reducen el pH, así los azúcares solubles se degradan rápidamente en menos de una hora y su presencia favorece la acidosis (Bacha, 1991). Los períodos de pH ruminal bajo perjudican la función de la microflora fibrolítica (Shi y Weimer, 1992).

La glucosa ha sido empleada experimentalmente para estudiar la acidosis ruminal clínica y subclínica, y puede ser una opción para valorar el efecto sobre la fermentación ácido-láctica (Huber, 1979). Por lo que el objetivo de esta investigación fue determinar el efecto de la inoculación de LRF sobre medios de cultivo con diferentes cantidades de glucosa en sustitución a los carbohidratos fácilmente fermentables para conocer el tiempo en que el pH disminuye hasta 5.8.

1.4. MATERIALES Y MÉTODOS

1.4.1. Ubicación geográfica

Este estudio se llevó a cabo en las instalaciones de la granja experimental y Laboratorio de Microbiología Ruminal y Genética Microbiana del Programa de Ganadería del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, ubicado en el km 36.5 carretera México-Texcoco, Montecillo, Estado de México.

1.4.2. Medios de cultivo

Se prepararon tubos de ensayo (18x150 mm) con 9 mL de medio de cultivo glucosa, celobiosa, almidón y fluido ruminal clarificado (GCA-FR) en condiciones de anaerobiosis con inyección de CO₂, donde se trabajaron cuatro tratamientos cada uno con tres repeticiones, los tratamientos contenían diferentes cantidades de glucosa 0.5, 1, 1.5 y 5 g/100 mL (Cuadro 1).

El LRF se recolectó de acuerdo al Reglamento para el uso y cuidado de animales destinados a la investigación en el Colegio de Postgraduados. Consejo general académico. ACUERDO 02.11. (2016) y aprobación del Comité de Cuidado Animal del Programa de Ganadería, Campus Montecillo del Colegio de Postgraduados. El LRF se obtuvo de vaca Jersey canulada, se filtró en una coladera y se conservó en incubadora en un embudo de separación para utilizar solo la parte donde se encuentran las bacterias, mismas que se utilizaron para inocular los medios.

Cuadro 1. Composición de medio de cultivo anaerobio para bacterias totales.

Compuesto	Cantidad para 100 mL de medio de cultivo
Agua destilada, mL	52.6
Líquido ruminal clarificado ⁽¹⁾ , mL	30
Solución mineral I ⁽²⁾ , mL	5
Solución mineral II ⁽³⁾ , mL	5
Carbonato de sodio sln 8% ⁽⁴⁾ , mL	5
Solución cisteína sulfito de sodio ⁽⁵⁾ , mL	2
Solución rezarsurina al 0.1% ⁽⁶⁾ , mL	0.1
Peptona de soya, g	0.2
Extracto de levadura, g	0.1
Glucosa , g	1
Celobiosa	0.06
Almidón	0.06

BT: Bacterias Totales. (1) Líquido ruminal clarificado previamente filtrado en una gasa triple y centrifugado a 10,000 rpm, por 10 min, esterilizado 20 minutos a 15psi, 121°C; (2) Conteniendo (1000mL) 6g de K₂HPO₄; (3) Conteniendo (1000mL) 6g de KH₂PO₄; 6g (NH₄)₂SO₄; 12g NaCl; 2.45g MgSO₄ y 1.6 g de CaCl₂*H₂O; (4) 8 g de Carbonato de Sodio en 100mL de agua destilada; (5) 2.5 g de L-cisteína (disuelta en 15 mL de 2N NaOH) + 2.5 g de Na₂S-9H₂O (en 100mL de H₂O); (6) 0.1 mL de rezarsurina en un volumen final de 100mL.

1.4.3. Medición de pH

Los medios se inocularon con 1 mL de LRF (líquido ruminal fresco) de vaca Jersey canulada y se metieron a incubar a 39° C, el pH se midió con un potenciómetro de la marca ORION A250 (THERMO Fischer Scientific, EUA) ajustado a pH 7 y 4 en las diferentes horas de incubación (0, 1, 2, 3, 4 h), para conocer el tiempo que tarda el medio de cultivo en llegar a la acidez (≤ 5.8) de acuerdo a las diferentes cantidades de glucosa agregadas.

1.4.4. Diseño de análisis estadístico

Se realizó un análisis factorial 5 x 4 con tres repeticiones por dosis suministrada de glucosa (SAS, 2001), para conocer las diferencias en pH respecto al tiempo (0, 1, 2, 3 y 4 h) y cantidad de glucosa, con una comparación de medias con la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

1.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De las cuatro dosis de glucosa aplicadas a los medios, la que mejor respuesta tuvo a los cambios de pH en el tiempo fue 1g/100mL (Cuadro 2). Puesto que el pH disminuye poco a poco hasta que se presenta la acidez en la hora cuatro de incubación.

Cuadro 2. Cambios de pH con las diferentes dosis de glucosa en medio inoculado con LRF en las diferentes horas del experimento.

Hora/Dosis	0.5 g	1 g	1.5 g	5 g	EEM
0	6.64aw	6.57ax	6.21ay	6.03az	0.08
1	6.62aw	6.50bx	6.19ay	6.05az	0.07
2	6.60aw	6.49bx	6.19ay	5.94bz	0.08
3	6.58aw	6.42cx	6.10by	5.83cz	0.09
4	6.57aw	5.87dx	5.88cx	5.74dy	0.10

a, b, c, d. Medias con distinta letra en una fila son diferentes respecto a la dosis ($p \leq 0.05$).

w, x, y, z. Medias con distinta letra en una columna son diferentes respecto a la hora ($p \leq 0.05$).

EEM. Error estándar de la media.

El medio de cultivo con las diferentes dosis de glucosa tiene un pH significativamente diferente en el tiempo de inicio del experimento por lo que la presencia de glucosa en el medio afectó el pH inicial del experimento.

Por otra parte, el tratamiento que no presentó variación alguna fue el de 0.5 g de glucosa. En un estudio similar, un medio que contenía la misma cantidad de glucosa, pero inoculado con *S. bovis*, encontraron un pH de 4.5 a las 6 h de incubación (Asanuma *et al.*, 1999) lo cual indicó que el tipo de inóculo también afectó el pH del medio. Por otra parte, el mejor comportamiento se tuvo con 1 g de glucosa ya que el pH disminuye en la cuarta hora del experimento logrando la acidez que se esperaba mientras que para la dosis de 5 g se tiene un cambio rápido en el pH a partir de la segunda hora del experimento, esto debido al exceso de glucosa en el medio de cultivo que las bacterias fermentan rápidamente, el cual no es un medio apropiado para realizar investigaciones relacionadas con el control de acidosis.

El pH de los medios disminuye debido a la fermentación de la glucosa. Además, una alta producción de AGV se asocia con dietas ricas en concentrados energéticos, por lo tanto, el pH ruminal se disminuye. Por otra parte, la producción de AGV disminuye cuando se dan dietas ricas en forrajes maduros (Relling y Mattioli, 2002).

1.6. CONCLUSIONES

El medio de cultivo GCA-FR con glucosa al 1% inoculado con bacterias ruminales, mostró capacidad para simular una acidosis láctica *in vitro* disminuyendo el pH de 6.57 a 5.87 para la hora cuatro del experimento. Por tanto, este medio de cultivo tiene las características para hacer estudios relacionados con el control y tratamiento de acidosis ruminal.

1.7. 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.
- Bacha, F. 2002. Nutrición, patología digestiva y salud intestinal: Aspectos prácticos. XVIII Curso de Especialización FEDNA.
- Hall, M. B. 2001. Recent advanced in non- NDF carbohydrates for the nutrition of lactating cows, En: Simposio Internacional em bovinos de leite, 2. Lavras. Anais. UFLA
- Huber, T. L. 1979. Physiological effects of acidosis on feedlot cattle. *Journal Animal Science*. 43: 902-909.
- Relling, A., y Mattioli, G. A. 2002. Fisiología digestiva y metabólica de los rumiantes. Facultad de Ciencias Veterinarias UNLP. 73p.
- SAS. Institute Inc. 2001. Statistical Analysis System, SAS. User's Guide: SAS Ins., Cary NC.
- Shi, Y., and Weimer, P. J. 1992. Response-surface analysis of the effects of pH and dilution rate on *Ruminococcus flavefaciens* FD-1 in cellulose-fed continuous culture. *Applied and Environmental Microbiology*. 58(8):2583-2591.

CAPITULO II. TÉCNICA ESPECTROFOTOMÉTRICA PARA DETERMINACIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO CON CLORURO FÉRRICO.

2.1. RESUMEN

La presencia de ácido láctico es un factor importante a considerar cuando se presenta la acidosis, ya que, indica la presencia de bacterias ácido lácticas (BAL). Para determinar la concentración de ácido láctico se probaron dos técnicas espectrofotométricas; la primera basada en la reacción del lactato con el ácido sulfúrico y la segunda basada en la reacción de lactato con el cloruro férrico. Los resultados obtenidos mediante la técnica de reacción del lactato con el ácido sulfúrico fueron muy variables lo que la hace una técnica menos confiable que la técnica con cloruro férrico.

Palabras clave: ácido láctico, espectrofotómetro.

2.2. ABSTRACT

The presence of lactic acid an important factor to consider when acidosis occurs, since it indicates the presence of lactic acid bacteria (LAB). To determine the lactic acid concentration, two spectrophotometric techniques were tested; the first based on the reaction of lactate with sulfuric acid and the second based on the reaction of lactate with ferric chloride. The results obtained by the lactate reaction technique with sulfuric acid were highly variable, which makes it a less reliable technique than the ferric chloride technique.

Keywords: lactic acid, spectrophotometer

2.3. INTRODUCCIÓN

El ácido láctico es un compuesto derivado del metabolismo intermediario de los carbohidratos que, en condiciones normales, en los rumiantes se encuentra en

pequeñas cantidades. Este ácido es más fuerte que los AGV y es en mayor medida el responsable de las alteraciones que se observan cuando se presenta la acidosis en el rumen, por ello la importancia de cuantificarlo y establecer la estrategia para reducirlo (Sienra, 2014). Existen reportes de determinación cualitativa y cuantitativa de ácido láctico desde finales del siglo XIX (1890). George Pease en 1937 hace una revisión del problema de identificación del analito dado que los métodos colorimétricos usando reactivos son cualitativos, y dado el proceso fermentativo se generan ácidos orgánicos de concentración variable que pueden alterar el valor real del ácido láctico (Torres y Gómez, 2019).

Algunas de las técnicas desarrolladas para la determinación cuantitativa del ácido láctico son por medio del HPLC el cual se determina en una matriz compleja de ácidos orgánicos mediante una columna de intercambio catiónico, por la que eluye una fase móvil de H_2SO_4 y es monitoreada con detector UV (Schneider *et al.*, 1987). Otra técnica es con métodos enzimáticos en donde la enzima LDH (Lactato deshidrogenasa) y el dinucleótido de nicotinamida y adenina oxidado (NAD^+) como coenzima, permite diferenciar entre L y D isómeros, es una determinación indirecta y desafortunadamente el kit es muy costoso (Marbach y Weii, 1967). Recientemente, se ha hecho uso de biosensores para detección de ácido láctico donde se utilizan diferentes enzimas solas como la LDH, lactato oxidasa (LOx) y lactato monooxigenasas (LMO) donde se oxida el ácido láctico para generar H_2O_2 , el cual se mide con un electrodo de referencia (Suman *et al.*, 2005). En este contexto, el objetivo de esta investigación fue evaluar la sensibilidad, eficiencia y tiempo de respuesta de dos técnicas espectrofotométricas para la determinación de ácido láctico.

2.4. MATERIALES Y MÉTODOS

2.4.1. Ubicación geográfica

Este estudio se llevó a cabo en las instalaciones de la granja experimental y Laboratorio de Microbiología Ruminal y Genética Microbiana del Programa de

Ganadería del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, ubicado en el km 36.5 carretera México-Texcoco, Montecillo, Estado de México.

