

ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE LA CEPA DE *Pediococcus acidilactici* AISLADA DEL RUMEN DE BORREGOS Y UN CONSORCIO DE BACTERIA RUMINALES

COMPARATIVE ESTUDIO BETWEEN STRAIN *Pediococcus acidilactici* AISOLATED FROM RUMEN SHEEP AND A RUMINAL BACTERIA GROUP

Alejandro Ley de-Coss^{1*}, Concepción Arce-Espino¹, Mario A. Cobos-Peralta²,
David Hernández-Sánchez², René Pinto-Ruiz³

¹Cuerpo Académico Ganadería Tropical Sustentable, Facultad de Ciencias Agrícolas Campus IV, Universidad Autónoma de Chiapas. Carretera Costera y Estación Huehuetán. 30660, Huehuetán, Chiapas. (aleycoss@gmail.com). ²Programa de Ganadería, Colegio de Postgraduados, Km 36.5, Carretera México-Texcoco. 56230. Montecillo, Texcoco, Estado de México. ³Facultad de Ciencias Agronómicas Campus V, Universidad Autónoma de Chiapas. Km 84.5, Carretera Tuxtla Gutiérrez-Villaflores. 30475. Villaflores, Chiapas.

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue evaluar *Pediococcus acidilactici* (PA) *in vitro* para determinar la producción de ácido láctico, acético, propiónico y butírico, así como los cambios de pH, cuando se adiciona a un medio de cultivo con proporción alta de carbohidratos no estructurales. El diseño experimental fue completamente al azar, se evaluó el cultivo liofilizado de PA (T1) y se comparó con un consorcio de bacterias del fluido ruminal (FR). Los inóculos fueron adicionados a un medio de cultivo anaerobio con D-(+)-glucosa (5 %) más una dieta alta en energía; además se evaluó la adición de monensina (MO) y lasalocida (LA) al medio. Los medios se incubaron a 38 ± 0.5 °C por 3, 6 y 12 h; al terminar cada periodo se evaluó la concentración de ácido láctico, ácidos grasos volátiles (AGV), pH, concentración de bacterias totales (BT) y bacterias ácido lácticas (BAL). Los resultados se evaluaron mediante el procedimiento GLM y una prueba de suma de rangos de Wilcoxon para las concentraciones de BT y BAL. La producción de ácido láctico en los medios inoculados con PA y FR sin ionóforos fue mayor ($p \leq 0.05$), pero no cambió el pH a las 12 h de incubación, aunque se redujo desde las 3 h en todos los tratamientos, incluyendo los de producción menor de láctico ($p \leq 0.05$), mientras que la producción de AGV totales fue similar entre tratamientos. La cantidad mayor ($p \leq 0.05$) de BT se encontró en los medios sin ionóforos inoculados con FR, comparado con los inoculados con PA;

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate *Pediococcus acidilactici* (PA) *in vitro* to determine production of lactic, acetic, propionic and butyric acids, as well as changes in pH, when added to a culture medium with high proportion of non-structural carbohydrates. The experimental design was completely randomized, the lyophilized culture of PA (T1) was evaluated and compared with a group of bacteria of the rumen fluid (RF). The inocula were added to an anaerobic culture medium with D-(+)-glucose (5 %), plus a high-energy diet; besides the addition of monensin (MO) and lasalocid (LA) to the medium was evaluated. Media were incubated at 38 ± 0.5 °C for 3, 6 and 12 h; after each period it was assessed the concentration of lactic acid, volatile fatty acids (VFA), pH, concentration of total bacteria (TB) and lactic acid bacteria (LAB). The results were analyzed using the GLM procedure and by Wilcoxon rank-sum test for TB and LAB concentrations. Lactic acid production was greater ($p \leq 0.05$) in the media inoculated with PA and RF without ionophores, but pH at 12 h of incubation did not change, although pH was reduced since 3 h in all treatments including those with lower production of lactic acid ($p \leq 0.05$), whereas production of total VFA was similar among treatments. The greatest amount ($p \leq 0.05$) of BT was found in the media without ionophores inoculated with RF, compared to those inoculated with PA; the greatest amount of LAB was found in treatments without ionophores. Under these conditions *P. acidilactici* had a heterofermentative activity producing similar amounts of lactic, acetic, propionic and butyric acids regarding RF; in addition it was sensitive to the ionophores used.

*Autor responsable ♦ Author for correspondence.

Recibido: febrero, 2012. Aprobado: junio, 2013.

Publicado como ARTÍCULO en Agrociencia 47: 567-578. 2013.

la mayor cantidad de BAL se encontró en los tratamientos sin ionóforos. Bajo estas condiciones *P. acidilactici* tuvo una actividad heterofermentativa produciendo cantidades similares de ácido láctico, acético, propiónico y butírico con respecto al FR, además fue sensible a los ionóforos usados.

Palabras clave: rumen, bacterias totales, bacterias ácido lácticas, ácidos grasos volátiles, ionóforos.

INTRODUCCIÓN

Las técnicas de identificación por secuenciación del gen 16S rARN permiten reclasificar o identificar nuevas especies de bacterias en el fluido ruminal (FR; Hazlewood y Teather, 1988; Dehority, 2003). El género *Pediococcus* tiene actividad homofermentativa con producción de ácido láctico (Hardie, 1986). Pero Cobos *et al.* (2011) aislaron del rumen de borregos con acidosis ruminal (pH 5.8) una cepa de *Pediococcus acidilactici* con actividad heterofermentativa, la cual produjo *in vitro* ácido láctico, acético, propiónico y butírico a partir de la fermentación de D-(+)-glucosa; además, fue sensible a monensina y lasalocida. 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; Dehority, 2003), que son transformados por la actividad homofermentativa de las BAL en ácido láctico principalmente (Yokoyama y Johnson, 1993; Dehority, 2003; Cobos, 2007). Por tanto, el objetivo de este estudio fue comparar *in vitro* los productos finales de la fermentación de carbohidratos no estructurales entre la cepa no comercial de *P. acidilactici*, con actividad heterofermentativa reportada, y el de un consorcio de bacterias del FR obtenido de borregos criollos, así como la susceptibilidad a monensina y lasalocida, para definir un perfil metabólico de la cepa aislada.

MATERIALES Y MÉTODOS

Este estudio se desarrolló en el Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad Autónoma de Chiapas, y en el Laboratorio de Microbiología Ruminal y Genética Microbiana del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Texcoco, México.

Key words: rumen, total bacteria, lactic acid bacteria, volatile fatty acids, ionophores.

