

Cellulolytic and *Butyrivibrio fibrisolvens* bacteria population density, after supplementing fodder diets (*Pennisetum clandestinum*)

Densidad poblacional de bacterias celulolíticas y de *Butyrivibrio fibrisolvens* al suplementar dietas forrajeras (*Pennisetum clandestinum*)

Licet Molina G,¹ M.Sc, Luis Giraldo V,² P.hD, Diana Polanco E,¹ M.Sc, Lina Gutiérrez B,^{1,3*} Ph.D.

¹Universidad de Antioquia, Escuela de Microbiología, Grupo de Investigación en Microbiología Veterinaria, Calle 67 # 53-108, AA 1226. Medellín, Colombia. ²Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias Agrarias, Departamento de Producción Animal, Grupo Biotecnología Ruminal y Silvopastoreo "BIORUM", Calle 59A No 63-20. Medellín, Colombia. ³Escuela de Ciencias de la salud, Facultad de Medicina; Universidad Pontificia Bolivariana; Sede Central Medellín; Calle 78B N°72A-109, Medellín, Colombia. *Correspondence: liangutibui@gmail.com

Received: April 2014; Accepted: February 2015.

ABSTRACT

Objective. Determine the population density of cellulolytic bacteria, *Butyrivibrio fibrisolvens* and the concentration of vaccenic acid, by supplementing diets consisting of kikuyu grass (*Pennisetum clandestinum* Hoechst. Ex Chiov.) as base ingredient, together with cassava flour and biomass (effluent from ethanol production) in rumen simulator-Rusitec. **Materials and methods.** Four treatments (T) were evaluated, these were composed as: T1/Control 1: 100% kikuyu grass with a total protein intake of 23.9%, T2: a mixture of 70% kikuyu grass, 20% biomass and 10% cassava flour with a total protein intake of 19.4%; T3/Control 2: 100% kikuyu grass, with a 17.8% protein intake and T4: 70% kikuyu grass, 20% biomass and 10% cassava flour with a 15.3% protein intake. One and two-way variance analysis was made and the Pearson correlation coefficient was determined. **Results.** An increase was observed in the population density of viable cellulolytic bacteria (CFU/ml) and *B. fibrisolvens* statistically significant ($p < 0.005$) with treatment T2, in contrast to T1, T3 and T4 treatments. In addition, there was a significant increase in the concentration of vaccenic acid (mg/L) in the ruminal content in Rusitec with the same treatment (T2). **Conclusions.** Results obtained in this ruminal simulation study are evidence to the benefits of kikuyu grass together with cassava flour and biomass diet implementation on the growth of ruminal cellulolytic and *B. fibrisolvens* bacteria, as well as on the production of vaccenic acid. The study also suggests the nutritional potential that such supplements could provide to grazing bovine feeding.

Key words: Dietary supplements, fermentation, ruminal fermentation, Rumen (*Source: MeSH*).

RESUMEN

Objetivo. Determinar la densidad poblacional de bacterias celulolíticas, *Butyrivibrio fibrisolvens* y la concentración de ácido vaccénico, al suplementar dietas forrajeras de pasto kikuyo con harina de yuca y biomasa (resultante de la producción de etanol), en el simulador de rumen- Rusitec. **Materiales**

y métodos. Se evaluaron cuatro tratamientos (T): T1/Control 1: 100% pasto kikuyo con un aporte total de 23.9% de proteína, T2: 70% pasto kikuyo, 20% biomasa y 10% harina de yuca con un aporte total de 19.4% proteína, T3/Control 2: 100% pasto kikuyo con un aporte total de 17.8% de proteína y T4: 70% pasto kikuyo, 20% biomasa y 10% harina de yuca con un aporte total de 15.3% de proteína. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una y dos vías y se determinó el coeficiente de correlación de Pearson. **Resultados.** Se observó un incremento en la densidad poblacional de bacterias celulolíticas viables (UFC/ml) y de *B. fibrisolvans* estadísticamente significativas ($p < 0.005$) con el tratamiento T2, en comparación con los tratamientos T1, T3 y T4. Adicionalmente, se detectó un aumento significativo en la concentración de ácido vaccénico (mg/L) en el contenido ruminal del Rusitec con el mismo tratamiento (T2). **Conclusiones.** Los resultados obtenidos en este estudio de simulación ruminal indican que la suplementación del pasto kikuyo con harina de yuca y biomasa favorecen el crecimiento de las bacterias celulolíticas ruminales y de *B. fibrisolvans*, así como la producción de ácido vaccénico, y sugieren el potencial nutricional que podría tener este tipo de suplementación en la alimentación de bovinos en pastoreo.