2.4.2. Técnicas espectrofotométricas

Se trabajaron dos técnicas espectrofotométricas en laboratorio para la determinar la concentración de ácido láctico en medios de cultivo inoculados con bacterias ruminales. Las técnicas se evaluaron en cuanto a la practicidad y tiempo necesario para trabajarlas de acuerdo a las condiciones que se tienen en el laboratorio.

TÉCNICA 1. MÉTODO DE TAYLOR: REACCIÓN DE LÁCTICO CON ÁCIDO SULFÚRICO (H₂SO₄).

Esta técnica se basa en una estimación colorimétrica en donde el ácido láctico se disocia y el lactato sufre una reacción de oxidación en presencia de ácido sulfúrico, formándose un acetaldehído; este compuesto a su vez reacciona con sulfato de cobre y p-fenilfenol, y se forma un compuesto purpura y se estima la absorbancia en un espectrofotómetro a 570 nm. La lectura de absorbancia que se obtiene se relaciona con la concentración molar de ácido láctico en una curva estándar previamente calibrada (Barker & Summerson, 1941; Taylor, 1995) (Figura 2).

Preparación de la solución estándar

Se preparó una solución estándar con: lactato de litio (C₃H₅LiO₃), agua destilada desionizada (H₂O dd), ácido sulfúrico concentrado (96%) y matraz de borosilicato. El procedimiento consistió en tener un estándar con 100 µg de lactato por mL de solución.

Preparación de la curva de calibración y determinación de ácido láctico

Para preparar la curva de calibración, se utilizaron los siguientes reactivos: ácido sulfúrico, solución de sulfato de cobre al 4% (CuSO₄* 5H₂O 4%) en agua destilada

desionizada (H₂O dd) y solución de p-fenilfenol al 1.5% en etanol 95%. La curva de calibración se preparó de acuerdo al Cuadro 3.

Se utilizaron cinco tubos de ensayo, en cada tubo se depositaron diferentes cantidades de la solución estándar (de 0 a 20 µg de C₃H₅LiO₃, Cuadro 3).

Cuadro 3. Cantidad de solución estándar por tubo de ensayo para curva de calibración con H₂SO₄.

# de tubo	µL de solución estándar	Concentración µg de lactato
1	0	0
2	50	5
3	100	10
4	150	15
5	200	20

Una vez que se tuvieron las diferentes diluciones de la curva estándar, se procedió de la siguiente manera:

- a. Se completó cada tubo a **0.5 mL** de agua destilada desionizada
- b. Se agregaron 3 mL de H₂SO₄ al 96% y se mezcló en un vortex por 1 min
- c. Se incubó a 95°C en un calentador seco (Daigger, EUA) durante 10 min y posteriormente se llevó a temperatura ambiente.
- d. Se adicionaron **50 µL** de CuSO₄ 4% y se homogenizó
- e. Se agregaron **100 µL** de fenilfenol al 1.5% en etanol al 95%, se homogenizo y se dejó reposar por 30 min.
- f. Se tomó lectura de absorbancia a **570 nm** de luz visible en espectrofotómetro Lambda 40 (Perkin Elmer, EUA).
- g. Finalmente se preparó una curva de calibración estándar para la medición de ácido láctico.

TÉCNICA 2. MÉTODO DE BORSHCHEVSKAYA: REACCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO Y CLORURO FÉRRICO (FeCl₃).

Esta determinación se basa en el complejo formado por la reacción entre los iones férricos y los hidroxiaácidos de color amarillo, donde la intensidad de color es

proporcional a la concentración del ácido láctico presente en la muestra. La concentración de ácido se obtiene en una curva de calibración al conocer la densidad óptica de cada muestra obtenida del espectrofotómetro a 390 nm (Pacios *et al.*, 2009).

Curva de calibración y determinación de ácido láctico.

Para realizar la curva de calibración de ácido láctico (Cuadro 4), se prepararon soluciones de ácido láctico de concentración conocida a partir de una solución estándar que contenía 120 mL^{-1} de ácido láctico (Sigma aldrich, EUA).

Cuadro 4. Concentración de solución estándar por tubo de ensaye para curva de calibración con $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.

No. Tubo	Concentración mM	SIn estándar de ác. láctico (mL)	H ₂ O dd (mL)
1	0	0	10
2	20	1.667	8.333
3	60	5	5
4	100	8.333	1.667
5	120	10	0

Preparación de curva.

1. Se tenían cinco tubos de ensaye de acuerdo al Cuadro 4.
2. Se numeraron otros cinco tubos de rosca de 16 x 100 mm previamente esterilizados y secos.
3. El tubo uno contenía 6 mL de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ + 150 μL de H₂O dd y se usó como blanco y como concentración cero en las lecturas de absorbancia.
4. Se agregaron **3 mL** de solución de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.03%) en cada tubo a partir del tubo 2 hasta el tubo 5.
5. Se agregaron **75 μL** de cada dilución de ácido láctico previamente preparada.
6. Se leyó absorbancia a **390 nm** de luz UV en espectrofotómetro Lambda 40 (Perkin Elmer, EUA) en un máximo de 15 minutos.
7. Se resolvió la curva estándar.
- 8.

Preparación de las muestras para medir ácido láctico.

Las muestras se analizaron de la siguiente manera:

1. Centrifugar 1 mL de muestra a 14, 000 rpm durante 10 min, para cada tiempo y repetición. Diluir la muestra centrifugada en dosis de 1:9 (100 μ L de muestra en 900 μ L de H₂O).
2. Tomar 75 μ L de cada muestra y agregarla en tubos con **3 mL** de solución FeCl₃* 6H₂O (0.03%).
3. Medir la absorbancia en el espectrofotómetro lambda 40 en un tiempo máximo de 15 min (Borshchevskaya *et al.*, 2016).

2.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los dos métodos se montaron en las condiciones de laboratorio con los materiales necesarios, las disoluciones utilizadas en la técnica con sulfato de cobre de Taylor (1996), mostraron gran variabilidad en la medición de la cantidad de ácido láctico obtenido en la curva de calibración, a cantidades conocidas de este ácido se obtuvieron diferentes absorbancias.

Este método colorimétrico se basó en la oxidación del analito a partir del H₂SO₄ a acetaldehído para posibilitar la reacción con p-hidroxifenol en presencia de iones de cobre. Se espera una relación lineal entre el aumento de la absorbancia y la concentración del analito en la muestra (Pundir *et al.*, 2016). En este experimento sucedió lo contrario la curva tuvo un comportamiento poco común y con muy baja confiabilidad. En la Figura 2 se nota el color final de la reacción para ser analizada en el espectrofotómetro.

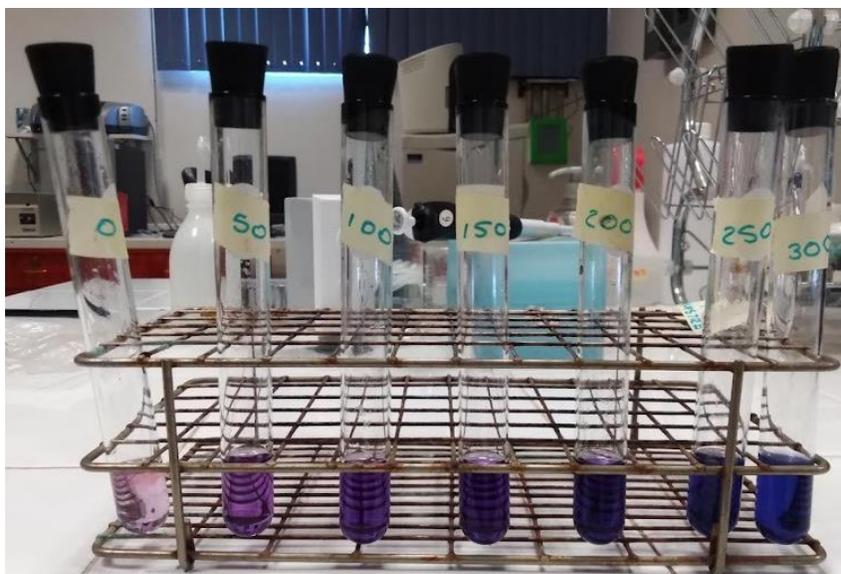


Figura 2. Reacción colorimétrica en tubos con diferentes concentraciones de ácido láctico con técnica de Taylor (1996).

Una desventaja de esta técnica es que se basa en la coloración con p-fenilfenol en presencia de iones metálicos, donde se requiere precipitar proteínas y carbohidratos que pueden interferir en la lectura. Con el inconveniente de que, se usan reactivos que requieren manejo especial y que pueden generar residuos contaminantes (Barnett, 1951; Borshchevskaya *et al.*, 2016). Lo anterior, puede explicar los errores en la obtención de la curva. Esta prueba necesita entre 90 min a 2 horas para la obtención de resultados.

Respecto a la segunda técnica con cloruro férrico ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), la reacción colorimétrica entre iones lactato y cloruro férrico con lecturas de absorbancia a una longitud de onda de 390 nm, resultó un método eficiente para la determinación del analito. La presencia de impurezas, como el etanol reporta un máximo error de 2% de la determinación de ácido láctico, lo que implica una baja interferencia de dichas impurezas (Torres y Gómez, 2019). Este método reduce el margen de error y el tiempo para la obtención de resultados es de aproximadamente una hora. La única desventaja de este método es que la medición del analito es confiable dentro de los primeros 15 minutos de estar en contacto con la sustancia reactiva.

El color de la reacción se puede ver en la Figura 3 y dependerá de la cantidad de ácido láctico presente en las diferentes soluciones.



Figura 3. Reacción colorimétrica en tubos con diferentes concentraciones de ácido láctico con técnica de Borshchevskaya.

De las dos técnicas trabajadas, la segunda con $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ requiere menos equipo y es más accesible. Torres y Gómez (2019) reconocen esta técnica como promisoría para la determinación cuantitativa de ácido láctico para soluciones que contengan más de 0.3 gL^{-1} del analito.

La curva estándar para la técnica de Borshchevskaya con $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ fue la que se utilizó como base para los posteriores experimentos en la determinación de ácido láctico con un $R^2=0.99$ lo que la hace confiable.

Cuadro 5. Curva de calibración con FeCl₃* 6H₂O utilizada para medir ácido láctico.

Concentración (mM)	Absorbancia
0	0.1391
20	0.3764
60	0.7899
100	1.1465
120	1.1989

Error residual: 0.0692. Coeficiente de correlación: **0.9917**

Ecuación: $Y = 1.8559 \times 10^{-1} + 9.0762 \times 10^{-3} * X$

2.6. CONCLUSIONES

La técnica con cloruro férrico fue la que presentó mejor sensibilidad en la cuantificación de ácido láctico, además, resultó ser más eficiente debido a que se requiere menos tiempo para la lectura de los productos de la reacción y la calibración de la curva estándar es confiable.

2.7. LITERATURA CITADA

- Barnett, A. J. 1951. The colorimetric determination of lactic acid in silage. *Biochemical Journal* 49 (4): 527-529. <https://doi.org/10.1042/bj0490527>
- Barker, S. B. and Summerson, W. H. 1941. The Colorimetric Determination of Lactic Acid in Biological Material. *Journal Biology Chemistry* 138: 535-554.
- Borshchevskaya, L.N., Gordeeva, T.L., Kalininam A.N., Sineokii, S.P. 2016. Spectrophotometric determination of lactic acid. *Journal of Analytical Chemistry* 71(8): 755-758.
- Marbach, E.P. and Weii, M.H. 1967. Rapid enzymatic measurement of blood lactate and pyruvate. Use and significance of metaphosphoric acid as a common precipitant. *Clinical Chemistry* 13(4): 314-325.
- Pacios, A., Cruz, Y., Bell, A., Carrera, E. y Michelena, G. 2009. Síntesis y caracterización de lactato ferroso para la fortificación de alimentos infantiles. *Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar*. 63: 36-43 p.
- Pundir, C. S., Narwal, V. and Batra, B. 2016. Determination of lactic acid with special emphasis on biosensing methods: A review. *Biosens Bioelectron* 86:777-90. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2016.07.076>

- Schneider, A. Gerbi, V. and Redoglia, M. A. 1987. A rapid HPLC Method for separation and determination of major organic acids in grape musts and wine. *American Journal of Enology and Viticulture*. 38 (2): 151-155.
- Sienra, R. 2014. Departamento de Rumiantes y Suinos. Facultad de Veterinaria https://www.planagropecuario.org.uy/publicaciones/revista/R86/R86_31.htm
- Suman, S., Singhal, R., Sharma, A. L., Malthotra, B. D., Pundir, C.S. 2005. Development of a lactate biosensor based on conducting copolymer bound lactate oxidase. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 107 (2): 768-772. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2004.12.016>
- Taylor, K. A. C. 1996. A simple Colorimetric Assay for Muramic Acid and Lactic Acid. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 56: 49-58.
- Torres, M., y Gómez, L. 2019. ÁCIDO LÁCTICO: Una revisión sobre los métodos de determinación y purificación. *Biociencias*, 14(2): 111-141.