INTRODUCTION

Identification techniques by 16S rRNA gene sequencing allow to identify or reclassify new species of bacteria in rumen fluid (RF; Hazlewood and Teather, 1988; Dehority, 2003). The genus *Pediococcus* has homofermentative activity toward the production of lactic acid (Hardie, 1986). However Cobos *et al.* (2011) isolated from the rumen of sheep with ruminal acidosis (pH 5.8) a strain of *Pediococcus acidilactici* with heterofermentative activity, which produced *in vitro* lactic, acetic, propionic and butyric acids, from the fermentation of D-(+)-glucose; in addition, this strain was sensitive to monensin and lasalocid. Population of ruminal lactic acid bacteria (LAB) increases when the diet consumed by ruminants contains a high proportion of rapid fermentation carbohydrates (Goad *et al.*, 1998; Dehority, 2003), which are transformed by the homofermentative activity of LAB in mainly lactic acid (Yokoyama and Johnson, 1993; Dehority, 2003; Cobos, 2007). Therefore, the objective of this study was to compare *in vitro* the end products of the fermentation of nonstructural carbohydrates between the noncommercial strain of *P. acidilactici*, with heterofermentative activity reported, and that of a bacteria group of RF obtained from criollo lambs, as well the susceptibility to monensin and lasalocid, in order to define a metabolic profile of the isolated strain.

MATERIALS AND METHODS

This study was conducted in the Laboratory of Biotechnology, Facultad de Ciencias Agrícolas, de la Universidad Autónoma de Chiapas, México, and in the Laboratory of Ruminal Microbiology and Microbial Genetics, Colegio de Postgraduados, Montecillo Campus, Texcoco, Mexico.

Strain and culture medium

A non-commercial lyophilized strain of *P. acidilactici* (PA) isolated and identified by sequencing the rRNA 16S gene (Cobos *et al.*, 2011) was used. The culture medium glucose-ruminal fluid (RF) (G-RF) to carryout the evaluation contained: 0.5 g

Cepa y medio de cultivo

Una cepa liofilizada no comercial de *P. acidilactici* (PA) aislada e identificada por secuenciación del gen ARNr 16S (Cobos *et al.*, 2011) fue usada. El medio de cultivo glucosa-fluido ruminal (FR) (G-FR) para hacer la evaluación contenía: 0.5 g de D-(+)-glucosa (J. T. Baker), 30 mL de FR clarificado, 5.0 mL de solución mineral I [6 g K₂HPO₄ (Meyer) en 1000 mL de H₂O], 5.0 mL de solución mineral II [6 g KH₂PO₄ (Meyer)+6 g (NH₄)₂SO₄ (Meyer)+12 g NaCl (Meyer)+2.45 g MgSO₄ (Meyer)+1.6 g CaCl₂·H₂O (Ferment) en 1000 mL de H₂O], 2.0 mL de solución al 8 % de Na₂CO₃ (Meyer), 2 mL de solución sulfido-cisteína [2.5 g L-cisteína (Sigma) en 15 mL de 2N NaOH (Meyer)+2.5 g Na₂S·9H₂O (Meyer) aforado en 100 mL de H₂O], 0.2 g de tripticasa peptona (MCD Lab) y 0.1 mL de solución al 0.1 % de resazurina (ALDRICH).

Tratamientos

Los tratamientos fueron: 1) PA=*P. acidilactici*, 2) FR=fluido ruminal, 3) PA+MO=PA+monensina sódica, 4) FR+MO=FR+monensina sódica, 5) PA+LA=PA+lasalocida sódica, 6) FR+LA=FR+lasalocida sódica. Las dosis de ionóforos fueron 30 y 40 mg kg⁻¹ de MS de monensina y de lasalocida. Para ello 250 mg de Rumensin® (20 % monensina) y 200 mg de Bovatec® (15 % lasalocida) fueron disueltos en 100 mL de una solución al 25 % de etanol; 20 µL de la solución con monensina y 26 µL de la solución con lasalocida se adicionaron al medio de cultivo de cada tratamiento.

Tubos de 18×150 mm (PIREX®, México) con 0.2 g de una dieta concentrada (Cuadro 1) se esterizaron 15 min en una autoclave (Felisa, FE-397, México) a 121 °C y 15 psi. Luego se adicionó, bajo flujo de CO₂, 9.5 mL de medio de cultivo G-FR estéril y se incubaron 24 h para detectar esterilidad. Los tubos estériles se inocularon por triplicado con 0.5 mL de la cepa re-hidratada de PA o FR; los medios se incubaron a 38 °C por 3, 6 y 12 h. Al terminar cada periodo se evaluó pH, concentración de ácido láctico, acético, propiónico, butírico, bacterias totales (BT) y BAL. La cepa de PA fue activada al adicionar 0.1 g del liofilizado en 9.9 mL de medio de cultivo G-FR estéril sin fuente de carbohidratos, y se incubó 12 h a 38 °C. Previa evaluación del liofilizado con la técnica del número más probable (NMP; Harrigan y McCance, 1979) y conteo directo en la Petroff-Hausser (Hausser #3900, Electron Microscopy Sciences, USA), se determinó que 12 h fue el tiempo necesario para reactivar la cepa, la cual alcanzó una concentración de 10⁸ bacterias mL⁻¹ de medio de cultivo, que fue la concentración bacteriana de cada inóculo (PA y FR).

of D-(+)-glucose (J. T. Baker), 30 mL of RF clarified, 5.0 mL of mineral solution I [6 g K₂HPO₄ (Meyer) in 1000 mL of H₂O], 5.0 mL of mineral solution II [6 g KH₂PO₄ (Meyer)+6 g (NH₄)₂SO₄ (Meyer)+12 g NaCl (Meyer)+2.45 g MgSO₄ (Meyer)+1.6 g CaCl₂·H₂O (Ferment) in 1000 mL of H₂O], 2.0 mL of 8 % solution of Na₂CO₃ (Meyer), 2 mL of sulfide-cysteine solution [2.5 g L-cysteine (Sigma) in 15 mL of 2N NaOH (Meyer)+2.5 g Na₂S·9H₂O (Meyer) gauged in 100 mL of H₂O], 0.2 g of trypticase peptone (MCD Lab) and 0.1 mL of 0.1 % solution of resazurine (ALDRICH).

Treatments

Treatments were: 1) PA=*P. acidilactici*, 2) RF=rumen fluid, 3) PA+MO=PA+sodium monensin, 4) RF+MO=RF+sodium monensin, 5) PA+LA=PA+sodium lasalocid, 6) RF+LA=RF+sodium lasalocid. Ionophores doses were 30 and 40 mg kg⁻¹ of MS of monensin and lasalocid. For this, 250 mg of Rumensin® (20 % monensin) and 200 mg of Bovatec® (15 % lasalocid) were dissolved in 100 mL of a 25 % ethanol solution; 20 µL of the monensin solution and 26 µL of the lasalocid solution were added to the culture medium of each treatment.