Palabras clave: Fermentación, fermentación ruminal, Rumen, Suplementos dietéticos (*Fuente: MeSH*).

INTRODUCTION

Cattle production in tropical areas like Colombia depends mainly on fodder supply from the pastures. Degradation of lignocellulosic matter contained in fodder is carried out by rumen microbial consortia, specifically by cellulolytic bacteria that take part on the degradation of structural carbohydrates to volatile fatty acids assimilated by the ruminant (1-3).

Butyrivibrio fibrisolvans is a strict ruminal anaerobe, with high cellulolytic, hemicellulolytic, proteolytic and uricolytic activity. It may represent significant portion (10-30%) of culture ruminal bacteria (4). This bacteria plays a major role in fiber degradation and it has been identified as the main bacterial species that participates in the process of biohydrogenation on unsaturated fatty acids present in diets based on fodder, grains and oils (5), which is a process that could lead to an increase in the concentration of fatty acids in milk and meat from ruminants (6,7).

Some pastures available in different regions in Colombia lack adequate nutritional quality, and its production are seasonal, which reduces quality and return in the industry of milk and meat cattle (8). Previous research has suggested that supplementation of diets different industry subderivados (maize, cassava, fish oil, sunflower oil, etc.) improves use of high-fiber content and low digestibility fodder, enhance biodiversity of ruminal microorganisms and ruminal fermentation processes and, consequently, animal productivity (5,7). In the search of food supplements that improve digestion and degradation processes of fodders by bovines, diverse alternatives to pastures supplementation, mainly with fermentable and additive carbohydrates such as oils, concentrated food and grains, have been proposed.

INTRODUCCIÓN

La producción ganadera en las zonas tropicales tales como Colombia, depende principalmente del suplemento forrajero procedente de los pastizales. La degradación de la materia lignocelulósica contenida en el forraje es realizada por los consorcios microbianos del rumen, específicamente las bacterias celulolíticas participan en la degradación de los carbohidratos estructurales a ácidos grasos volátiles, los cuales son asimilados por los rumiantes (1-3).

Butyrivibrio fibrisolvans es una bacteria anaerobia estricta, con alta actividad celulolítica, hemicelulolítica, proteolítica y uricolítica. Representa una parte significativa (10-30%) del cultivo bacteriano ruminal (4). Desempeña un papel importante en la degradación de la fibra y se identifica como la principal especie bacteriana participante en el proceso de biohidrogenación de los ácidos grasos insaturados presentes en las dietas a base de forraje, granos y aceites (5). Este proceso podría llevar a un aumento de la concentración de los ácidos grasos en la leche y la carne, procedente de los rumiantes (6,7).

Algunos pastizales de diferentes regiones de Colombia carecen de una adecuada calidad nutricional y su producción es estacional, reduciendo por tanto la calidad y el rendimiento de la leche y de la carne en la industria ganadera (8). Anteriores investigaciones sugieren que al suplementar diferentes dietas con subderivados de la industria (maíz, yuca, aceite de pescado, aceite de girasol, etc.) aumenta el consumo de forraje de alto contenido de fibra y baja digestibilidad, mejorando la biodiversidad de los microorganismos ruminales, y los procesos de fermentación ruminal y por consiguiente la productividad animal (5,7). En la búsqueda de suplementos alimenticios para los bovinos, con el fin de mejorar los procesos de digestión y degradación de forrajes,

In 2008, and with the support of the Ministry of Agriculture and Rural Development of Colombia, the National Fuel Alcohol Program was created. One of the purposes of the program was to evaluate the production of ethanol from sugar cane and other agricultural sources such as banana, cassava and sorghum, with the objective of improving quality of fuels by biologic oxygenation and substitution of compounds such as methyl-tert-butyl ether, due to soil and underground water contamination originated in its use (9-11). Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) has been considered one of the viable alternatives for ethanol production in the country, that together with corn, sugar cane and rice, are considered the most important energy sources in tropical regions worldwide, as it becomes one of the alternative crops with highest potential for ethanol production (12,13). Cassava has been widely considered a basic energetic food item in the industry of balanced food for animals, because of its protein and starch content. In another strategy, the use of cassava flour together with the biomass originated in ethanol production might constitute a promising supplementation practice for pastures in which yields are insufficient to achieve acceptable levels of production. It might also be considered an additional source of protein and energy for bovines (13).