CAPITULO III. AISLAMIENTO Y LIOFILIZACIÓN DE BACTERIA ÁCIDO LÁCTICA A PARTIR DE UN MEDIO DE CULTIVO GCA-FR.

3.1. RESUMEN

La presencia de bacterias ácido lácticas (BAL) en un medio de cultivo se asocia principalmente, con una disminución en el pH del medio de cultivo a valores <5.8. Para el aislamiento de una BAL ruminal, se inoculó líquido ruminal fresco de vaca Jersey con cánula ruminal en el medio de cultivo GCA-FR rico en glucosa y se incubó por cinco horas a 39 °C. Después, se resembró en medio sólido selectivo para Streptococos. Después de varias transferencias se aisló y se identificó por secuenciación del gen 16s rARN un *Enterococcus spp.* Esta bacteria ruminal se conservó mediante liofilización para su posterior evaluación *in vitro* en el control de acidosis ruminal.

Palabras clave: *Enterococcus spp.*, liofilización, acidosis, aislamiento.

3.2. ABSTRACT

The presence of lactic acid (LAB) in a culture medium is mainly associated with a decrease in the pH of the culture medium to values <5.8. For the isolation of a ruminal BAL, fresh ruminal fluid from a Jersey cow with a ruminal cannula was inoculated in GCA-FR culture medium rich in glucose, and incubated for five hours at 39 ° C. Afterwards, it was reseeded in a selective solid medium for Streptococci. After several transfers, an *Enterococcus spp.* was isolated and identified by sequencing the 16S rRNA gene. This rumen bacterium was preserved by lyophilization for its subsequent *in vitro* evaluation in the control of ruminal acidosis.

Keywords: *Enterococcus spp.*, Lyophilization, acidosis, isolation.

3.3. INTRODUCCIÓN

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son bacterias Gram positivas, tolerantes a la acidez, facultativamente anaerobias que producen ácido láctico como producto final de la fermentación de carbohidratos (Stilez and Holzapfel, 1997). Los principales géneros utilizados como cultivos iniciadores son *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* junto con algunas especies de *Enterococcus* y *Streptococcus*. Estos probióticos están en la industria de productos lácteos y como alternativas a los antibióticos utilizados como promotores del crecimiento (Vieco-Saiz *et al.*, 2019).

Por otra parte, se ha demostrado que la administración de *Lactococcus lactis* es tan eficaz como los antibióticos habituales en el tratamiento de la mastitis bovina (Klostermann *et al.*, 2008). Además, las BAL son utilizadas para mejorar los procesos de ensilaje, la calidad nutritiva del forraje ensilado, y la ganancia diaria de los animales que consumen el silo (Muck *et al.*, 2018). También, algunas BAL han mostrado que minimizan el riesgo de acidosis ruminal (Ghorbani *et al.*, 2002). De lo anterior deriva aislar y conservar una BAL del rumen de una vaca lechera para su posterior evaluación en el tratamiento y control de acidosis ruminal subclínica.

3.4. MATERIALES Y MÉTODOS

Este estudio se llevó a cabo en las instalaciones de la Granja Experimental y en el Laboratorio de Microbiología Ruminal y Genética Microbiana del Programa de Ganadería del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, ubicado en el km 36.5 carretera México-Texcoco, Montecillo, Estado de México.

3.4.1. Aislamiento de *Enterococcus spp.* a partir de líquido ruminal de vaca canulada.

Una vaca Jersey con cánula 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 se filtró por una coladera y se

colocó en incubadora a 39 °C con un embudo de separación para disponer solo de las bacterias, posteriormente se usó 1 mL de LR para inocular tubos con medio de cultivo sólido GCA-FR y se dejó en incubadora (Mettler) a 39°C por cinco horas para tener la acidez en el medio y por tanto encontrar a las BAL. Se preparó un medio sólido selectivo (Cuadro 6) para bacterias ácido lácticas (Streptococcus selective, FLUKA). Se depositaron 15 mL del medio en cajas de Petri y se incubaron a 39 °C por 24 h, para comprobar su esterilidad.

Para el aislamiento, se realizaron tres transferencias en el medio de cultivo sólido y se incubó a 39°C por 24 horas. La transferencia se realizó tres veces para asegurar el aislamiento de un cultivo puro de BAL (Lederberg, 1989).

Cuadro 6. Composición del medio sólido de Streptococcus selective (STR) para BAL.

Agar Streptococcus (STR)	(g/L)
Caseína peptona	14.4
Peptona de soya	5
Cloruro de sodio	4
D(+)- glucosa	5
Citrato de sodio	1
Sulfito de sodio	0.2
L-cistina	0.2
Azida de sodio	0.2
Violeta cristal	0.0002
Agar	13

Durante este proceso se seleccionaron las dos colonias más abundantes y finalmente se obtuvo una que se caracterizó con el color y se observó en un microscopio de contraste a 100x (Zeiss, Alemania) para confirmar la pureza de la colonia aislada.

3.4.2. Conservación del cultivo de *Enterococcus spp.*, prueba de viabilidad y crecimiento.

La colonia bacteriana aislada de *Enterococcus spp.*, de la tercera resiembra, se transfirió con un asa bacteriológica, a un tubo con 9 mL medio de cultivo líquido GCA-FR con glucosa 1% y se incubó por 24 h a 39°C (Lederberg, 1989). Para observar la morfología bacteriana se trabajó nuevamente en el microscopio para ver el crecimiento bacteriano.

Para la conservación por liofilización de la bacteria aislada, se usó el método desarrollado en el Laboratorio de Microbiología Ruminal (Sánchez et al., 2016). Se transfirieron 9 mL del medio previamente inoculado con la bacteria a un matraz Erlenmeyer con 300 mL de medio de cultivo GCA-FR conteniendo 0.5 g/100mL de glucosa, se incubó a 39 °C y se agitó suavemente cada 4 horas hasta completar 48 h de incubación. Se realizó un conteo a la hora 24 de incubación en la cámara Petroff-Hausser para medir el crecimiento.

Terminado el tiempo de incubación, se enfrió el medio 2 h a 4 °C en refrigerador, después, se ultracongeló en un congelador de rodillos (Labconco, EUA) a -38°C, finalmente se metió a la liofilizadora (Labconco, EUA) durante 24 h a -45 °C y con presión de vacío de 133×10^{-3} mBar (Heckly, 1961; Cobos et al., 2011). Se envasaron en viales de 50 mL sellados con tapón de neopreno y aluminio para su posterior estudio. Del material liofilizado se mandó a secuenciar el gen rARN para la identificación de la bacteria ruminal.

3.5.RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Lo que se encontró en la primera siembra de la inoculación en medio sólido de bacterias de la hora cinco, fue un cumulo de colonias bacterianas con tres colores distintivos; una rosada abundante, una blanca cremosa y otra blanca transparente (Figura 4).



Figura 4. Crecimiento bacteriano de la primera siembra obtenida de medios inoculados con LR de las 5 h de incubación para bacterias ácido lácticas (BAL).

Posteriormente se realizó la segunda siembra seleccionando a la colonia de bacterias más separada de entre la caja Petri y se obtuvieron colonias con mayor pureza como se muestra en la Figura 5.

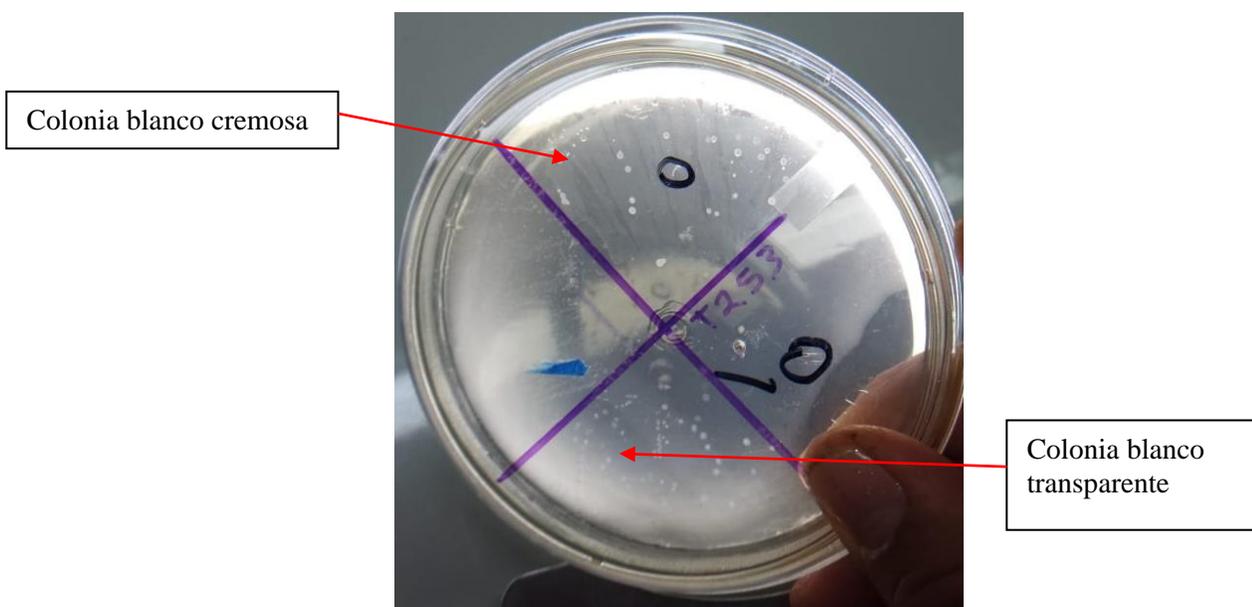


Figura 5. Crecimiento de colonias en la segunda siembra en medio sólido de Streptococcus (STR).

Finalmente, en la tercera siembra, se observó una colonia pura con colonias más separadas (Figura 6), Kung y Hession (1995) mencionan que la fuente de microorganismos puede ser liquido ruminal fresco o un cultivo de bacterias crecidas en medio de cultivo líquido selectivo. Una vez que crecen las colonias se sigue el proceso de aislamiento para obtener cultivos puros de bacterias que degradan un sustrato específico. Así se logró el aislamiento de un *Enterococcus spp.*, vista al microscopio, se identificaron células esféricas que se presentaron en pares, tétradas y otras cadenas de menos de 10 bacterias, por lo que sus características morfológicas son propias de un *Enterococcus spp.* como lo señalan Holth *et al.* (1993) esta bacteria pertenece al grupo de cocos Gram positivos, no motiles, no esporulados.



Figura 6. Crecimiento de colonias en la tercera siembra con un tipo de BAL en medio STR.

Aislada la bacteria se procedió a su liofilización manteniendo a la bacteria viable después de dicho proceso (Figura 7), uno de los factores que influyeron en este resultado fue la siembra en el medio de cultivo GCA-FR, lo cual coincide con lo reportado por Cobos *et al.* (2011) quienes mencionan que algunos componentes del medio de cultivo GCA-FR pueden actuar como agentes protectores durante el proceso de liofilización.