Tubes of 18×150 mm (Pyrex®, México) with 0.2 g of a concentrated diet (Table 1) were sterilized 15 min in an autoclave (Felisa, FE-397, Mexico) at 121 °C and 15 psi. Then, under flow of CO₂, 9.5 mL of G-RF sterile culture medium were added and incubated for 24 h to detect sterility. Sterile tubes were inoculated in triplicate, with 0.5 mL of rehydrated PA or RF strain; the media were incubated at 38 °C for 3, 6 and 12 h.

Cuadro 1. Dieta concentrada en energía.
Table 1. Diet concentrated in energy.

Contenido	Cantidad
Ingredientes, % MS	
Sorgo	45.0
Maíz	27.3
Pasta de soya	13.9
Ensilado de maíz	5.7
Rastrojo de maíz	6.1
Mezcla mineral [‡]	2.0

[†]NRC (1985). [‡]Macrominerales (%) Ca, 17; P, 12; Mg, 5; Na, 7; Cl, 10.5; K, 0.04 y S, 502 ppm; Vit. A, 350,000 UI; Vit. D, 150 000 UI; Vit. E, 150 UI; Microminerales (ppm): Mn, 4000; Fe, 2939; Zinc, 6000; Cu, 1,000; I, 500; Se, 40; Co, 60
[‡] NCR (1985). Macrominerals (%) Ca, 17; P, 12; Mg, 5; Na, 7; Cl, 10.5; K, 0.04 and S, 502 ppm; Vit. A, 350,000 UI; Vit. D, 150 000 UI; Vit. E, 150 UI; Microminerals (ppm): Mn, 4000; Fe, 2939; Zinc, 6000; Cu, 1,000; I, 500; Se, 40; Co, 60.

Las diluciones de PA y FR se realizaron con el mismo medio anaerobio, lo que permitió igualar la concentración para ambos inóculos. El FR se extrajo mediante sonda esofágica de dos borregos (35 kg PV) criollos 2 h después de comer (60 % *Cynodon plectotachyus* y 40 % dieta concentrada) (Cuadro 1).

La curva de crecimiento de PA se obtuvo con la concentración de bacterias por mililitro de medio de cultivo. Para ello en tubos de 18×150 mm se rehidrató la cepa PA, usando la técnica descrita antes; luego, tubos de 13×100 mm con 4.9 mL de medio de cultivo G-FR fueron inoculados con 0.1 mL de la cepa re-hidratada, se incubaron a 38 °C por 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0 y 4.5 h, y al terminar la incubación se tomó por triplicado una muestra (0.5 mL) de cada tubo para determinar la concentración de bacterias usando una cámara Petroff-Hausser con un área de 0.0025 mm², una profundidad de 0.02 mm y un microscopio de contraste de fases (Biológico BX51, Olympus, EE.UU.). La concentración bacteriana se calculó con la fórmula: concentración de bacterias=(promedio) (factor de dilución) (2×10⁷). La tasa de generación se determinó usando la fórmula $N=N_0 2^n$ (1), donde N =número final de células, N_0 =número inicial de células y n =número de generaciones transcurridas durante el periodo de crecimiento exponencial. Por tanto, el tiempo de generación (g) de la población bacteriana se calculó como t/n , donde t =tiempo y se determina con los datos de la fase de crecimiento exponencial, y n se calcula mediante una transformación logarítmica de la ecuación 1:

$$n=3.3 [\log N - \log N_0] \text{ (Madigan et al., 2003).}$$

Concentración de ácidos grasos volátiles (AGV)

Del medio de cultivo a las 3, 6 y 12 h de incubación, se retiraron y centrifugaron 2.5 mL a 17 664.4 g por 10 min; 2.0 mL del sobrenadante se mezclaron 4:1 con ácido metafosfórico al 25 %, los viales fueron agitados en un Vortex (Genie 2 G-560, Scientific Industries, USA) y se centrifugaron 2 min a 34 622.2 g. La concentración de AGV se determinó en un cromatógrafo de gases (Clausius 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, el gas acarreador fue N₂ a 60 psi e H₂ y O₂ para generar una flama con un flujo de 45 y 450 mL min⁻¹. Las temperaturas del inyector, columna y horno fueron 250, 200 y 140 °C y se inyectó 1 µL de muestra. Así se obtuvieron tres picos en un tiempo de retención de 2.07, 2.55 y 3.75 min para acético, propiónico y butírico, con un tiempo total de cada corrida de 8.37 min (Cobos et al., 2007).

After each period pH, concentration of lactic, acetic, propionic, butyric acids, total bacteria (TB) and LAB were assessed. PA strain was activated by adding 0.1 g of the lyophilized in 9.9 mL of G-RF sterile culture medium without carbohydrate source, and incubated at 38 °C for 12 h. Previous evaluation of the lyophilized with the most probable number technique (NMP; Harrigan and McCance, 1979) and direct counting in Petroff-Hausser (Hausser #3900, Electron Microscopy Sciences, USA), it was determined that 12 h was the time necessary to reactivate the strain, which reached a concentration of 10⁸ bacteria mL⁻¹ of culture medium, that was the bacterial concentration of each inoculum (PA and RF). Dilutions of PA and RF were performed in the same anaerobic medium, allowing to equalize the concentration for both inocula. RF was extracted by an esophageal probe from two criollo lambs (35 kg LW) 2 h after eating (60 % *Cynodon plectotachyus* and 40 % concentrated diet) (Table 1).

The growth curve of PA was obtained with the bacteria concentration per milliliter of culture medium. For this, in tubes of 18×150 mm PA strain was rehydrated using the technique described above; then, tubes of 13×100 mm with 4.9 mL of G-RF culture medium were inoculated with 0.1 mL of the rehydrated strain, incubated at 38 °C for 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0 and 4.5 h, and at the end of the incubation a sample (0.5 mL) by triplicate was taken from each culture to determine the concentration of bacteria using a Petroff-Hausser chamber with an area of 0.0025 mm², a depth of 0.02 mm and a phase contrast microscope (Biological BX51, Olympus, USA). Bacterial concentration was calculated with the formula: concentration of bacteria=(average) (dilution factor) (2×10⁷). Generation rate was determined using the formula $N=N_0 2^n$ (1), where N =final cell number, N_0 =starting cell number and n =generation number elapsed during the period of exponential growth. Therefore, the generation time (g) of the bacterial population was calculated as t/n , where t =time and it is determined with data of the exponential growth phase, and n is calculated using a logarithmic transformation of the equation 1:

$$n=3.3 [\log N - \log N_0] \text{ (Madigan et al., 2003).}$$

Concentration of volatile fatty acids (VFA)

From the culture medium at 3, 6 and 12 h of incubation, 2.5 mL were removed and centrifuged at 17 664.4 g for 10 min; 2.0 mL of the supernatant were mixed 4:1 with metaphosphoric acid at 25 %, the vials were shaken on a Vortex (Genie 2 G-560, Scientific Industries, USA) and centrifuged 2 min at 34 622.2 g. Concentration of VFA was determined in a gas

Concentración de ácido láctico

Al terminar cada periodo de incubación (3, 6 y 12 h) y después de centrifugar, se mezcló 1 mL del sobrenadante con 1 mL de H_2SO_4 (Alquimia, 98 % pureza); 1 mL de esta mezcla se diluyó en 20 mL de agua bidestilada desionizada, se tomó 0.5 mL y mezcló con 3 mL de H_2SO_4 e incubó 10 min en agua a 100 °C. Cuando la temperatura de la muestra se redujo a 25 °C se adicionaron 50 μL de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Meyer) y 100 μL de p-fenilfenol (ACN, Aplicaciones Científicas del Norte) y se mezclaron en un vortex. Las muestras reposaron 30 min y se midió la absorbancia a 570 nM en un espectrofotómetro UV-Vis (Lambda-40, Perkin-Elmer™, USA), calibrado con un método ($r^2=0.99$) de concentración de láctico (Kinberley y Taylor, 1996).