Kikuyu grass (*Pennisetum clandestinum* Hoechst. Ex Chiov.) is considered a basic feeding element by specialized dairy production systems in Colombia (14). Considering that fodder quality decreases as the plant grow solder, fibrous portion increases and decreases the protein content, digestibility and availability of energy for the animal lowered, which makes the evaluation of different alternatives of energetic supplementation to be included in the diet of the animal (13), it is possible that supplementing fodder such as kikuyu, could modify the ruminal biohydrogenation process, together with the subsequent formation of the principal components of CLA: rumenic acid (cis-9,trans-11) and vaccenic acid (trans-11C18:1).

This study takes into consideration the participation of ruminal cellulolytic bacteria in fiber degradation and the participation of *B. fibrisolvans* in the process of biohydrogenation for CLA production as important indicators of ruminal fermentation. In this regard, the objective of this study was to determine the population density of the cellulolytic bacteria, *B. fibrisolvans* and the concentration of vaccenic acid, in response to the use of cassava flour and effluent biomass from ethanol production as supplements to Kikuyu grass with different concentration of protein in an artificial rumen (Rusitec).

se han propuesto diversas alternativas para la suplementación de los pastizales, principalmente con carbohidratos fermentables y aditivos tales como aceites, concentrados y granos.

En 2008, se creó el Programa Nacional de Alcohol Carburante, con el apoyo del Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural de Colombia. Uno de los propósitos de este programa era evaluar la producción de etanol obtenido de la caña de azúcar y de otras fuentes agrícolas tales como banano, yuca y sorgo, con el fin de mejorar la calidad de los combustibles mediante oxigenación biológica. Esta se logra sustituyendo compuestos como el éter metil-ter-butílico, cuyo uso produce contaminación de los suelos y de las aguas subterráneas (9-11). Se considera que la yuca (*Manihot esculenta* Crantz) es una de las alternativas viables para la producción de etanol en el país; y junto con el maíz, la caña de azúcar y el arroz, son las fuentes de energía más importantes en las regiones tropicales del mundo, convirtiéndose así en uno de los cultivos alternativos con mayor potencial para la producción de etanol (12,13). En la industria de alimentos balanceados para animales, la yuca ha sido ampliamente utilizada como un producto básico de la alimentación energética, debido a su contenido de proteína y almidón. Por otra parte, el uso de la harina de yuca junto con la biomasa obtenida de la producción de etanol, podría constituir una práctica promisorio de suplementación de pastizales, ya que el cultivo de éstos es insuficiente para lograr niveles de producción aceptables. También se considera fuente adicional de proteína y de energía para los bovinos (13).

El pasto kikuyo (*Pennisetum clandestinum* Hoechst. Ex Chiov.) se considera un alimento esencial para los sistemas especializados de producción lechera (14). Teniendo en cuenta que la calidad del forraje baja a medida que la planta crece, su parte fibrosa aumenta reduciendo el contenido proteínico, y por tanto disminuyen la digestibilidad y disponibilidad energética para el ganado, lo que hace que se evalúen las diferentes alternativas de suplementos energéticos en la dieta del animal (13). Es posible que la suplementación de dietas forrajeras como el kikuyo, podría modificar el proceso de biohidrogenación ruminal, junto con la subsecuente formación de los principales componentes del CLA (ácido linoleico conjugado): ácido ruménico (cis-9, trans-11) y ácido vaccénico (trans-11C18:1).

Este estudio tiene en cuenta como indicadores importantes de la fermentación ruminal, la participación de las bacterias celulolíticas ruminales en la degradación fibrosa y de *B. fibrisolvans* en el proceso de biohidrogenación para la producción del CLA. En este sentido, el objetivo de este estudio fue determinar la densidad poblacional de las bacterias

MATERIALS AND METHODS

Ethical aspects of the study. This study was approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation from the National University of Colombia, Medellín site, in accordance to Deed CEMED-027, issued on December 2nd, 2008.

Type of study. Comparative experimental design with four treatments.

Ruminal microorganisms' inoculum used in Rusitec Fermenters. To start the ruminal fermentation simulation (Rusitec), ruminal content from four female Holstein cows (700 ± 25 kg live weight) was used as initial inoculum. The cows were rumen-fistulated and kept under a basal diet of kikuyu grass in the Paysandú farm, owned by the National University of Colombia, Medellín site, and located in the town of Santa Elena, at 2500 m.a.s.l, with an average temperature of 14°C (15). Rusitec is composed of eight sequential vessels (fermentation units) with a maximum capacity of 700 ml (16). In accordance to the protocols proposed by Czerkawski and Breckenridge (17), the simulated ruminal fermentation experiments were performed in the laboratory of Ruminal Biotechnology at the National University.