Figura 7. Medios liofilizados de *Enterococcus spp.* a partir de un medio de cultivo GCA-FR con 0.5% de glucosa.

La rehidratación del liofilizado se realizó durante 24 h para la obtención de una concentración considerable de bacterias en el medio, y posteriormente se realizaron los estudios metabólicos correspondientes. De acuerdo con Cobos *et al.* (2011) la concentración de bacterias para *Pedococcus acidilactici* a las 24 h fue de 4.5×10^{11} bacterias por mililitro de medio, en este estudio se cuantificaron 1.2×10^9 bacterias por mililitro de medio a las 24 h de incubación, en la presente investigación se dejó crecer hasta las 48 h pues el crecimiento de la Enterobacteria fue más lento.

Una especie similar a la bacteria aislada, *Enterococcus faecium*, tiene potencial probiótico para ser administrado en sustitutos lácteos en becerros durante la lactancia. El género *Enterococcus*, posee diferentes rutas para el metabolismo de carbohidratos y puede crecer en una amplia variedad de azúcares (Caballero, 2014). En otro estudio se reporta que esta especie es productora de ácido linoleico conjugado (CLA) que tiene propiedades funcionales para los humanos (Conte y Soncin, 2007). Lo anterior podría dar pauta al estudio de otros beneficios de la enterobacteria aislada. Para este estudio lo que se pretende es usarla para el control y tratamiento de acidosis láctica.

Finalmente se aisló un *Enterococcus spp.* (Figura 8) donde se aprecia la pureza de la bacteria encontrando solo cocos y cadenas de los mismos, donde se verificó su morfología y viabilidad.

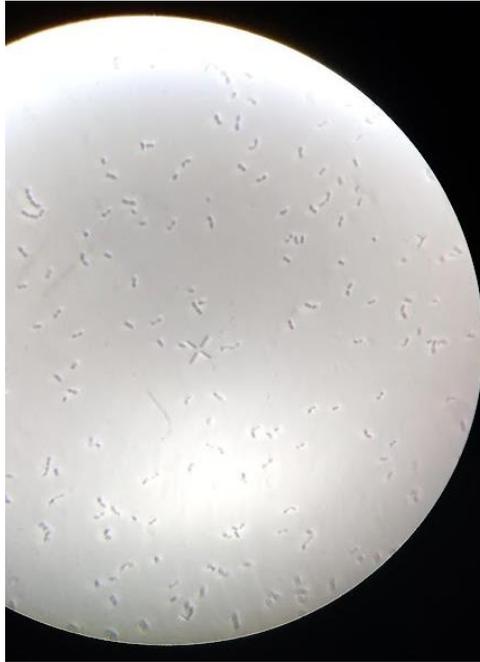


Figura 8. Bacteria aislada de *Enterococcus spp.* vista al microscopio de contraste Zeiss, magnificación 100x.

3.6. CONCLUSIONES

En este estudio se encontró que el medio de cultivo *Streptococcus* selective tiene propiedades para aislar a otras bacterias ácido lácticas (BAL), pues se logró aislar un *Enterococcus spp.* productora de ácido láctico, a partir de muestras de líquido ruminal. Se liofilizó satisfactoriamente y su viabilidad se mantuvo sin problema alguno después del proceso de liofilización, puesto que se volvió a reproducir después de ser rehidratada e incubada nuevamente en medio de cultivo líquido de GCA-FR manteniendo en todo momento su pureza.

3.7. LITERATURA CITADA

- Conte, C. A. y Soncin, S. 2007. Estudio de la producción de ácido linoleico conjugado por cepas de *Lactobacillus* y *Enterococcus* de distintos orígenes. Revista Complutense de Ciencias Veterinarias. 1(2):482-489.
- Caballero, C. Y. 2014. Aislamiento e identificación de bacterias ácido lácticas con potencial probiótico en bovinos Holstein [tesis maestría]. México: Colegio de Postgraduados.
- Cobos, M. A., Ley de Coss, A., Ramírez, N. D., González, S. S., Ferrera, 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.
- Ghorbani, G. R., Morgavi, D. P., Beauchemin, K. A., and Leedle, J. A. Z. 2002. Effects of bacterial direct-fed microbials on ruminal fermentation, blood variables, and the microbial populations of feedlot cattle. Journal Animal Science. 80:1977–1985. doi: 10.2527/2002.8071977x
- Heckly, J. R. 1961. Preservation of bacteria by lyophilization. Advances in Applied Microbiology 3: 1-76.
- Holth, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. A., Staley, J. T., Williams, S.T. 1993. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9th ed. Williams and Wilkis, Maryland, USA, 787 p.
- Klostermann, K., Crispie, F., Flynn, J., Ross, R. P., Hill, C., and Meaney, W. 2008. Intramammary infusion of a live culture of *Lactococcus lactis* for treatment of bovine mastitis: comparison with antibiotic treatment in field trials. Journal of Dairy Research. 75: 365–373. doi: 10.1017/S0022029908003373.
- Kung, L., and Hession, O. 1995. Preventing *in vitro* lactate accumulation in ruminal fermentations by inoculation with *Megasphaera elsdenii*. Journal of animal Science. 73: 250-256. <https://doi.org/10.2527/1995.731250x>
- Lederbeg, J. 1989. Replica plating and indirect selection of bacterial mutants: isolation of preadaptive mutants in bacteria by sib selection. Genetics 121 (3): 395
- Muck, R. E., Nadeau, E. M. G., Mc Allister, T. A., Contreras-Govea, F. E., Santos, M. C., and Kung, L. 2018. Silage review: recent advances and future uses of silage additives. Journal Dairy Science 101:3980–4000. doi: 10.3168/jds.2017-13839.
- Sánchez Santillán Paulino, Mario A. Cobos Peralta, Alberto Alvarado Iglesias, David Espinosa Victoria. **2016**. Uso de carbón activado para conservar bacterias celulolíticas liofilizadas. Agrociencia 50:575-582.

Stilez, M. E. and Holzafel, W. 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int. Journal Food Microbiology*. 36:1-29. doi: 10.1016/s0168-1605(96)01233-0.

Vieco-Saiz, N., Belguesmia, Y., Raspoet, R. Auclair, E., Gancel, F., Kempf, I. and Drider, D. 2019. Benefits and inputs from Lactic Acid Bacteria and their bacteriocins as alternatives to antibiotic growth promoters during food-animal production. *Frontiers in Microbiology*. 10:57 1-17 p. doi: 10.3389/fmicb.2019.00057.

CAPITULO IV. COMPARACIÓN DE DOS INÓCULOS BACTERIANOS Y USO DE BICARBONATO DE SODIO PARA EL CONTROL DE ACIDOSIS *IN VITRO*.

4.1. RESUMEN

La acidosis ruminal es un problema causado por la ingestión excesiva de carbohidratos de fácil fermentación que afecta al ganado. El objetivo de este estudio fue evaluar dos inóculos bacterianos sobre variables fermentativas. Un inóculo fue una bacteria ácido láctica aislada del rumen, identificada como *Enterococcus spp.* El segundo inóculo fue un consorcio de bacterias ruminales extraídas del rumen. Los tratamientos fueron: T1 (testigo) = LRF (líquido ruminal fresco), T2= enterobacteria aislada (EB), T3 = cocultivo de EB + LRF, y T4 = bicarbonato de sodio. Se usó el medio de cultivo GCA-FR enriquecido con glucosa. Los medios de cultivo se incubaron a 39 ± 0.5 °C por 0, 3, 4 y 5 h. Al término de cada período se midió el pH, concentración de ácido láctico, ácidos grasos volátiles (AGV) y concentración de bacterias totales. Los datos se analizaron con un diseño completamente al azar y con prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov. El pH disminuyó en el T1 y T3 a las 5 h, mientras que, en T2 y T4 no se presentó la acidez. La concentración de ácido láctico fue mayor ($P < 0.05$) para el T4 con bicarbonato, aunque no se acidificó el pH del medio de cultivo. En el T2 se mantuvo el pH arriba de 6 hasta las 5 h de incubación. La producción de ácido láctico fue menor, pero no significativamente ($P > 0.05$) con respecto a los tratamientos T1 y T3, que presentaron un aumento en la producción de ácido láctico conforme pasaba el tiempo de incubación. Se concluye, que la BAL aislada tiene una fermentación ácido mixta de la glucosa, por tanto, además de ácido láctico produce AGV y tiene potencial como aditivo microbiano para el control de la acidosis ruminal.

Palabras clave: Enterobacteria, pH, ácido láctico

4.2. ABSTRACT

Ruminal acidosis is a problem caused by excessive ingestion of easily fermented carbohydrates that affects livestock. The objective of this study was to evaluate two bacterial inocula on fermentative variables. One inoculum was a lactic acid bacterium isolated from the rumen, identified as *Enterococcus spp.* The second inoculum was a consortium of ruminal bacteria extracted from the rumen. The treatments were: T1 (control) = LRF (fresh ruminal fluid), T2 = isolated enterobacteria (EB), T3 = EB + LRF co-culture, and T4 = sodium bicarbonate. GCA-FR culture medium enriched with glucose was used. The culture media were incubated at 39 ± 0.5 ° C for 0, 3, 4 and 5 h. At the end of each period, the pH, lactic acid, volatile fatty acids (VFA) and total bacteria concentration were measured. The data were analyzed with a completely randomized design and with the Kolmogorov-Smirnov normality test. The pH decreased in T1 and T3 at 5 h, while acidity was not present in T2 and T4. The lactic acid concentration was higher ($P < 0.05$) for T4 with bicarbonate, although the pH of the culture medium was not acidified. In T2 the pH was maintained above 6 until 5 h of incubation. Lactic acid production was lower, but not significantly ($P > 0.05$) with respect to treatments T1 and T3, which presented an increase in lactic acid production as the incubation time passed. It is concluded that isolated BAL has a mixed acid fermentation of glucose, therefore, in addition to lactic acid it produces VFA and has potential as a microbial additive for the control of ruminal acidosis.

Keywords: Enterobacteria, pH, lactic acid

4.3. INTRODUCCIÓN

La acidosis ruminal es un problema muy común en los rumiantes provocado por las dietas altas en grano que hoy en día son utilizadas para incrementar la producción principalmente en ganado lechero. En México la frecuencia de acidosis ruminal es del 36% en vacas lecheras altas productoras (Paasch *et al.*, 1997). Se estima que entre el 14 y el 42% de las muertes de ganado de corral son debido a trastornos digestivos y

que se gastan en promedio 10 dólares por cabeza en su tratamiento (Snyder y Credille 2017). La población de bacterias ácido lácticas (BAL) ruminales aumenta cuando la dieta consumida por los rumiantes contiene una proporción alta en carbohidratos de fermentación rápida (Dehority, 2003), y son transformados por la actividad homofermentativa de las BAL en ácido láctico principalmente (Yokoyama y Johnson, 1993; Cobos 2007). Una de las principales bacterias productoras de ácido láctico es la *S. bovis* que puede provocar una caída en pH a menos de 5.5 asociado a un exceso de producción de AGV (Keunen *et al.*, 2003). La concentración ruminal de ácido láctico en el líquido ruminal normalmente no sobrepasa 1 mM, sin embargo, durante las acidosis graves puede ser superior a 120 mM (Contreras y Noro, 2010). Para controlar los cambios en el ambiente ruminal debido a esta enfermedad metabólica se han utilizado amortiguadores (bicarbonato de sodio), ionóforos y álcalis (MgO) que neutralizan la acidez ruminal producida por la fermentación de los carbohidratos (Staples y Lough, 1989). El objetivo de esta investigación fue comparar *in vitro* el efecto de la EB (*Enterococcus spp.*), un testigo (LRF) y un tratamiento comercial a base de bicarbonato de sodio sobre los productos finales de la fermentación de carbohidratos fácilmente fermentables pH, ácido láctico, AGV y bacterias totales.

4.4. MATERIALES Y MÉTODOS

Este estudio se llevó a cabo en las instalaciones de la Granja Experimental y Laboratorio de Microbiología Ruminal y Genética Microbiana del Programa de Ganadería del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, ubicado en el km 36.5 carretera México-Texcoco, Montecillo, Estado de México.