Variables microbiológicas

Al finalizar cada periodo de incubación (3, 6 y 12 h), 0.5 mL de medio de cultivo fue retirado de cada tratamiento e inoculado en un caldo a base de glucosa-celobiosa-almidón más FR (GCA-FR) para determinar la cantidad de BT, la cual se evaluó bajo flujo de CO_2 y esterilidad en tubos de cultivo mediante la técnica NMP. Los medios inoculados fueron incubados 24 h a 38 °C, tomando como positivos los medios que mostraron turbidez. La concentración de BAL se determinó en medio MRS (Bioxon), de acuerdo con De Man *et al.* (1960). El pH se ajustó a 6.4 ± 0.02 con HCl 0.1 N (VWR) y se midió con un potenciómetro (Orion A250, Orion Research, Inc. USA). El medio MRS fue esterilizado 15 min a 121 °C y 15 psi, y se depositaron 4.5 mL de medio en tubos de cultivo (13×100 mm, PIREX®, México). Los medios estériles se inocularon con 0.5 mL de medio de cultivo de los tratamientos, al finalizar cada tiempo de incubación. Después de agregar el inóculo los tubos se mantuvieron 24 h a 38 °C; los medios positivos fueron los que mostraron turbidez y la cantidad de BAL se determinó con la técnica de NMP.

Diseño y análisis estadístico

El diseño experimental fue completamente al azar. Los datos de concentración de ácido láctico y de AGV y pH de los medios de cultivo se analizaron con el procedimiento GLM de SAS. Para los datos de concentración de BT y BAL se usó la prueba de Kruskal-Wallis y el procedimiento GLM con datos de rangos independientes (Wilcoxon) de SAS (2001). Las medias se compararon con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

chromatograph (Claurus 500, Perkin-Elmer™, USA) with autosampler and equipped with a capillary column (ELITE-FFAP, Perkin-Elmer™, USA) of 15 m, a detector of flame ionization, the carrier gas was N_2 at 60 psi and H_2 and O_2 to produce a flame with a flow of 45 to 450 mL min^{-1} . The temperatures of the injector, column and oven were 250, 200 and 140 °C and 1 μL of sample was injected. Thus three peaks were obtained at a retention time of 2.07, 2.55 and 3.75 min for acetic, propionic and butyric acids, with a total time of each run of 8.37 min (Cobos *et al.*, 2007).

Lactic acid concentration

At the end of each incubation period (3, 6 and 12 h) and after centrifugation, 1 mL of the supernatant was mixed with 1 mL of H_2SO_4 (Alquimia, 98 % purity); 1 mL of this mixture was diluted in 20 mL of deionized double-distilled water, 0.5 mL was taken and mixed with 3 mL of H_2SO_4 and incubated 10 min in water at 100 °C. When temperature of the sample was reduced to 25 °C, 50 μL of $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Meyer) and 100 μL of p-phenylphenol (ACN, Northern Scientific Applications) were added and mixed in a vortex. The samples rested 30 min and the absorbance was measured at 570 nM in a UV-Vis spectrophotometer (Lambda-40, Perkin-Elmer™, USA), calibrated with a method ($r^2=0.99$) of lactic concentration (Kinberley and Taylor, 1996).

Microbiological variables

At the end of each incubation period (3, 6 and 12 h), 0.5 mL of culture medium was removed from each treatment and inoculated into a broth with glucose-cellobiose-starch plus RF (GCS-RF) to determine the amount of TB, which was evaluated under CO_2 flow and sterility in culture tubes by the NMP technique. The inoculated media were incubated 24 h at 38 °C, taking as positive those media showing turbidity. LAB concentration was determined in MRS medium (Bioxon), according to De Man *et al.* (1960). The pH was adjusted to 6.4 ± 0.02 with HCl 0.1 N (VWR) and measured with a potentiometer (Orion A250, Orion Research, Inc. USA). MRS medium was sterilized 15 min at 121 °C and 15 psi and 4.5 mL of medium deposited in culture tubes (13×100 mm, PYREX®, Mexico). Sterile media were inoculated with 0.5 mL of culture medium of treatments, after each incubation time. After adding the inoculum, the tubes were maintained 24 h at 38 °C; the positive media were those showing turbidity and the amount of LAB was determined using the technique of NMP.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La cepa de PA y el consorcio de bacterias del FR fermentaron ácido láctico, acético, propiónico y butírico a partir de carbohidratos de rápida degradación (actividad heterofermentativa); sin embargo, según Garvie (1986), Hardie (1986) y Ennahar *et al.* (2003), *Pediococcus* es homofermentativa. Los resultados de esta investigación concuerdan con los publicados por Cobos *et al.* (2011), quienes reportan actividad heterofermentativa de esta cepa no comercial de *P. acidilactici*, la cual fue aislada del rumen de borregos, en las mismas condiciones de cultivo (temperatura y pH) reportadas por Fitzsimons *et al.* (1992). La cepa evaluada en este estudio tuvo un crecimiento exponencial de 1.5 a 2.0 h⁻¹, similar al observado en un medio a base de D-(+)-glucosa por Hardie (1986) y Kunene *et al.* (2000). Además, la tasa de generación fue 19 min, valor dentro del intervalo reportado por Garvie (1986) de 15 a 30 min para bacterias del género *Pediococcus*.

Concentración de ácido láctico

La concentración de ácido láctico (Cuadro 2) fue mayor ($p \leq 0.05$) durante las 12 h de incubación en los tratamientos inoculados con PA y FR sin ionóforos, mientras que en los tratamientos con ionóforos la cantidad de láctico fue menor ($p \leq 0.05$) en los medios inoculados con PA, debido a un posible

Design and statistical analysis

The experimental design was completely randomized. The data of lactic acid and of VFA concentration, and pH of the culture media were analyzed using the GLM procedure of SAS. The Kruskal-Wallis test and the GLM procedure with independent data ranges (Wilcoxon) of SAS (2001) were used for BT and BAL concentration data. Means were compared with Tukey's test ($p \leq 0.05$).