The experiment was started by placing, in each vessel, 200 ml of artificial saliva (pH= 8.4; 9.8g of NaHCO_3 ; 3.72g of Na_2HPO_4 ; 0.47g of NaCl; 0.57g of KCl; 0.053g of $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ and 0.128g of $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, of each component, per liter), 500 ml of ruminal fluid and a solid portion of ruminal content (80g). Such fractions were obtained separately after filtration through four layers of muslin, to ensure the inclusion of present microorganisms in both the liquid and solid fractions of ruminal content. The experiment was carried out at 39°C constant temperature. The simulated fermentation procedure was performed in two periods of seven days corresponding to a four-day adaptation period and a three-day measurement period (5th -7th day of simulation).

Treatments to be assessed through Rusitec. Kikuyu grass was the forage species selected to assess the effect of supplementation with cassava flour and biomass resulting from ethanol production, on cellulolytic and *B. fibrisolvans* bacteria, in Rusitec. Kikuyu grass was gathered in the municipality of San Pedro de los Milagros, with a 35-day regrowth age, while using nitrogen fertilization with urea (N:50-70, P2O5:45.8, K2O:18, MgO:24.75, SO4:44.85). Two types of kikuyu grass good and bad quality with contrasting nutritional quality in terms of protein content, the result of replacing both forages

celulolíticas, de *B. fibrisolvans* y la concentración de ácido vaccénico, en respuesta a la utilización de harina de yuca y biomasa efluente de la producción de etanol, como suplementos para el pasto kikuyu con diferente concentración de proteína en un rumen artificial (Rusitec).

MATERIALES Y MÉTODOS

Aspectos éticos del estudio. Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética en Experimentación Animal de la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín, de acuerdo con el Acta CEMED-027, emitida en diciembre 2 del 2008.

Tipo de estudio. Diseño experimental comparativo con cuatro tratamientos.

Inoculo de microorganismos ruminales utilizada en Fermentadores Rusitec. Para iniciar la simulación de la fermentación ruminal (Rusitec), se utilizó como inoculo inicial el contenido ruminal de cuatro vacas de raza Holstein (700 ± 25 kg peso vivo). Las vacas fueron sometidas a fistulización ruminal con una dieta normal de pasto kikuyu en la finca Paysandú, propiedad de la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín, y localizada en el corregimiento de Santa Elena, a 2500 m sobre el nivel del mar, con una temperatura promedio de 14°C (15). El Rusitec se compone de ocho recipientes consecutivos (unidades de fermentación) con una capacidad máxima de 700 ml (16). De acuerdo con los protocolos propuestos por Czerkawski y Breckenridge (17), los experimentos simulados de fermentación ruminal se llevaron a cabo en el laboratorio de Biotecnología Ruminal en la Universidad Nacional.

El experimento se inició colocando en cada recipiente 200 ml de saliva artificial (pH=8.4; 9.8g de NaHCO_3 ; 3.72g de Na_2HPO_4 ; 0.47g de NaCl; 0.57g de KCl; 0.053g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y 0.128g of $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, de cada componente, por litro), 500 ml de fluido ruminal y una porción sólida de contenido ruminal (80g). Tales fracciones se obtuvieron separadamente por filtración a través de cuatro capas de muselina, para garantizar la inclusión de los microorganismos presentes tanto en la fracción líquida como sólida del contenido ruminal. El experimento se llevó a cabo a una temperatura constante de 39°C . El procedimiento de simulación de la fermentación ruminal se realizó en dos períodos de siete días que corresponden a un período de adaptación de cuatro días y un período de valoración de tres días (5°-7° día de simulación).

protein, protein by foreseeing biomass, were included to evaluate the response to biomass and cassava flour as dietary supplements. The amount of kikuyu grass, plus the addition of substrate evaluated in each vessel, was 18g (10.3-15.5g of dry matter). The grass, with a particle size of 1.5 mm, was stored in nylon bags with a pore size of 45 μ m. To avoid dilution of the products resulting from the fermentation system, a dilution rate of 3.5% per hour was established.