4.4.1. Bacteria y medio de cultivo

Una enterobacteria (EB) fue previamente aislada en un medio con exceso de glucosa liofilizada para su conservación e identificada por secuenciación del gen 16S rARN. El medio de cultivo fue Glucosa Celobiosa Almidón - fluido ruminal (GCA-FR) (Cuadro 7).

Cuadro 7. Composición del medio de cultivo anaerobio rico en glucosa para bacterias totales (BT).

Compuesto	Cantidad para 100 mL
Agua destilada, mL	52.6
Líquido ruminal clarificado ⁽¹⁾ , mL	30
Solución mineral I ⁽²⁾ , mL	5
Solución mineral II ⁽³⁾ , mL	5
Carbonato de sodio sln 8% ⁽⁴⁾ , mL	5
Solución cisteína sulfito de sodio ⁽⁵⁾ , mL	2
Solución rezarsurina al 0.1% ⁽⁶⁾ , mL	0.1
Peptona de soya, g	0.2
Extracto de levadura, g	0.1
Glucosa 1%, g	1
Celobiosa	0.06
Almidón	0.06

BT: Bacterias Totales. (1) Líquido ruminal clarificado previamente filtrado en una gasa triple y centrifugado a 10,000 rpm, por 10 min, esterilizado 20 minutos a 15psi, 121°C; (2) Conteniendo (1000mL) 6g de K₂HPO₄; (3) Conteniendo (1000mL) 6g de KH₂PO₄; 6g (NH₄)₂SO₄; 12g NaCl; 2.45g MgSO₄ y 1.6 g de CaCl₂*H₂O; (4) 8 g de Carbonato de Sodio en 100mL de agua destilada; (5) 2.5 g de L-cisteina (disuelta en 15 mL de 2N NaOH) + 2.5 g de Na₂S-9H₂O (en 100 mL de H₂O); (6) 0.1 mL de rezarsurina en un volumen final de 100 mL.

4.4.2. Tratamientos

Los tratamientos aplicados fueron: 1) LRF= líquido ruminal fresco, 2) EB= Enterobacteria, 3) LRF + EB y 4) LRF + Bicarbonato de sodio. Para el último tratamiento con bicarbonato de sodio se agregó 0.1 g en cada tubo con medio de cultivo. Se hicieron cinco repeticiones para los 4 tiempos (0, 3, 4 y 5 h) de los cuatro tratamientos.

Se utilizaron cinco tubos de 18 x 150 mm (PIREX) para cada tratamiento y tiempo, los cuales fueron esterilizados en autoclave (Tuttnauer 2540) a 134 ° C durante 3 min. Luego se prepararon los medios de cultivo con 9 mL de acuerdo al Cuadro 7, bajo flujo de CO₂.

La EB fue activada al adicionar 0.02 g del liofilizado en 9 mL de medio GCA-FR y al cabo de 40 min de incubación se inocularon 5 mL de esta en un vial serológico con 60

mL de medio GCA-FR que 24 h después de incubado a 39 °C fue el que se usó como inóculo para iniciar con una concentración de bacterias de 2.6×10^8 bacterias mL⁻¹ en el medio.

Los medios se inocularon con 1 mL de LRF o EB según el caso y 0.5 mL cuando se hizo en combinación con la EB; los medios se incubaron a 39°C. Al término de cada tiempo se determinó el pH, concentración de ácido láctico, ácido acético, propiónico, butírico y bacterias totales (BT).

El conteo de bacterias totales se realizó para los cuatro tratamientos a la hora 0 y 5 del experimento en las cinco repeticiones. Se fijaron 0.5 mL del medio de cultivo con 0.5 mL de una solución de formaldehído al 37% (J.T. Baker, EUA). El conteo de bacterias se realizó con la cámara Petroff-Hausser con un área de 0.0025 mm², una profundidad de 0.02 mm y un microscopio de contraste marca Zeiss con una magnificación de 100x.

La concentración bacteriana se calculó con la siguiente fórmula:

$$[\text{Bacterias/mL}] = (\bar{X}) (\text{FD}) (2 \times 10^7)$$

Donde:

[Bacterias/mL]= Concentración de bacterias totales por mL

\bar{X} = Media del conteo de bacterias en la cámara

FD= Factor de dilución de la muestra (mL volumen total / mL de muestra)

2×10^7 = Constante de la capacidad volumétrica de la cámara Petroff-Hausser esto es:

1mL= $[1000 \text{ mm}^3 / (0.05 \text{ mm} \times 0.05 \text{ mm} \times 0.02 \text{ mm})]$ igual a 20,000,000.

4.4.3. Determinación de ácidos grasos volátiles

Del medio de cultivo a las 0, 3, 4, 5 h de incubación, se retiró y centrifugó 1 mL a 14 000 rpm durante 10 min en viales que contenían 0.25 mL de ácido metafosfórico en una centrifuga Hettich EBA-21. La concentración de AGV se determinó mediante un

cromatógrafo de gases (Claurus 500, Perkin Elmer™, USA) con automuestreador y equipado con una columna capilar (ELITE-FFAP, Perkin Elmer™, USA) de 15 m, un detector de ionización de flama (FID), el gas acarreador fue N₂ a 60psi e H₂ a 60 psi con aire a 40 psi para generar una flama. Las temperaturas del horno, inyector y columna fueron 120, 250 y 250 °C respectivamente (Sánchez y Cobos 2016). Así se obtuvieron tres picos en un tiempo de retención de 1.22, 1.55 y 2.02 min para acético, propiónico y butírico con un tiempo total de cada corrida de 4.79 min.

4.4.4. Concentración de ácido láctico

Al finalizar cada periodo de incubación (0, 3, 4 y 5 h) y después de centrifugar a 14 000 rpm durante 10 min, se tomaron 100 µL de muestra y se diluyeron en 0.9 mL de agua destilada desionizada y se fueron refrigerando hasta completar el experimento. Posteriormente, se pesaron 0.05 g de FeCl₃*6 H₂O (0.03%) y se aforó a 100 mL con H₂O destilada desionizada, de esta solución se prepararon tubos de 13 x100 mm con 3 mL de la solución y se le fue agregando 75 µL de cada muestra de cada tratamiento y repetición. Además, se preparó un blanco con 3 mL de FeCl₃*6 H₂O (0.03%) y 75 µL de H₂O dd. Se mezclaron las muestras en un vortex y se midieron en un espectrofotómetro UV-Vis (Lamda-40, Perkin Elmer™, USA), calibrado con un método ($r^2=0.99$) de concentración de ácido láctico. La absorbancia se midió a una longitud de onda de 390 nm antes de 15 min de haber mezclado la muestra con la solución de FeCl₃*6 H₂O (0.03%) (Borshchevskaya *et al.*, 2016).

4.4.5. Diseño y análisis estadístico

El diseño experimental fue completamente al azar y la prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov, los datos de concentración de ácido láctico, AGV y pH de los medios de cultivo se analizaron con el procedimiento PROC MIXED de SAS (SAS, 2001). Las medias se compararon con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

4.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La EB y el consorcio de bacterias del LRF fermentaron ácido láctico, acético, propiónico y butírico a partir de glucosa. La EB tuvo un crecimiento exponencial a las 24 horas y alcanzó la cantidad de 2.6×10^8 bacterias por mL. El LRF tuvo una concentración de 9.4×10^8 bacterias por mL al momento de la inoculación.

La concentración de ácido láctico (Cuadro 8) fue mayor ($P < 0.05$) en el tratamiento con bicarbonato a las 5 h de incubación, mientras que la menor producción de láctico fue para *Enterococcus spp.* en el mismo tiempo de incubación, entonces a pesar de que el pH disminuye con la fermentación en todos los tratamientos se genera un cambio en la producción de ácido láctico para el tratamiento con la EB cuando fermenta sola. Asimismo, el pH en el tratamiento con EB no llega a la acidez al final del experimento, a diferencia del medio inoculado con LRF y el cocultivo de LRF con EB cuyo pH llegó a valores de 5 con el exceso de glucosa en el medio de cultivo. Beauchemin *et al.* (2003) señalan que la incidencia de acidosis y reducción de pH no es causada por la acumulación de ácido láctico, sino por la concentración de AGV totales en el medio.

Por otra parte, el tratamiento con Bicarbonato presentó la menor caída en el pH a pesar de que la producción de ácido láctico fue mayor. Erdman (1988), Owens *et al.* (1998) mencionan que el bicarbonato tampona los protones de los ácidos orgánicos incrementando el pH ruminal mejorando la absorción de AGV, lo cual sucede para el tratamiento con bicarbonato donde el pH se mantiene en un rango de 7.4 a 6.9. Asanuma e Hino (2002) mencionan que no es beneficioso inhibir la producción de lactato, pero es deseable controlar su producción y uso para que el lactato siempre este presente, y no se acumule.

Para este experimento se tiene que la EB presenta baja producción de ácido láctico cuando fermenta sola lo cual ayudaría a controlar la cantidad de ácido láctico que se produce por la fermentación de carbohidratos, al igual que cuando se trabaja en cocultivo donde el comportamiento es estadísticamente el mismo con baja producción.

Dehority (2003) indica que el pH es modificado por los ácidos orgánicos producidos por la fermentación, sin embargo, la actividad bacteriana se afecta cuando el pH del medio es menor de 6.0, esto se debe a la acumulación de ácido láctico en dietas ricas en carbohidratos y poca fibra.

El crecimiento de las enterobacterias (EB) se ve afectado cuando el medio se acidifica (Ostling y Lindgren, 2006). Lo anterior, puede explicar un poco el comportamiento de la EB en la hora 5 del experimento en que disminuye su producción de ácido láctico, pero no significativamente ($p \leq 0.05$). La producción de ácido láctico es diferente entre tratamientos para las 5 h del experimento (Cuadro 8).

Chiquette *et al.* (2015) mencionan que las enterobacterias producen ácido láctico que utilizan para mantener a las bacterias que usan lactato en el rumen, como la *Megasphaera elsdenii*. Sin embargo, estas enterobacterias trabajan mejor acompañadas de *Saccharomyces cerevisiae* puesto que controlan la disminución de pH ya que la levadura posiblemente proporciona nutrientes a poblaciones bacterianas específicas.

Cuadro 8. Cambios de pH y concentración de ácido láctico en medios de cultivo.

Tiempo (h)	LRF	EB	LRF+ EB	LRF+ Bicarbonato	EEM
pH					
0	6.86 ay	6.76 az	6.84 ayz	7.42 ax	0.06
3	6.53 by	6.31 bz	6.34 bz	7.10 bx	0.07
4	5.71 cz	6.17 cx	5.33 cy	6.90 cw	0.11
5	5.09 dz	6.02 dy	5.08 dz	6.93 cx	0.18
Ácido láctico mM					
0	4.53 cdy	5.74 bxy	1.40 dyz	11.42 bw	0.11
3	5.26 cyz	7.19 by	4.38 cyz	14.20 bx	0.11
4	12.47 byz	12.04 ayz	8.48 byz	20.33 ax	0.14
5	16.74 axy	11.04 az	13.81 ayz	20.53 ax	0.11

a, b, c, d Medias con distinta letra en una columna son diferentes ($p \leq 0.05$).

w, x, y, z Medias con distinta letra en una hilera son diferentes ($p \leq 0.05$). LRF= liquido ruminal fresco; EEM: error estándar de la media. EB= Enterobacteria; LRF + EB= Liquido ruminal fresco + Enterobacteria; LRF + Bicarbonato= Liquido ruminal fresco + Bicarbonato de sodio (NaHCO_3).

En un estudio realizado por Chiquette *et al.* (2015) se encontró que la producción de láctico fue variable durante la acidosis subaguda detectando un aumento de 5 mM. En este estudio cuando se presentó la acidosis *in vitro* se tuvo una producción de 16.74 mM para el tratamiento con LRF.