RESULTS AND DISCUSSION

PA strain and the group of bacteria from RF fermented lactic, acetic, propionic and butyric acids from rapid degradation carbohydrates (heterofermentative activity); however, *Pediococcus* is homofermentative according to Garvie (1986), Hardie (1986) and Ennahar *et al.* (2003). The results of this research are consistent with those published by Cobos *et al.* (2011), who report heterofermentative activity of this non-commercial *P. acidilactici* strain, which was isolated from the rumen of lambs, under the same culture conditions (temperature and pH) reported by Fitzsimons *et al.* (1992). The strain evaluated in this study grew exponentially from 1.5 to 2.0 h⁻¹, which was similar to that observed in a medium based on D-(+)-glucose, by Hardie (1986) and Kunene *et al.* (2000). In addition, the generation rate was 19 min, value within the range reported by Garvie

Cuadro 2. Concentración (mM L⁻¹) de ácido láctico y cambios de pH en los medios de cultivo.

Table 2. Concentration (mM L⁻¹) of lactic acid and pH changes in the culture media.

Tiempo, h	PA	FR	PA+MO	FR+MO	PA+LA	FR+LA	EEM
Ácido láctico, mM L ⁻¹							
3	17.27a	17.2a	3.23c	7.3b	3.13c	8.07b	0.80
6	17.63a	18.1a	5.63c	8.43b	6.5bc	6.87bc	0.96
12	16.5a	16.3a	5.6cd	7.27cb	4.77d	8.5b	0.64
pH							
3	6.69b	7.07a	6.65b	7.03a	7.04a	6.57b	0.006
6	5.79b	6.35a	6.0ab	6.14ab	6.10ab	6.36a	0.03
12	5.35a	5.68a	5.46a	5.39a	5.57a	5.32a	0.03

a, b, c, d Medias con distinta letra en una hilera son diferentes ($p \leq 0.05$); EEM: error estándar de la media. PA=*P. acidilactici*; FR=fluido ruminal; PA+MO=PA+monensina sódica; FR+MO=FR+monensina sódica; PA+LA=PA+lasalocida sódica; FR+LA=FR+lasalocida sódica. ♦ a, b, c, d Means with different letters in a row are different ($p \leq 0.05$); EEM: standard error of the mean. PA=*P. acidilactici*; FR=rumen fluid; PA+MO=PA+MO sodium monensin; RF+MO=RF+sodium monensin; PA+LA=PA+sodium lasalocid; RF+LA=RF+sodium lasalocid.

efecto bacteriostático de estos compuestos. Además, en el consorcio de bacterias del FR, los ionóforos sólo afectaron a las BAL ya que hubo menos ácido láctico en los medios, sin afectar la cantidad de BT en las primeras 3 h (Cuadro 4). En medios inoculados con *P. acidilactici* la concentración de ácido láctico fue similar (17.07 mM L^{-1}), pero se redujo hasta 80 % cuando se adicionaron ionóforos (Cobos *et al.*, 2011).

Los resultados de este estudio indican que los ionóforos afectaron ($p \leq 0.05$) la producción de ácido láctico, lo cual es similar a lo reportado por Burrin y Britton (1986) y Coe *et al.* (1999) quienes encontraron que la adición de monensina (150 y $300 \text{ mg animal}^{-1} \text{ d}^{-1}$) redujo la cantidad de lactato (1.25 mM L^{-1}) en el rumen. Según Nagaraja *et al.* (1981), monensina y lasalocida ($1.3 \text{ mg kg}^{-1} \text{ PV}$) previnieron una acidosis láctica (testigo, 519.5 mg dL^{-1} ; monensina, 217.8 mg dL^{-1} ; lasalocida, 15.5 mg dL^{-1}); sin embargo, aunque hubo mayor efecto bactericida con este ionóforo, la concentración molar de AGV aumentó y la relación acético/propiónico se redujo. Pero Knowlton *et al.* (1996a y 1996b) reportaron que $360 \text{ mg lasalocida animal}^{-1} \text{ d}^{-1}$ no evitó el aumento de ácido láctico y la caída de pH. Esta variabilidad de resultados se puede atribuir a diversos factores; en sistemas de cultivo *in vivo* e *in vitro*, el efecto de monensina y lasalocida sobre los microorganismos del rumen y sus variables es afectado por la resistencia bacteriana (Dennis y Nagaraja, 1981; Russell y Strobel, 1989), presencia de nuevas BAL sensibles en el rumen (Cobos *et al.*, 2011), dieta y tiempo de adaptación (Green *et al.*, 1999; Mutsvangwa *et al.*, 2002) y tiempo de muestreo después de comer (Goad *et al.*, 1998).

No hubo diferencia ($p > 0.05$) en el pH de los medios (5.1 ± 0.46) a las 12 h de incubación entre los tratamientos, similar a lo reportado por Fitzsimons *et al.* (1992). Pero a las 3 y 6 h el pH fue diferente ($p \leq 0.05$) entre tratamientos PA, PA+MO y FR+LA, y tratamientos PA, PA+MO, FR+MO y PA+LA. Esto implica que la acumulación de ácido láctico (Cuadro 4) no redujo el pH en los medios con o sin ionóforos; así, posiblemente la acumulación de AGV u otro ácido orgánico no determinado en este estudio causó la disminución en el pH de los medios. Según Mutsvangwa *et al.* (2002) y Beauchemin *et al.* (2003), la incidencia de

(1986) from 15 to 30 min for bacteria of the genus *Pediococcus*.

Lactic acid concentration

The lactic acid concentration (Table 2) was higher ($p \leq 0.05$) during the 12 h of incubation in the treatments inoculated with PA and RF without ionophores, while in the ionophore treatments there was a lower amount ($p \leq 0.05$) of lactic acid in the media inoculated with PA; this was due to a possible bacteriostatic effect of these compounds. In addition, on the bacteria group of RF, the ionophores only affected LAB as there was less lactic acid in the media, without affecting the amount of TB in the first 3 h (Table 4). In media inoculated with *P. acidilactici* lactic acid concentration was similar (17.07 mM L^{-1}), but was reduced up to 80 % when ionophores were added (Cobos *et al.*, 2011).