The assessment of treatments through Rusitec was carried out as follows: On day zero, the experiment started with a test performed in the Rusitec fermenter in eight fermenting pots (2 crocks per treatment). Once the ruminal liquid and artificial saliva were poured into each crock, two nylon bags, containing 18g of the treatment to be assessed and 80g of ruminal content respectively, were introduced in the containers. This last bag was removed 48 hours after incubation initiated. During the following days (1st-7th), each bag in each fermenter was replaced by a new substrate bag every 24 hours. During the 5th, 6th and 7th days, the ruminal liquid was collected from each fermenting crock, before replacing the bag containing the substrate, in order to perform the quantification of ruminal microorganisms, the determination of vaccenic acid and the immediate pH measurement.

Two duplicates of the simulation experiment were carried out in two different moments, with a 15-day interval between them, but under the same conditions. This was aimed at estimating more accurately the effect of the supplements to kikuyu on the microbial population to be evaluated. The assessed treatments (T) were: T1/Control 1: 100% kikuyu grass with a total protein intake of 23.9%; T2: a mixture of 70% kikuyu grass, 20% biomass and 10% cassava flour with a total protein intake of 19.4%; T3/Control 2: 100% kikuyu grass, with a 17.8% protein intake; and T4: 70% kikuyu grass, 20% biomass and 10% cassava flour with a 15.3% protein intake (Tables 1 and 2).

Table 1. Chemical composition of the treatments evaluated in Rusitec.

Treatments	CP	EE	NDF	ADF	ADL	A	OM
	(% DM)						
*kikuyu high quality							
T1	23.9	3.06	57.5	25.0	2.3	12.9	87.1
T2	19.4	2.94	52.0	24.1	4.2	11.0	89.0
*kikuyu low quality							
T3	17.8	2.75	66.6	29.3	3.2	9.8	90.2
T4	15.3	2.38	58.3	28.0	5.5	9.2	90.8

CP: Crude protein, EE: Ether extract, NDF: Neutral detergent fiber; ADF: Acid detergent fiber, ADL: Acid detergent lignin, A: Ashes, OM: Organic matter. *Nutritional quality in terms of protein content, the result of replacing both forages protein, protein by foreseeing biomass.

Tratamientos evaluados a través de Rusitec.

El pasto kikuyo fue la especie forrajera seleccionada para evaluar el efecto de suplementar con harina de yuca y biomasa resultante de la producción de etanol, sobre las bacterias celulolíticas y *B. fibrisolvens* en el Rusitec. El pasto se recogió en el municipio de San Pedro de los Milagros, con una edad de rebrote de 35 días, utilizando fertilización nitrogenada con urea (N:50-70, P₂O₅:45.8, K₂O:18, MgO:24.75, SO₄:44.85). Con el fin de evaluar el resultado de la suplementación en la dieta, con la biomasa y la harina de yuca se incluyeron dos tipos de pasto kikuyo, de buena y mala calidad, con características nutricionales contrastantes en términos de contenido proteico, como resultado de reemplazar la proteína de ambos forrajes por biomasa residual. La cantidad de pasto kikuyo, más la adición del sustrato evaluado en cada recipiente, fue 18g (10.3-15.5g de materia seca). El pasto, con un tamaño de partícula de 1.5 mm, se almacenó en bolsas de nylon de 45 mm de poro. Para evitar la dilución de los productos resultantes del sistema de fermentación, se estableció una tasa de dilución de 3.5% por hora.

La evaluación de los tratamientos mediante Rusitec, se llevó a cabo del modo siguiente: El día cero, se inició el experimento con un ensayo en Rusitec en ocho fermentadores (2 fermentadores por tratamiento). Inmediatamente después de verter el líquido ruminal y la saliva artificial en cada fermentador, se introdujeron en los recipientes dos bolsas de nylon que contenían 18g del tratamiento a evaluar y 80 g de contenido ruminal, respectivamente. Esta última bolsa se removió 48 horas después de iniciada la incubación. Durante los siguientes días (1°-7°), se reemplazó, cada 24 horas, la bolsa en cada uno de los fermentadores por una con nuevo sustrato. Durante el 5°, 6° y 7° días, el líquido ruminal de cada fermentador se recogió, antes de reemplazar la bolsa con el sustrato, con el fin de efectuar la cuantificación de los microorganismos ruminales, la determinación de ácido vaccénico y la medición inmediata del pH.

Table 2. Chemical composition of cassava flour and biomass product of the production ethanol.