Las enterobacterias realizan fermentaciones ácido-mixtas, donde se forman tres ácidos: acético, láctico y succínico- a partir de la fermentación de la glucosa. La glucólisis es la ruta utilizada por los fermentadores ácido-mixtos (Madigan. *et al.*, 2015). Los enterococos producen enzimas útiles (Sarantinopoulos *et al.*, 2001), vitamina B₁₂ (Li *et al.*, 2017) y enterocina que inhibe el crecimiento de ciertos microorganismos dañinos (Arena *et al.*, 2018). Otras bacterias del mismo género como *Enterococcus faecium* ayudan a mantener la actividad de las bacterias que utilizan lactato y estimula el crecimiento de microbios del rumen, que a su vez pueden aumentar el suministro de energía de propionato glucogénico para los rumiantes hospedadores (Pang *et al.*, 2014). Lo anterior muestra que la EB puede ser usada como un probiótico como lo

mencionan Saro, *et al.* (2017) donde diferentes bacterias entre ellas el *Enterococcus*, *Bacillus* y *Lactobacillus* se utilizan para modificar un poco los productos finales de la fermentación en rumiantes.

Ramaswami *et al.* (2005) añadieron un cultivo de *L. acidophilus* a la dieta de terneros en crecimiento y observaron una mejora de 10 % en la ganancia media diaria de los mismos. Por lo que la EB se puede agregar en una dosis mayor para causar un mejor efecto sobre las variables fermentativas cuando se tienen carbohidratos de rápida disponibilidad ya sea sola o con alguna levadura.

En cuanto a los AGV (Cuadro 9) se tiene que en todos los tratamientos domina la fermentación acética, la mayor producción de este ácido se da para el tratamiento con Bicarbonato + LRF con 75% de producción de acético siendo diferente de los demás tratamientos principalmente para la 5 h del experimento, cuando se suministran raciones a base de forraje o pastos la producción es de 60 a 75% y la variación dependerá del tipo de forraje y madurez del mismo (Balch,1957). Para el ácido propiónico se ve incrementada para el tratamiento con LRF y en cocultivo siendo estadísticamente diferente ($p \leq 0.05$) del tratamiento con Bicarbonato y con la EB. En cuanto a la producción de ácido butírico la mayor producción se presenta en el tratamiento con EB y el LRF + EB para la última hora del experimento, lo cual muestra un aumento en la producción de ácido butírico en los tratamientos donde se encuentra presente la EB. Britton y Stock (1987) señalan que la concentración total de AGV, y no solo la del ácido láctico, es la responsable de la acidosis. Chiquette *et al.*, (2015) encontraron que la proporción de butirato y propionato aumenta durante la acidosis subaguda lo cual coincide con este experimento en cuanto al aumento de producción de butírico en el tratamiento de LRF + EB.

Marounek, *et al.* (1985) reportaron una reducción en las proporciones molares del ácido acético y un aumento en las proporciones molares del ácido propiónico y butírico durante la fermentación del almidón con bacterias mixtas, en respuesta a la disminución del pH.

Cuadro 9. Concentración de ácidos grasos volátiles (AGV) y Totales (mM).

Tiempo (h)	LRF	EB	LRF+EB	LRF+ Bicarbonato	EEM
ácido acético mM					
0	73.71az	73.58az	73.22az	73.74bz	0.19
3	72.88az	73.76az	72.72az	75.92ay	0.34
4	72.33az	74.29ay	72.81az	75.28ay	0.34
5	73.01ay	73.80ay	72.58az	75.52ax	0.35
ácido propiónico mM					
0	16.01bx	15.63ax	15.97bx	15.83ax	0.11
3	16.90ay	15.47az	16.56aby	14.66bz	0.23
4	17.47ay	15.33az	16.67aby	15.39abz	0.24
5	17.42ay	15.59az	17.08ay	15.46az	0.27
ácido butírico mM					
0	10.27az	10.79ay	10.81ay	10.43ay	0.10
3	10.23ay	10.76ax	10.72ax	9.42bz	0.14
4	10.20ay	10.38ay	10.52ay	9.33bz	0.13
5	9.57by	10.61ax	10.34ax	9.02bz	0.16
AGV totales mM					
0	25.72bx	22.50az	20.99az	21.53cz	0.48
3	27.54ax	21.54az	21.30az	23.57by	0.64
4	27.42ay	21.94az	22.18az	23.50bz	0.56
5	29.05ax	22.67az	21.17az	26.08ay	0.79

a, b,c Medias con distinta letra en una hilera son diferentes ($p \leq 0.05$).

x, y, z Medias con distinta letra en una columna son diferentes ($p \leq 0.05$). EEM: error estándar de la media. LRF= liquido ruminal fresco; EB=Enterobacteria; LRF + EB= Liquido ruminal fresco + Enterobacteria; LRF + Bicarbonato= Liquido ruminal fresco + Bicarbonato de sodio (NaHCO_3).

La relación entre el incremento de los ácidos grasos volátiles (AGV) 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).

El tratamiento testigo con LRF presenta la mayor producción total de AGV en la 5 h, seguido el tratamiento con bicarbonato encontrando además diferencias significativas ($p \leq 0.05$) en las diferentes horas del experimento (Cuadro 9). Las menores producciones totales de AGV se presentaron en los tratamientos que contenían la EB para todas las horas.

En el Cuadro 10 se tiene un aumento en la cantidad de bacterias totales a través del tiempo en todos los tratamientos excepto para el tratamiento con la EB en la que la concentración se mantiene en 10^8 bacterias por mL.

Cuadro 10. Concentración de bacterias totales en los medios de cultivo en la hora de inicio (0h) y final (5h) del experimento.

Tratamiento	Hora	Bacterias totales (Bac/mL)
LRF	0	3.1×10^8
	5	1.68×10^9
EB	0	1.16×10^8
	5	1.6×10^8
LRF + EB	0	1.76×10^8
	5	1.38×10^9
LRF + Bicarbonato	0	2.24×10^8
	5	1.26×10^9

4.6. CONCLUSIONES

El tratamiento con EB presenta una ligera disminución en pH y una baja producción de ácido láctico cuando fermenta individualmente a diferencia del testigo, mientras que en cocultivo sucede lo contrario, ya que el medio se acidifica y la producción de láctico aumenta. La fermentación principalmente fue acética y en todos los tratamientos hubo crecimiento bacteriano elevado mientras que para el tratamiento con la EB fue lento. La

EB debe ser evaluada con algún otro tipo de bacteria o levadura para mejorar su potencial en el control de la acidosis *in vitro*.

La adición de bicarbonato ayuda a controlar el pH del medio, pero no la producción de ácido láctico.

4.7. LITERATURA CITADA

- Arena, M. P., Capozzi, V., Russo, P., Drider, D., Spano, G. and Fiocco, D. 2018. Immunobiosis and probiosis: antimicrobial activity of lactic acid bacteria with a focus on their antiviral and antifungal properties. *Applied Microbiology Biotechnology* 102: 9949-9958. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9403-9>
- Asanuma, N., Hino, T. 2002. Regulation of fermentation in a ruminal bacterium, *Streptococcus bovis*, with special reference to rumen acidosis. *Animal Science Journal* 73:313-325. <https://doi.org/10.1046/j.1344-3941.2002.00044.x>
- Balch, C. C. and Rowlan, J. 1957. Volatile fatty acids and lactic acid in the rumen of cows receiving a variety of diets. *British Journal of Nutrition* 11: 288-293.
- Beauchemin, K. A., Yang, W. Z., Morgavi, D. P., Ghorbani, G. R., Kautz, W. and Leedle, 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. <https://doi.org/10.2527/2003.8161628x>
- Britton, R. A. and Stock, R. A., 1987. Acidosis, rate of starch digestion intake. *Oklahoma Agriculture Exp. Stn. MP-121* 125-137p.
- Borshchevskaya, L. N., Gordeeva, T. L., Kalinina, A. N. and Sineokii, S. P. 2016. Spectrophotometric Determination of lactic acid. *Journal of Analytical Chemistry* 71(8): 755-758.
- Chiquette, J., Lagrost, J., Girard, C. L., Talbot, G., Li, S., Plaizier, J. C., Hindrichsen, I. K. 2015. Efficacy of the direct-fed microbial *Enterococcus faecium* alone or in combination with *Saccharomyces cerevisiae* or *Lactococcus lactis* during induced subacute ruminal acidosis. *Journal of Dairy Science* 98: 190-203.
- Cobos, M. A. 2007. Interacción entre microorganismos ruminales. In: Ferrera-Cerrato, R., y A. Alarcón (eds). *Microbiología Agrícola. Hongos, Bacterias, Micro y Macrofauna, Control biológico y Planta- Microorganismos*. Ed. Trillas, México D.F. pp 498-516.
- Contreras, P. A. y Noro, M. 2010. Rumen: Morfofisiología, trastornos y modulación de la actividad fermentativa. 3ª Edición. 145 p.

- Dehority, B. A. 2003. Rumen Microbiology. Rumen Bacteria- History, Methods of *in vitro* Cultivation and Discussion of mixed culture fermentation. Nottingham University Press. Pp: 157- 176.
- Dijkstra, J., Ellis, J. L., Kebreab, E., Strathe, A. B., López, S., France, J. and Bannink, A. 2012. Ruminant pH regulation and nutritional consequences of low pH. *Animal Feed Science and Technology* 172(1): 22-33.
- Erdman, R. A. 1988. Dietary buffering requirements of the lactating dairy cow: a review. *Journal of Dairy Science* 71: 3246-3266.
- Iwamoto, M., Asanuma, N., Hino, T. 2001. Effects of pH and Electron Donors on Nitrate and nitrate reduction in ruminal microbiota. *Journal of Animal Science*. 72 (2): 117 - 125.
- Keunen, J. E., Plaizier, J. C., Kyriazakis, T. F. Duffield, T. M., Widowski, M. I., Lindinger, and Mc Bride, B. W. 2003. Effect of subacute ruminal acidosis on free-choice intake of sodium bicarbonate in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 86: 954-957.
- Li, P., Gu, Q., Wang, Y., Yu, Y., Yang, L. and Chen, J. V. 2017. Novel vitamin B₁₂ producing *Enterococcus spp.* And preliminary *in vitro* evaluation of probiotic potentials. *Applied Microbiology and Biotechnology* 101:6155–6164. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8373-7>
- Madigan, M. T., Martinko, J. M. y Parker, J. 2015. Nutrición y metabolismo. In: Brock, Biología de los Microorganismos. 10ª Edición. Ed. Pearson, Prentice Hall, España, pp: 109
- Marounek, M., Bartos, S., Brezina, P. 1985. Factors influencing the production of volatile fatty acids from hemicellulose, pectin and starch by mixed culture of rumen microorganisms. *Zeitschrift Tierphys, Tierern. Futtermittelkunde. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. 53:50-58. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0396.1985.tb00006.x>
- Ostling, C. and Lindgren, S. 2006. Influences of Enterobacteria on the fermentation and aerobic stability of grass silages. *Grass Forage Science* 50:41-47. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2494.1995.tb02292.x>
- Owens, F. N., Secrist, D. S., Hill, W. J. and Gill, D. R. 1998. Acidosis in cattle: a review. *Journal of animal Science* 76: 275 - 286. <https://doi.org/10.2527/1998.761275x>
- Paasch, M. L., Bouda, J., Velázquez, O. V. y Yabuta, O. A. 1997. Acidosis ruminal crónica y hallazgos patológicos en vacas lecheras de alta producción. *Memorias del XIX Congreso de Buiatría. México, D.F.* pp 170-174.
- Pang, D. G., Yang, H. J., Cao, B. B., Wu, T. T. and Wang, J. Q. 2014. The beneficial effect of *Enterococcus faecium* on the *in vitro* ruminal fermentation rate and extent of three typical total mixed rations in northern China. *Livestock Science* 167: 154-160.