The results of this study indicate that ionophores affect ($p \leq 0.05$) production of lactic acid, which is similar to that reported by Burrin and Britton (1986) and Coe *et al.* (1999) who found that addition of monensin (150 and $300 \text{ mg animal}^{-1} \text{ d}^{-1}$) reduced the amount of lactate (1.25 mM L^{-1}) in the rumen. According to Nagaraja *et al.* (1981), monensin and lasalocid ($1.3 \text{ mg kg}^{-1} \text{ PV}$) prevented lactic acidosis (control, 519.5 mg dL^{-1} ; monensin, 217.8 mg dL^{-1} ; lasalocid, 15.5 mg dL^{-1}); however, although there was greater bactericidal effect with this ionophore, VFA molar concentration increased and the acetic/propionic ratio was reduced. But Knowlton *et al.* (1996a and 1996b) reported that $360 \text{ mg lasalocid animal}^{-1} \text{ d}^{-1}$ did not prevent the increase of lactic acid and pH drop. This variability of results can be attributed to various factors; in cultivation systems *in vivo* and *in vitro*, the effect of monensin and lasalocid on rumen microorganisms and their variables is affected by bacterial resistance (Nagaraja and Dennis, 1981; Russell and Strobel, 1989), presence of new sensitive LAB in the rumen (Cobos *et al.*, 2011), diet and adaptation time (Green *et al.*, 1999; Mutsvangwa *et al.*, 2002) and postprandial sampling time (Goad *et al.*, 1998).

There was no difference ($p > 0.05$) in the media pH (5.1 ± 0.46) after 12 h of incubation between treatment, similar to that reported by Fitzsimons *et al.* (1992). But at 3 and 6 h pH was different ($p \leq 0.05$) between treatments PA, PA+MO and RF+LA, and

acidosis y reducción del pH no es causada por la acumulación de ácido láctico, sino por la concentración AGV totales en el medio. Martin (1998) señala que la mayor concentración de D y L láctico y el menor pH (4.27) ocurrió a las 36 h de incubación en los tratamientos sin ionóforos, pero no para los tratamientos con monensina y lasalocida, lo cual no coincide con esta investigación donde a las 12 h de incubación todos los tratamiento tenían pH similar.

Concentración de ácidos grasos volátiles

La cantidad de acético, propiónico, butírico y AGV totales a las 12 h de incubación no fue diferente ($p > 0.05$), resultado similar al reportado por Cobos *et al.* (2011) para AGV totales al adicionar *P. acidilactici* a un medio de cultivo con o sin monensina y lasalocida por 72 h. La adición de ionóforos al medio disminuyó la producción de láctico debido a la acción bacteriostática de éstos sobre las BAL en el FR y sobre *P. acidilactici*. La reducción de la producción de láctico con la adición de ionóforos debería aumentar la concentración de acético, propiónico, butírico y AGV totales en el medio (Martin, 1998; Dehority, 2003). Aunque estos cambios no ocurrieron en este estudio la actividad homofermentativa de *P. acidilactici* observada en este estudio y en los resultados reportados por Cobos *et al.* (2011) indicarían que esta cepa PA tuvo actividad heterofermentativa. Sin embargo, sólo se evaluó la producción de ácido láctico, acético, propiónico y butírico, por lo cual se debe evaluar el perfil metabólico completo de la cepa aislada para determinar la variedad de ácidos orgánicos que podría estar produciendo.

No hubo diferencia ($p > 0.05$) entre la cantidad total de AGV producidos por *P. acidilactici* y por el consorcio de bacterias del FR. Al respecto, Cobos *et al.* (2011) señalan que la adición de monensina y lasalocida al medio de cultivo inoculado con *P. acidilactici* redujo la proporción acético: propiónico a las 72 h de incubación. Pero según Coe *et al.* (1999), la cantidad de AGV totales fue 104.7 contra 108.9 mM L⁻¹ entre un testigo y un tratamiento con monensina. En el presente estudio la relación acético: propiónico fue alta (> 4.3), lo cual contradice la reducción señalada por Coe *et al.* (1999) (Cuadro 3).

treatments, PA+MO, RF+MO and PA+LA. This implies that accumulation of lactic acid (Table 4) did not reduce the pH in the media with or without ionophores; thus, possibly the accumulation of VFA or other organic acid not determined in this study caused the decrease in the media pH. According to Mutsvangwa *et al.* (2002) and Beauchemin *et al.* (2003), the incidence of acidosis and reduction of pH is not caused by the accumulation of lactic acid, but by the total VFA concentration in the medium. Martin (1998) notes that the highest concentration of D and L lactic acid and lower pH (4.27) occurred at 36 h of incubation in the treatments without ionophores, but not for treatments with monensin and lasalocid, which does not coincide with this research, where at 12 h of incubation all treatment showed a similar pH.

Concentration of volatile fatty acids

The amount of acetic, propionic, butyric acids and total VFA at 12 h of incubation was not different ($p > 0.05$), a result similar to that reported by Cobos *et al.* (2011) for total VFA by adding *P. acidilactici* to a culture medium with or without monensin and lasalocid for 72 h. Adding ionophores to the medium decreased the production of lactic acid due to the bacteriostatic action of these on LAB in the RF and *P. acidilactici*. The reduced production of lactic acid with the addition of ionophores should increase concentration of acetic, propionic, and butyric acids and total VFA in the medium (Martin, 1998; Dehority, 2003). Although these changes did not occur in this study, the homofermentative activity of *P. acidilactici* found in this research and in the results reported by Cobos *et al.* (2011) would indicate that this PA strain had heterofermentative activity. However, only production of lactic, acetic, propionic and butyric acids were evaluated, which implies the need to perform a complete metabolic profile of the isolated strain in order to determine the variety of organic acids which may be producing.

There was no difference ($p > 0.05$) between the total amount of VFA produced by *P. acidilactici* and by the bacteria group of RF. In this regard, Cobos *et al.* (2011) report that the addition of monensin and lasalocid to the culture medium inoculated with *P. acidilactici* reduced the acetic: propionic rate after 72 h of incubation. But according to Coe *et al.*

Cuadro 3. Concentración de ácidos grasos volátiles (AGV).
Table 3. Concentration of volatile fatty acids (VFA).

Tiempo, h	PA	FR	PA+MO	FR+MO	PA+LA	FR+LA	EEM
Ácido acético, mM L ⁻¹							
3	30.12a	28.73a	34.12a	27.38a	29.63a	25.03a	41.46
6	27.1ab	27.73ab	37.67a	33.3ab	23.63b	26.8ab	19.84
12	25.9a	23.0a	27.63a	24.53a	33.4a	23.0a	19.71
Ácido propiónico, mM L ⁻¹							
3	7.87a	7.53a	9.1a	7.2a	7.56a	6.46a	3.51
6	7.4ab	7.43a	9.46a	9.2a	6.33b	6.83b	0.77
12	6.63a	5.76a	7.1a	6.36a	7.7a	6.2a	0.79
Ácido butírico, mM L ⁻¹							
3	6.2a	5.6a	7.13a	5.5a	6.07a	4.9a	2.3
6	5.76a	5.36a	6.96a	6.8a	4.76a	4.8a	0.74
12	4.9a	4.36a	5.46a	4.63a	5.53a	4.58a	0.46
AGV totales, mM L ⁻¹							
3	42.92a	40a	50.12a	43.10a	41.27a	37.77a	76.74
6	40.26ab	40.53ab	54.1a	49.33ab	34.73b	38.43b	32.65
12	37.46a	33.1a	40.2a	35.5a	46.63a	34.4a	32.46

a, b Medias con distinta letra en una hilera son diferentes ($p \leq 0.05$); EEM: error estándar de la media. PA=*P. acidilactici*; FR=fluido ruminal; PA+MO=PA+monensina sódica; FR+MO=FR+monensina sódica; PA+LA=PA+lasalocida sódica; FR+LA=FR+lasalocida sódica. a, b, Means with different letters in a row are different ($p \leq 0.05$); EEM: standard error of the mean. PA=*P. acidilactici*; RF=rumen fluid; PA+MO=PA+sodium monensin; RF+MO=RF+sodium monensin; PA+LA=PA+sodium lasalocid; RF+LA=RF+sodium lasalocid.