Biomass*	CP	EE	NDF	ADF	ADL	S	OM	BE	DIVDM
	(% DM)								
	11.08	2.03	50.87	42.43	16.59	11.12	88.88	4.359	74.58
Cassava flour*	CP	EE	H	A	CHO	S	C.F	N	
	(% DM)								
	3.17	0.39	10.35	2.12	84.00	72.03	1.66	0.51	

CP: Crude protein, EE: Ether extract, NDF: Neutral detergent fiber, ADF: Acid detergent fiber, ADL: Acid detergent lignin, A: Ashes, S: Starch, OM: Organic matter, BE: Gross energy (kcal/kg dry matter), DIVDM: Digestibility "in vitro" dry matter (DM), H: Humidity, CHO: Carbohydrate, S: Starch, CF: Crude fiber, N: Nitrogen. *These data are from random samples obtained by Grupo de Biotransformación, Universidad de Antioquia for the grant MADR code-2008D31067-3724. The biomass used in the experiment is the product of fermentation of cassava flour plus the inclusion of kikuyu grass.

Sampling procedure. Thirty five milliliters of the ruminal content mixture collected from the four Holsteins were extracted to perform the isolation of native strains of *B. fibrisolvans* and determine the initial quantity of cellulolytic and *B. fibrisolvans* bacteria and the initial concentration of vaccenic acid, contained in the initial inoculum. After the adaptation period to the system, during the three days of sampling, 2 aliquots of ruminal content were extracted from each fermenter, every 24 hours: 15 ml were employed to measure the pH and complete the procedures of cellulolytic bacteria quantification; 20 ml, which were stored at -20°C , were later used for DNA extraction and *B. fibrisolvans* real-time qPCR quantification. In addition, to measure vaccenic fatty acid through gas chromatography, for this process were took between 0.15 to 0.20 g sample, 4.0 ml of 0.5 N NaOH was added in methanol and placed in a water bath at 90°C , the system was allowed to reflux for 7 minutes elapsed time reflux, 5 ml of buffer F3 was added to 12% methanol by the top of the condenser and allowed to reflux for 2 minutes. Subsequently 4.0 ml of N-heptane was added to the top of the condenser and was refluxed for 1 minute, cooled and 100 ml of saturated NaCl to ensure the extraction of the compounds separated in two phases solution is added.

The organic phase was removed with a Pasteur pipette into a test tube and added anhydrous sodium sulfate to remove moisture was used, in a column: DB-23, capillary of 50.0 m, inside diameter 0.25 mm, film thickness of 1.4 μm , detector temperature of 280°C and injector temperature of 250°C , hydrogen injection (carrier gas): 40 m/seg, $\text{H}_2 = 45$ ml/min flow detector and 450 ml/min airflow (Agilent 6890 Series Gas Chromatograph, Wilmington, DE).

Viable cellulolytic bacteria (VCB) quantification. Serial dilutions (until 10^{-6}) in triplicate, using solvent (phosphate and mineral salts, resazurin, calcium carbonate and L-cysteine-HCL) were carried out using 1ml of the sample extracted from the initial inoculum and each fermenter, during sample period. One milliliter from dilutions 10^{-3} to 10^{-6} was extracted and added to solid pre-reduced media prepared by means of Roll-tube technique (18). These culture media contained rumen fluid clarified at 40%, cellobiose at 0.1% and yeast extract at 0.25%, together with other components recommended by Grubb and Dehoroty (19). In order to prepare the solid medium film in culture tubes, agar was added to a final concentration of 1.5% and the culture was grown in anaerobic conditions, by inoculating the hermetically closed sample, through the rubber lid of the tube and

El experimento de simulación se llevó a cabo por duplicado en dos momentos diferentes, con un intervalo de 15 días entre ellos, pero bajo las mismas condiciones. Esto tuvo como objetivo estimar con más exactitud el efecto de los suplementos del kikuyo sobre la población microbiana a evaluar. Los tratamientos evaluados (T) fueron: T1/Control 1: 100% pasto kikuyo con un aporte proteico total de 23.9%; T2: una mezcla de 70% pasto kikuyo, 20% biomasa y 10% harina de yuca con un aporte proteico total de 19.4%; T3/Control 2: 100% pasto kikuyo, con un 17.8% de aporte proteico; y T4: 70% pasto kikuyo, 20% biomasa y 10% harina de yuca con un 15.3% de aporte proteico (Tablas 1 y 2).