- Ramaswamii, N., Chaudhary, L. C., Agarwal, N. and Kamra, D. N. 2005. Effect of lactic acid producing bacteria on the performance of male crossbred calves fed roughage based diet. *Journal of Animal Science* 18(8): 1110-115. doi: 10.5713/ajas.2005.1110.
- Sánchez, P. y Cobos, M. A. 2016. Producción *in vitro* de ácidos grasos volátiles de bacterias celulolíticas de bacterias reactivadas y bacterias ruminales totales en sustratos celulósicos. *Agrociencia* 50:565-574.
- Sarantinopoulos, P., Andrighetto, C., Georgalaki, M. D., Rea, M. C., Lombardi, A., Cogan, T. M., Kalantzopoulos, G. and Tsakalidou, E. 2001. Biochemical properties of enterococci relevant to their technological performance. *International Dairy Journal* 11: 621–647. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(01\)00087-5](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(01)00087-5)
- Saro, C., Mateos, I., Ramilla, M. J. y Carro, M. D. 2017. Uso de probióticos para mejorar la salud digestiva de los rumiantes. *Sitio Argentino de Producción Animal* 1-5p.
- SAS. Institute Inc. 2001. *Statistical Analysis System, SAS. User's Guide: SAS Ins., Cary NC.*
- Snyder, E., y Credille, B. 2017. Diagnosis and treatment of clinical rumen acidosis. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. 33: 451-461.
- Staples, C. R., and Loug, D. S. 1989. Efficacy of supplemental dietary neutralizing agents for lactating dairy cows. *Animal Feed Science and Technology*. 23: 277-285.
- Yokoyama, M. T. y Jhonson, K. A. 1993. Microbiología del rumen e intestino delgado. In: Church, D. C. (ed). *El Rumiante, Fisiología y Nutrición*. Ed. Acribia, Zaragoza, España. pp. 137-157.

CONCLUSIONES GENERALES

El uso de glucosa en cantidad de 1g/100mL (1%) de medio de cultivo para bacterias totales es adecuado para trabajar experimentos *in vitro* basados en la acidosis.

La técnica que mejor respondió para la medición de ácido láctico en las condiciones que se tienen en el laboratorio de microbiología es la que se basa en el uso de Cloruro férrico (Borschevakaya *et al.*, 2016), por su alta confiabilidad, economía y rapidez en la obtención de los resultados.

Por otro lado, el aislamiento de *Enterococcus spp.* abrió las puertas para el estudio de ella en el control de la acidosis, presenta cierta actividad en el control de la fermentación de la glucosa notando cambios en pH, producción de ácido láctico y AGV totales cuando trabaja sola, no así en cocultivo, aunque se han encontrado estudios donde junto con *Saccharomyces cerevisiae* ha tenido respuesta a favor de las variables antes mencionadas en el control de la acidosis.

LITERATURA CITADA

- Abdela, N. 2016. Subacute ruminal acidosis (SARA) and its consequence in dairy cattle: A review of past and recent Research at global prospective. *Achievements in the Life Sciences*. 10:187-196.
- Acuña, R. 2004. Pododermatitis aséptica difusa-laminitis y cojeras del bovino. *Fisiopatología y profilaxis*. Ed. Inter-Médica Buenos Aires, Argentina. Cap 7 p.45-61.
- Arena, M. P., Capozzi, V., Russo, P., Drider, D., Spano, G. and Fiocco, D. 2018. Immunobiosis and probiosis: antimicrobial activity of lactic acid bacteria with a focus on their antiviral and antifungal properties. *Applied Microbiology Biotechnology* 102: 9949-9958. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9403-9>
- Asanuma, N., Hino, T. 2002. Regulation of fermentation in a ruminal bacterium, *Streptococcus bovis*, with special reference to rumen acidosis. *Animal Science Journal* 73:313-325. <https://doi.org/10.1046/j.1344-3941.2002.00044.x>

- 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.
- Bacha, F. 2002. Nutrición, patología digestiva y salud intestinal: Aspectos prácticos. XVIII Curso de Especialización FEDNA.
- Balch, C. C. and Rowland, J. 1957. Volatile fatty acids and lactic acid in the rumen of cows receiving a variety of diets. *British Journal of Nutrition* 11: 288-293.
- Barker, S. B. and Summerson, W. H. 1941. The Colorimetric Determination of Lactic Acid in Biological Material. *Journal Biological Chemistry* 138: 535-554.
- Barnett, A. J. 1951. The colorimetric determination of lactic acid in silage. *Biochemical Journal* 49 (4): 527-529. <https://doi.org/10.1042/bj0490527>
- Beauchemin, K. A., Yang, W. Z., Morgavi, D. P., Ghorbani, G. R., Kautz, W. and Leedle, 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. <https://doi.org/10.2527/2003.8161628x>
- Belibasakis, N. G. and Triantos, A. 1991. Effects of sodium carbonate on milk yield, milk composition, and blood components of dairy cows in early lactation. *Journal of Dairy Science* 74: 467- 472.
- Blanch, S. M. 2009. Estudio de la acidosis ruminal y nuevas estrategias de prevención. Bellaterra, Facultad de Veterinaria de Barcelona 244p.
- Blanco, M de R. 1999. Bacterias ruminales. Producción animal Argentina 5p
- Borshchevskaya, L. N., Gordeeva, T. L., Kalinina, A. N. and Sineokii, S. P. 2016. Spectrophotometric Determination of lactic acid. *Journal of Analytical Chemistry* 71(8): 755-758.
- Bretschneider, G. 2020. Impacto de la severidad de la acidosis ruminal sobre la selección de componentes de la dieta en vacunos para carne. Acidosis ruminal y sabiduría nutricional. Ciencia a Tierra. INTA Balcarce. Argentina
- Britton, R. A. and Stock, R. A., 1987. Acidosis, rate of starch digestion intake. *Oklahoma Agriculture Exp. Stn. MP-121* 125-137p.
- Caballero, C. Y. 2014. Aislamiento e identificación de bacterias ácido lácticas con potencial probiótico en bovinos Holstein [tesis maestría]. México: Colegio de Postgraduados.
- Chiquette, J., Lagrost, J., Girard, C. L., Talbot, G., Li, S., Plaizier, J. C. and Hindrichsen, I. K. 2015. Efficacy of the direct-fed microbial *Enterococcus faecium* alone or in combination with *Saccharomyces cerevisiae* or *Lactococcus lactis* during induced subacute ruminal acidosis. *Journal of Dairy Science* 98: 190-203.

- Church, D. 1993. Fisiología digestiva y nutrición: Zaragoza.
- Cobos, M. A. 2007. Interacción entre microorganismos ruminales. In: Ferrera-Cerrato, R., y A. Alarcón (eds). Microbiología Agrícola. Hongos, Bacterias, Micro y Macrofauna, Control biológico y Planta- Microorganismos. Ed. Trillas, México D.F. pp 498-516.
- Cobos, M. A., Guerra, M., López, S., Baez, J. L., González, S., Mendoza, G. D. 2005. Evaluación *in vitro* de dos amortiguadores y un ionóforo sobre variables fermentativas y microbiológicas. Agrocencia. Vol. 39 No. 1 pp 1-9.
- Cobos, M. A., Ley de Coss, A., Ramírez, N. D., González, S. S., Ferrera, 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.
- Conte, C. A. y Soncin, S. 2007. Estudio de la producción de ácido linoleico conjugado por cepas de *Lactobacillus* y *Enterococcus* de distintos orígenes. Revista Complutense de Ciencias Veterinarias. 1(2):482-489.
- Contreras, P. A. y Noro, M. 2010. Rumen: Morfofisiología, trastornos y modulación de la actividad fermentativa. 3ª Edición. 145 p.
- Cooper, R. y Klopfenstein, T. 1996. Effect of rumensin and feed intake variation on ruminal pH. In. Scientific Update on Rumensin/Tylan/Mycotil for the Professional Feedlot Consultant. pp A1-A14. Elanco Animal Health, Indianapolis, IN.
- Counotte, G. H. M., Prins, R. A. 1979. Regulation of rumen lactate metabolism and the implication of lactic acid in nutritional disorders of ruminants Veterinary Science Commun. 2 pp. 277-303.
- Counotte, G. H. Prins, R. A., Janssen, R. H. and De Bie, M. J. 1981. Role of *Megasphaera elsdenii* in the fermentation of DL- lactate in the rumen of dairy cattle. Applied.Environment Microbiology. 42: 649-655.
- Dehority, B. A. 2003. Rumen Microbiology. Rumen Bacteria- History, Methods of in vitro Cultivation and Discussion of mixed culture fermentation. Nottingham University Press. Pp: 157- 176.
- 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.
- Dirksen, G. U. Liebich, H. G., Mayer, E. 1985. Adaptive changes of the ruminal mucosa and their functional and clinical significance. Bovine Practitioner 20:116- 120.
- Erdman, R. A. 1988. Dietary buffering requirements of the lactating dairy cow: a review. Journal of Dairy Science 71: 3246-3266.

- Garner, M.R. Flint J. F, Russell J. B. 2002. *Allisonella histaminiformans* gen. nov., sp. A novel bacterium that produces histamine, utilizes histidine as its sole energy source, and could play a role in bovine and equine laminitis. Systematic and applied Microbiology. 25:498-506.
- Ghorbani, G. R., Morgavi, D. P., Beauchemin, K. A., and Leedle, J. A. Z. 2002. Effects of bacterial direct-fed microbials on ruminal fermentation, blood variables, and the microbial populations of feedlot cattle. Journal Animal Science. 80:1977–1985. doi: 10.2527/2002.8071977x
- Goad, D. W., Goad, C. L. and T. G. Nagaraja. 1998. Ruminal microbial and fermentative changes associated with experimentally induced subacute acidosis in steers. Journal of Animal Science. 76: 234-241.
- Gozho, G., Plaizier, C., Krause, D.O., Kennedy, A. D., Wittenberg, K.M. 2005. Subacute ruminal acidosis induces ruminal lipopolysaccharide release and triggers an inflammatory response. Journal of Dairy Science. 88:1399-1403.
- Hall, M. B. 2001. Recent advanced in non- NDF carbohydrates for the nutrition of lactating cows, En: Simposio Internacional em bovinos de leite, 2. Lavras. Anais. UFLA
- Heckly, J. R. 1961. Preservation of bacteria by lyophilization. Advances in Applied Microbiology 3: 1-76.
- Henning, P.H., Horn, C.H., Steyn, D.G., Meissner, H.H., Hagg, F.M. 2010. The potential of *Megasphaera elsdenii* isolates to control ruminal acidosis. Animal Feed Science and Technology 157:13-19.
- Holth, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. A., Staley, J. T., Williams, S.T. 1993. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9th ed. Williams and Wilkis, Maryland, USA. 787p.
- Huber, T. L. 1979. Physiological effects of acidosis on feedlot cattle. Journal Animal Science. 43: 902-909.
- Iwamoto, M., Asanuma, N., Hino, T. 2001. Effects of pH and Electron Donors on Nitrate and nitrate reduction in ruminal microbiota. Journal of Animal Science. 72 (2): 117 - 125.
- Keunen, J. E., Plaizier, J. C., Kyriazakis, T. F. Duffield, T. M., Widowski, M. I., Lindinger, and Mc Bride, B. W. 2003. Effect of subacute ruminal acidosis on free-choice intake of sodium bicarbonate in lacting dairy cows. Journal of Dairy Science 86: 954-957.
- Khafipour, E., Li, S., Plaizier, J. C. and Krause, D.O. 2009. Rumen microbiome composition determined using two nutritional models of subacute ruminal acidosis. Applied and environment microbiology. 75 (22): 7115-7124.