Variables microbiológicas

A las 3 h de incubación no hubo diferencia ($p > 0.05$) en la concentración de BT entre los tratamientos inoculados con FR, y en los tratamientos inoculados con *P. acidilactici* la menor concentración se encontró en los medios con ionóforos. Después de 6 h de incubación hubo mayor concentración ($p \leq 0.05$) de BT en los medios inoculados con FR, incluso en los tratamientos sin ionóforos, pero no en los tratamientos con lasalocida. Los ionóforos redujeron la concentración de *P. acidilactici*, mientras que en el consorcio de bacterias del rumen el efecto fue menor. Este resultado coincide con el de Tung y Kung (1993), quienes indican que la monensina no afectó al consorcio bacteriano ruminal porque se mantuvieron los niveles de AGV, pero Callaway y Martin (1996) señalan que la monensina afectó la mezcla de bacterias ruminales inoculadas, ya que se redujo la producción de AGV y ácidos orgánicos.

Según Goad *et al.* (1998), hay cambios en la concentración inicial ($>10^9$ bacterias mL⁻¹) de BT después de 24 h de incubación, mientras que

(1999), the amount of total VFA was 104.7 to 108.9 mM L⁻¹ between a control and a treatment with monensin. In the present study the ratio acetic:propionic was high (>4.3), which contradicts the decrease in this ratio reported by Coe *et al.* (1999) (Table 3).

Microbiological variables

At 3 h of incubation there was no difference ($p > 0.05$) in the TB concentration between treatments inoculated with RF, and in treatments inoculated with *P. acidilactici* the lowest concentration was found in the media with ionophores. After 6 h of incubation there was higher concentration ($p \leq 0.05$) of TB in the media inoculated with RF, even without ionophore treatments, but not in treatments with lasalocid. Ionophores reduced the concentration of *P. acidilactici*, while on the bacteria group of the rumen the effect was smaller. This result coincides with that of Tung and Kung (1993) who reported that monensin did not affect the ruminal bacterial group due to the fact that levels of VFA were maintained, but Callaway

en el presente estudio las concentraciones de BT fueron superiores a 10^9 (Cuadro 4), excepto para los medios con *P. acidilactici* donde la concentración fue menor ($p \leq 0.05$) a las 12 h de incubación en los tratamientos con ionóforos y se observó el efecto bacteriostático sobre la cepa de PA. Además, cuando el inóculo fue FR, la concentración de BT fue superior a 10^9 , posiblemente por una sucesión bacteriana y un cambio de bacterias sensibles a los ionóforos por bacterias resistentes (Dennis y Nagaraja, 1981; Russell y Strobel, 1989).

Respecto a la concentración de BAL hubo concentraciones de 10^9 mL⁻¹ de medio a las 72 h en tratamientos sin la adición de ionóforos (Cobos *et al.*, 2011), pero en el presente estudio la concentración fue mayor a 10^{11} BAL mL⁻¹ de medio a las 12 h de incubación. La concentración mayor de BAL ocurrió en los medios inoculados con FR, lo cual coincide con lo señalado por Therion *et al.* (1982) de que hay una sucesión de bacterias ácidos sensibles hacia bacterias ácido tolerantes.

CONCLUSIONES

Pediococcus acidilactici es una bacteria amilolítica con una actividad heterofermentativa que produjo cantidades similares de ácido láctico, acético, propiónico y butírico, respecto a un consorcio de bacteria procedentes de fluido ruminal. Además bajo estas condiciones de cultivo ambos inóculos acidifican

and Martin (1996) point out that monensin affected rumen inoculated bacteria mixture, since VFA and organic acid production was reduced.

According to Goad *et al.* (1998), there are changes in the initial concentration ($>10^9$ bacteria mL⁻¹) of TB after 24 h of incubation, while in the present study TB concentrations were higher than 10^9 (Table 4), except for the media with *P. acidilactici* where concentration was lower ($p \leq 0.05$) at 12 h of incubation in treatments with ionophores, which shows the bacteriostatic effect on the PA strain. In addition, when the inoculum was RF, TB concentration was higher than 10^9 , possibly by a bacterial succession and a change of bacteria sensitive to ionophores by bacteria resistant (Dennis and Nagaraja, 1981; Strobel and Russell, 1989).

Respect to the LAB concentration there were concentrations of 10^9 mL⁻¹ of medium at 72 h in treatments without the addition of ionophores (Cobos *et al.*, 2011), but in this study the concentration was higher than 10^{11} LAB mL⁻¹ of medium at 12 h of incubation. The highest concentration of LAB occurred in media inoculated with RF, which coincides with that reported by Therion *et al.* (1982) that there is a succession of acid-sensitive bacteria to acid-tolerant bacteria.

CONCLUSIONS

Pediococcus acidilactici is an amylolytic bacterium with a hetero-fermentative activity which produced

Cuadro 4. Concentración de bacterias totales y productoras de ácido láctico en los medios de cultivo.

Table 4. Concentration of total bacteria and producers of lactic acid in culture media.

Tiempo, h	PA	FR	PA+MO	FR+MO	PA+LA	FR+LA	EEM
Bacterias totales, $\times 10^8$							
3	87.8ab	1710a	0.17ab	1110a	0.075b	253ab	11.98
6	1440c	8550a	0.092e	2540b	0.067f	63.9d	0.71
12	1520bc	8580a	0.091ed	2500ab	0.049e	66.6cd	1.51
Bacterias ácido láctica, $\times 10^8$							
3	87.6a	7.76ab	0.014c	0.0016d	0.396bc	0.0004d	1.76
6	637ab	651a	0.09bcd	0.059d	0.07cd	0.81abc	6.28
12	1750a	2920a	0.062b	0.02b	0.017b	0.06b	8.17

a, b, c, d, e y f Medias con distinta letra en una hilera son diferentes ($p \leq 0.05$); EEM: Error estándar de la media. PA=*P. acidilactici*; FR=fluido ruminal; PA+MO=PA+monensina sódica; FR+MO=FR+monensina sódica; PA+LA=PA+lasalocida sódica; FR+LA=FR+lasalocida sódica. * a, b, c, d, e and f Means with different letters in a row are different ($p \leq 0.05$); EEM: standard error of the mean. PA=*P. acidilactici*; FR=rumen fluid; PA+MO=PA+sodium monensin; RF+MO=RF+sodium monensin; PA+LA=PA+sodium lasalocid; RF+LA=RF+sodium lasalocid.

un medio de cultivo que contiene carbohidratos de fermentación rápida, y aunque hubo sensibilidad bacteriostática a los ionóforos (monensina y lasalocida) que redujeron su proliferación, se produjeron metabólicos secundarios que bajaron el pH en todos los medio de cultivo con y sin ionóforos. Por tanto, la cepa de PA aislada del rumen de borregos debe ser evaluada considerando un perfil metabólico completo para determinar todos los productos de la fermentación de carbohidratos no estructurales.