Procedimiento de muestreo. Se extrajeron treinta y cinco mililitros de la mezcla de contenido ruminal obtenido de las cuatro vacas Holstein, para efectuar el aislamiento de cepas nativas de *B. fibrisolvans* y determinar la cantidad inicial de bacterias celulolíticas y *B. fibrisolvans* y la concentración inicial de ácido vaccénico, contenidos en el inocuo inicial. Después del período de adaptación al sistema, durante los tres días de muestreo se extrajeron de cada fermentador 2 alícuotas de contenido ruminal, cada 24 horas: 15 ml se emplearon para medir el pH y completar los procedimientos de cuantificación de bacterias celulolíticas; 20 ml, que se almacenaron a -20°C , se utilizaron más tarde para la cuantificación de *B. fibrisolvans* mediante PCR en tiempo real. Además, para el proceso de medir el ácido graso vaccénico, por medio de cromatografía de gases, se tomó una muestra entre 0.15 y 0.20g, se añadieron 4.0 ml de NaOH 0.5N en metanol y se colocó en un baño de agua a 90°C . El sistema permite el reflujo por 7 minutos de tiempo transcurrido; se agregaron 5 ml de solución tampón F3 a metanol al 12% por la parte superior del condensador y se sometió a reflujo por dos minutos y luego por el mismo punto se agregaron 4.0 ml de N-heptano sometándolo a reflujo por un minuto, se refrigeró y se añadieron 100 ml de NaCl saturado para asegurar la extracción de los compuestos separados en la solución de dos fases.

La fase orgánica se removió con una pipeta Pasteur en un tubo de ensayo y para remover la humedad se le agregó sulfato anhídrido sódico, en una columna: DB-23, capilaridad de 50.0 m, diámetro interno 0.25 mm, espesor de película 1.4 mm, detector de temperatura de 280°C e inyector de temperatura de 250°C ; inyección de hidrógeno (gas de arrastre): 40 m/seg, detector de flujo $\text{H}_2=45$ ml/min y flujo de aire 450 ml/min (Agilent 6890 Series Gas Chromatograph, Wilmington, DE).

using a syringe containing N_2 . The colony count was performed after 72 hours of incubation at 39°C and the results were given in terms of Colony Forming Units (CFU/ml) (18).

qPCR of *B. fibrisolvans*. The standard curve for the quantification of *B. fibrisolvans* through qPCR was performed with the reference strain ATCC #19171, stored in axenic culture (10^8 cells/ml). The number of cells in the culture after 24 hours was calculated at a wavelength of 640 nm. One milliliter was extracted from the culture for centrifugation and DNA extraction with DNeasy® Blood & Tissue commercial kit (QIAGEN, MD, USA). The serial dilution (10^{-1} - 10^{-6}) was performed for the DNA extracted from the reference strain. Such dilutions were used to perform the specific standard curve for the qPCR of *B. fibrisolvans* in the samples of rumen obtained from the Rusitec. The curve was generated by considering the values of the cycle threshold (Ct), observed in 35 cycles, versus the logarithm of the number of cells/ml, starting with the six dilutions of pure culture DNA of well-known concentration. The qPCR protocol followed in this study was validated by the analysis of two internal controls, genomic DNA from the reference strain ATCC #19171 and DNA from the reference strain ATCC #19171 added to 1 ml of ruminal content and subjected to extraction protocol. The amplification of both controls was compared in separate and multiple reactions, to determine the efficiency and specificity of the method and to discard the presence of inhibitors in the ruminal content samples. Genomic DNA extraction was performed from the samples stored at -20°C, collected from the initial inoculum and from each fermenter in the Rusitec during the sampling period. Quality and concentration of the extracted DNA was assessed using NanoDrop ND1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, DE) and 80 ng from the DNA extracted from each sample were analyzed.

The qPCR was performed in Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR system (Applied Biosystems, CA, USA). The amplification reactions were carried out in a final volume of 25 µl that contained 12.5 µl of SYBR® Green (QIAGEN, MD, USA) and 0.5 µM of each primer for the ARNr 16S gene amplification. After a 15 minute denaturation at 95°C, the amplification and quantification program was repeated 35 times (30s at 94°C; 30s at 55°C and 30s at 72°C), followed by the fusion curve analysis (46°C-95°C, with temperature increase of 3°C per minute and continuous measurement of fluorescence).