- Klostermann, K., Crispie, F., Flynn, J., Ross, R. P., Hill, C., and Meaney, W. 2008. Intramammary infusion of a live culture of *Lactococcus lactis* for treatment of bovine mastitis: comparison with antibiotic treatment in field trials. *Journal of Dairy Research*. 75: 365–373. doi: 10.1017/S0022029908003373.
- Krause, K. M. and Oetzel R. G. 2006. Understanding and preventing subacute ruminal acidosis in dairy herds: A review. *Animal Feed Science and Technology*. 126:215-236.
- Kung, L., and Hession, O. 1995. Preventing *in vitro* lactate accumulation in ruminal fermentations by inoculation with *Megasphaera elsdenii*. *Journal of animal Science*. 73: 250-256. <https://doi.org/10.2527/1995.731250x>
- Le Ruyet, P. and Tucker, W. B. 1992. Ruminal buffers: Effects on Buffering Capacity and pH of Ruminal from Cows Fed a High Concentrate Diet. *Journal Dairy Science* 75:1069- 1077.
- Lederbeg, J. 1989. Replica plating and indirect selection of bacterial mutants: isolation of preadaptive mutants in bacteria by sib selection. *Genetics* 121 (3): 395
- Lettat, A. P., Noziere, M., Silberberg, D. P., Morgavi, C., Berger and Martin, C. 2010. Experimental feed induction of ruminal lactic, propionic, or butyric acidosis in sheep. *Journal Animal Science*. 88: 3041-3046.
- Li, P., Gu, Q., Wang, Y., Yu, Y., Yang, L. and Chen, J. V. 2017. Novel vitamin B₁₂ producing *Enterococcus spp.* And preliminary *in vitro* evaluation of probiotic potentials. *Applied Microbiology and Biotechnology* 101:6155–6164. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8373-7>
- Madigan, M. T., Martinko, J. M. y Parker, J. 2015. Nutrición y metabolismo. In: Brock, *Biología de los Microorganismos*. 10ª Edición. Ed. Pearson, Prentice Hall, España, pp: 109
- Maekawa, M., Beauchemin, K. A. Christensen, D. A. 2002. Effect of concentrate level and feeding management on chewing activities, saliva production, and ruminal pH of lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 85:1165-1175.
- Marbach, E.P. and Weii, M.H. 1967. Rapid enzymatic measurement of blood lactate and pyruvate. Use and significance of metaphosphoric acid as a common precipitant. *Clinical Chemistry* 13(4): 314-325.
- Marden, J. P., Julien, C., Monteils, V., Auclair E., Monocoulon, R., Bayouthe, C. 2008. How does live yeast differ from sodium bicarbonate to stabilize ruminal pH in High-Yielding dairy cows. *Journal Dairy Science* 91: 3528- 3535.
- Marounek, M., Bartos, S., Brezina, P. 1985. Factors influencing the production of volatile fatty acids from hemicellulose, pectin and starch by mixed culture of rumen microorganisms. *Zeitschrift Tierphys, Tierern. Futtermittelkunde. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. 53:50-58. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0396.1985.tb00006.x>

- Martin, S. A. y Streeter, M. N. 1995. Effect of malate on *in vitro* mixed ruminal microorganism fermentation. *Journal Animal Science* 73: 2141-2145.
- Mould, F. L., Kliem, K. E., Morgan, R., Mauricio, R. M. 2005. *In vitro* microbial inoculum: A review of its function and properties. *Animal Feed Science Technology* 123- 124: 31-50.
- Muck, R. E., Nadeau, E. M. G., Mc Allister, T. A., Contreras-Govea, F. E., Santos, M. C., and Kung, L. 2018. Silage review: recent advances and future uses of silage additives. *Journal Dairy Science* 101:3980–4000. doi: 10.3168/jds.2017-13839.
- Nagaraja T.G., and Chengappa, M. M. 1998. Liver abscesses in feedlot cattle: a review. *Journal of Animal Science* 76: 287-298.
- Nagaraja, T. G., Titgemeyer E. C. 2007. Ruminal acidosis in beef cattle: the current microbiological and nutritional Outlook. *Journal of Dairy Science*. (Suppl 1): E17-38.
- Nocek, J. E. 1997. Bovine Acidosis: Implications on Laminitis. *Journal of Dairy Science*, 80(5): 1005–1028.
- Oetzel, G.R. 2007. Subacute ruminal acidosis in dairy herds: physiology, pathophysiology, milk fat responses, and nutritional management Proc. AABP 40th Annual Conference, Vancouver, BC, Canada pp. 89-119 de ABDELA
- Ostling, C. and Lindgren, S. 2006. Influences of Enterobacteria on the fermentation and aerobic stability of grass silages. *Grass Forage Science* 50:41-47. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2494.1995.tb02292.x>
- Owens, F. N., Secrist, D. S., Hill, W. J. and Gill, D. R. 1998. Acidosis in cattle: a review. *Journal of animal Science* 76: 275 - 286. <https://doi.org/10.2527/1998.761275x>
- Paasch, M. L., Bouda, J., Velázquez, O. V. y Yabuta, O. A. 1997. Acidosis ruminal crónica y hallazgos patológicos en vacas lecheras de alta producción. *Memorias del XIX Congreso de Buiatría. México, D.F.* pp 170-174.
- Pacios, A., Cruz, Y., Bell, A., Carrera, E. y Michelena, G. 2009. Síntesis y caracterización de lactato ferroso para la fortificación de alimentos infantiles. *Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar*. 63: 36-43 p.
- Pang, D. G., Yang, H. J., Cao, B. B., Wu, T. T. and Wang, J. Q. 2014. The beneficial effect of *Enterococcus faecium* on the *in vitro* ruminal fermentation rate and extent of three typical total mixed rations in northern China. *Livestock Science* 167: 154-160.
- Penner, G., Steele, J., Aschenbach R. and Mc bride W. 2011. Ruminant nutrition symposium: Molecular adaptation of ruminal epithelia to highly fermentable diets. *Journal of Animal Science*. 89: 1108-1119.
- Pinos, R. J. M., y González, M. 2000. Efectos biológicos y productivos de los ionóforos en los rumiantes. *Interciencia*. 25 (8): 379-385.

- Preston, T. R., Leng, R. A. 1987. Matching Ruminant Products Systems with available resources in the tropics and subtropics. Penambul Books, Armidale CTA, Wageningen.
- Pundir, C. S., Narwal, V. and Batra, B. 2016. Determination of lactic acid with special emphasis on biosensing methods: A review. Biosens Bioelectron 86:777–90. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2016.07.076>
- Quinn, L.Y., Burroghs, W., Christiansen, W. C. 1962. Continuous culture of ruminal microorganisms in chemically defined medium. II. Culture medium studies. Applied Microbiology 10, 583-592.
- Ramaswamii, N., Chaudhary, L. C., Agarwal, N. and Kamra, D. N. 2005. Effect of lactic acid producing bacteria on the performance of male crossbred calves fed roughage based diet. Journal of Animal Science 18(8): 1110-115. doi: 10.5713/ajas.2005.1110.
- Relling, A., y Mattioli, G. A. 2002. Fisiología digestiva y metabólica de los rumiantes. Facultad de Ciencias Veterinarias UNLP. 73p.
- Russell, J. and Strobel, H. 1989. Effect of ionophores on ruminal fermentation. Applied Environment and Microbiology. 55: 1-6.
- Russell, J. B., and Chow, J. M. 1993. Another theory for the action of ruminal buffer salts: decreased starch fermentation and propionate production. Journal of Dairy Science. 76: 826-830.
- Sánchez, P. y Cobos, M. A. 2016. Producción *in vitro* de ácidos grasos volátiles de bacterias celulolíticas de bacterias reactivadas y bacterias ruminales totales en sustratos celulósicos. Agrociencia 50:565-574
- Sarantinopoulos, P., Andrighetto, C., Georgalaki, M. D., Rea, M. C., Lombardi, A., Cogan, T. M., Kalantzopoulos, G. and Tsakalidou, E. 2001. Biochemical properties of enterococci relevant to their technological performance. International Dairy Journal 11: 621–647. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(01\)00087-5](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(01)00087-5)
- Saro, C., Mateos, I., Ramilla, M. J. y Carro, M. D. 2017. Uso de probióticos para mejorar la salud digestiva de los rumiantes. Sitio Argentino de Producción Animal 1-5p.
- SAS. Institute Inc. 2001. Statistical Analysis System, SAS. User's Guide: SAS Ins., Cary NC.
- Sato, S., Ikuta, M. A., Yoshiyuld, T., Murayama, I., Masahiro, K., Okada, K., Mizuguchi, H. 2012. Diagnosis of subacute ruminal acidosis (SARA) by continuous reticular pH measurements in cows. Veterinary Research Communications 36: 201-205.
- Schneider, A. Gerbi, V. and Redoglia, M. A. 1987. A rapid HPLC Method for separation and determination of major organic acids in grape musts and wine. American Journal of Enology and Viticulture. 38 (2): 151-155.

- Schwengel, W. R., Bates, D. B., Denham, S. C. and Beede, D. K. 1989. Lasalocid-catalyzed proton conductance in *Streptococcus bovis* as affected by extracellular potassium. *Applied Environment Microbiology*. 55: 259-260.
- Shi, Y., and Weimer, P. J. 1992. Response-surface analysis of the effects of pH and dilution rate on *Ruminococcus flavefaciens* FD-1 in cellulose-fed continuous culture. *Applied and Environmental Microbiology*. 58(8):2583-2591.
- Sienra, R. 2014. Departamento de Rumiantes y Suinos. Facultad de Veterinaria https://www.planagropecuario.org.uy/publicaciones/revista/R86/R86_31.htm
- Snyder, E. and Credille, B. 2017. Diagnosis and treatment of clinical rumen acidosis. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. 33: 451-461.
- Solórzano, L. C., Armentano, L. E., Grummer, R. R. and Dentine, M. R. 1989. Effects of sodium bicarbonate or sodium sesquicarbonate on lactating Holsteins fed a high grain diet. *Journal Dairy Science*. 72: 453- 461.
- Sosa, A. 2006. Efecto de *Aspergillus oryzae* como activador de la fermentación ruminal de *Pennisetum purpureum* en condiciones *in vitro*. Tesis en opción al título académico de Master en Microbiología. Instituto de ciencia animal. La Habana Cuba, 56p.
- Staples, C. R., and Loug, D. S. 1989. Efficacy of supplemental dietary neutralizing agents for lactating dairy cows. *Animal Feed Science and Technology*. 23: 277-285.
- Stilez, M. E. and Holzapfel, W. 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int. Journal Food Microbiology*. 36:1-29. doi: 10.1016/s0168-1605(96)01233-0.
- Stone W. C. 1999. The effect of subclinical rumen acidosis on milk components Proceedings of the Cornell Nutrition Conference of Feed Manufacturers, Syracuse, N.Y, Cornell University, Ithaca, NY, USA. pp. 40-46 de ABDIELA
- Suman, S., Singhal, R., Sharma, A. L., Malthotra, B. D., Pundir, C.S. 2005. Development of a lactate biosensor based on conducting copolymer bound lactate oxidase. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 107 (2): 768-772. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2004.12.016>
- Tan, Z. L., Nagaraja, T. G. and Chengappa, M. M. 1996. *Fusobacterium necrophorum* infections: Virulence factors, pathogenic mechanism and control measures. *Veterinary. Research Communications*. 20: 113 – 140.
- Taylor, K. A. C. 1995. A simple Colorimetric Assay for Muramic Acid and Lactic Acid. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 56: 49-58.
- Torres, M., y Gómez, L. 2019. ÁCIDO LÁCTICO: Una revisión sobre los métodos de determinación y purificación. *Biociencias*, 14(2): 111-141.

- Vienco-Saiz, N., Belguesmia, Y., Raspoet, R. Auclair, E., Gancel, F., Kempf, I. and Drider, D. 2019. Benefits and inputs from Lactic Acid Bacteria and their bacteriocins as alternatives to antibiotic growth promoters during food-animal production. *Frontiers in Microbiology*. 10:57 1-17 p. doi: 10.3389/fmicb.2019.00057.
- Wang, H., Pan, X., Wang, C., Wang, M. and Yu, L. 2015. Effects of different dietary concentrate to forage ratio and thiamine supplementation on the rumen fermentation and ruminal bacterial community in dairy cows. *Animal Production Science* 55: 189-193.
- Yokoyama, M. T. y Jhonson, K. A. 1993. Microbiología del rumen e intestino delgado. In: Church, D. C. (ed). *El Rumiante, Fisiología y Nutrición*. Ed. Acribia, Zaragoza, España. pp. 137-157.