AGRADECIMIENTOS

Este experimento fue patrocinado por la Secretaría de Educación Pública mediante el Programa de Mejoramiento del Profesorado (PROMEP) con el proyecto PROMEP/103.5/10/4666 con registro 06/AGV/PMP/070/11 intitulado "Plantas nativas con potencial uso forrajero que mitigan la producción de metano en el rumen".

LITERATURA CITADA

- Beauchemin, K. A., W. Z. Yang, D. P. Morgavi, G. R. Ghorbani, W. Kautz, and J. A. Z. Leedle. 2003. Effect of bacterial direct-fed microbials and yeast on site and extent of digestion, blood chemistry, and subclinical ruminal acidosis in feedlot cattle. *J. Anim. Sci.* 81: 1628-1640.
- Burrin, D. G., and R. A. Britton. 1986. Response to monensin in cattle during subacute acidosis. *J. Anim. Sci.* 63: 888-893.
- Callaway, T. R., and S. A. Martin. 1996. Effects of organic acid and monensin treatment on *in vitro* mixed ruminal microorganism fermentation of cracked corn. *J. Anim. Sci.* 1996. 74: 1982-1989.
- 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., A. Ley de Coss, N. D. Ramirez, S. S. Gonzalez, and R. Ferrera-Cerrato. 2011. *Pediococcus acidilactici* isolated from the rumen of lambs with rumen acidosis, 16S rRNA identification and sensibility to monensin and lasalocid. *Res. Vet. Sci.* 90: 26-30.
- Cobos, M. A., M. Pérez-Sato, J. Piloni-Martini, S. S. González, and R. G. Bárcena. 2007. Evaluation of diets containing shrimp shell waste and an inoculum of *Streptococcus milleri* on rumen bacteria and performance of lambs. *Anim. Feed Sci. Technol.* 132: 324-330.
- Coe, M. L., T. G. Nagaraja, Y. D. Sun, N. Wallace, E. G. Towne, K. E. Kemp, and J. P. Hutcheson. 1999. Effects of virginiamycin on ruminal fermentation in cattle during adaptation to a high concentrate diet ad during an induced acidosis. *J. Anim. Sci.* 77: 2259-2268.
- De Man, J. C., M. Rogosa, and M. E. Sharpe. 1960. A medium for the cultivation of lactobacilli. *J. Appl. Bacteriol.* 23: 130-135.
- similar amounts of lactic, acetic, propionic and butyric acids, with respect to a group of bacteria derived from ruminal fluid. Besides, under these conditions of culture both inocula acidify a culture medium containing carbohydrates of rapid fermentation, and although there was bacteriostatic sensitivity to ionophores (monensin and lasalocid) reducing their proliferation, secondary metabolites were produced and reduced pH in all cultures media with and without ionophores. Therefore, PA strain isolated from the rumen of lambs should be evaluated considering a complete metabolic profile to determine all products from the fermentation of nonstructural carbohydrates.

—End of the English version—



- Microbial Ecosystem. Elsevier Applied Science. UK. pp: 323-334.
- Kinberley, A. C., and C. Taylor. 1996. A simple colorimetric assay for muramic acid and lactic acid. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 56: 49-54.
- Knowlton, K. F., M. S. Allen, and P. S. Erickson. 1996a. Lasalocid and particle size of corn grain for dairy cows in early lactation. 1. Effect on performance, serum metabolites, and nutrient digestibility. *J. Dairy Sci.* 79: 557-564.
- Knowlton, K. F., M. S. Allen, and P. S. Erickson. 1996b. Lasalocid and particle size of corn grain for dairy cows in early lactation. 2. Effect on ruminal measurements and feeding behavior. *J. Dairy Sci.* 79: 565-574.
- Kunene, N. F., I. Geornaras, A. von Holy, and J. W. Hasting. 2000. Characterization and determination of origin of lactic acid bacteria from a sorghum-based fermented weaning food by analysis of soluble proteins and amplified fragment length polymorphism fingerprinting. *Appl. Environ Microbiol.* 66: 1084-1092.
- Madigan, M. T., J. M. Martinko, y J. Parker. 2003. Nutrición y metabolismo. *In: Brock, Biología de los Microorganismos.* 10a Edición. Ed. Pearson, Prentice Hall, España. pp: 109-148.
- Martin, S. A. 1998. Manipulation of ruminal fermentation with organic acids: A review. *J. Anim. Sci.* 76: 3123-3132.
- Mutsvangwa, T., J. P. Walton, J. C. Plaizier, T. F. Duffield, R. Bagg, P. Dick, G. Vessie, and B. W. McBride. 2002. Effects of a monensin controlled-release capsule or premix on attenuation of subacute ruminal acidosis in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 85: 3454-3461.
- Nagaraja, T. G., T. B. Avery, E. E. Bartley, S. J. Galitzer, and A. D. Dayton. 1981. Prevention of lactic acidosis in cattle by lasalocid or monensin. *J. Anim. Sci.* 53: 206-216.
- NRC. 1985. Nutrient Requirements of Sheep (6th Ed). National Academy Press, Washington, DC. 109 p.
- Russell, J. B., and H. J. Strobel. 1989. Effect of ionophores on ruminal fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 1-6.
- SAS. Institute Inc. 2001. Statistical Analysis System, SAS, User's Guide: SAS Inst., Cary, NC.
- Therion, J. J., A. Kistner, and J. H. Kornelius. 1982. Effect of pH on growth rates of rumen amylolytic and lactolytic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 44: 428-434.
- Tung, R. S., and L. Kung Jr. 1993. *In vitro* effects of thiopeptide and monensin on ruminal fermentation of soluble carbohydrates. *J. Dairy Sci.* 76: 1083-1090.
- Yokoyama, M. T., y K. A. Johnson. 1993. Microbiología del rumen e intestino delgado. *In: Church, D. C. (ed). El Rumiante, Fisiología y Nutrición.* Ed. Acribia, Zaragoza, España. pp: 137-57.