The Ct value was calculated automatically by the equipment and the amplification of

Cuantificación de Bacterias celulolíticas viables (VBC). Se llevaron a cabo diluciones en serie (hasta 10^{-6}) en triplicado, usando solvente (fosfato y sales minerales, resazurina, carbonato de calcio y L-cisteína-HCL) y utilizando 1 ml de la muestra extraída de la inoculación inicial en cada fermentador, durante el período de muestreo. Se extrajo 1 ml de las diluciones 10^{-3} a 10^{-6} y se agregó al medio sólido pre-reducido, preparado por medio de la técnica de tubo rodado (roll-tube) (18). Estos medios de cultivo contenían fluido ruminal clarificado al 40%, celobiosa al 0.1% y extracto de levadura al 0.25%, junto con otros componentes recomendados por Grubb y Dehoroty (19). Con el fin de preparar la película del medio sólido en tubos de cultivo, se agregó agar a una concentración final de 1.5% y el cultivo se hizo crecer en condiciones anaeróbicas, inoculando la muestra, herméticamente cerrada, a través de la tapa de caucho del tubo, utilizando una jeringa con N_2 . El recuento bacteriano se efectuó después de 72 horas de incubación a 39°C y los resultados se dieron en términos de Unidades Formadoras de Colonias (UFC/ml) (18).

Cuantificación de *B. fibrisolvans* mediante PCR. La curva estándar para la cuantificación de *B. fibrisolvans* mediante PCR se realizó con la cepa de referencia ATCC #19171, conservada en cultivo puro o axénico (10^8 células/ml). El número de células en el cultivo después de 24 horas se calculó con una longitud de onda de 640 nm. Se extrajo un mililitro del cultivo para centrifugación y extracción de ADN con el kit comercial DNeasy® Blood y Tissue (QIAGEN, MD, USA). La dilución en serie (10^{-1} - 10^{-6}) se efectuó para el ADN extraído de la cepa de referencia. Tales diluciones se utilizaron para realizar la curva estándar específica por la PCR de *B. fibrisolvans* en las muestras de rumen obtenido en el Rusitec. La curva se generó considerando los valores del ciclo umbral (Ct: cycle threshold), observado en 35 ciclos, contra el logaritmo del número de células por mililitro, iniciando con las seis diluciones del ADN extraído de un cultivo puro de concentración conocida. El protocolo de PCR seguido en este estudio se validó con el análisis de dos controles internos, ADN genómico de la cepa de referencia ATCC #19171 y ADN de la cepa de referencia ATCC #19171 agregado a 1 ml de contenido ruminal y sometido al protocolo de extracción. La amplificación de ambos controles se comparó en reacciones separadas y múltiples para determinar la eficiencia y especificidad del método y descartar la presencia de inhibidores en la muestras de contenido ruminal. La extracción del ADN genómico se llevó a cabo empleando las muestras conservadas a -20°C, recogidas del inoculo inicial y de cada fermentador en el Rusitec, durante el período de muestreo.

sample was considered negative when the Ct value was lower than 8 and higher than 35, or when an amplification curve was not obtained. The amplification reaction was repeated for all samples with Ct values higher to 35. Each amplification protocol included a negative control (without template DNA), six positive controls in triplicate corresponding to the know concentration DNA (from the standard curve) and the DNA from the internal controls.

The results were reported considering the number of cells/ml. Q-PCR Efficiency (E) was calculated from the slope during the exponential phase, in each cycle according to the equation $E=10^{(-1/\text{slope})}$. The products of the resulting qPCR amplification were verified by agarose gel electrophoresis to 1%, and dyed with EZvision™Dye (AMRESCO, OH, USA).

Statistical analysis. The data the population density of cellulolytic (CFU/ml) and *B. fibrisolvens* bacteria (cells/ml) during the sampling period, in response to cassava flour and biomass effluent from ethanol product being added as supplements to kikuyu grass in Rusitec, were examined in a one and two-way variance analysis (ANOVA), having complied with the conditions of bivariate normality and homoscedasticity. In addition, an analysis of repeated measures in time was carried out following the Friedman and Wilcoxon tests. Also the Pearson correlation coefficient was determined between the vaccenic acid concentration and the population density of *B. fibrisolvens*, by means of the Statistical Package for the Social Sciences for Windows software SPSS version 21 (IBM SPSS, Armonk, NY: IBM Corp.).

RESULTS

Population density of viable cellulolytic bacteria and pH in the in Rusitec. The amount of CFU/ml obtained from the initial inoculum, used to start the ruminal fermentation simulator was 7.5×10^5 CFU/ml. The analysis the CFU/ml amount of cellulolytic bacteria, among the different treatments, showed statistically significant differences ($p=0.03$). The growth of microbial population during the 5th and the 6th day of the sampling period in treatments T1, T2 and T4 on average were of 19.23×10^5 CFU/ml, in contrast to the population of cellulolytic bacteria in T3, whose recount mean was lower in relation to the other treatments (1.5×10^5 CFU/ml on average) on the 6th day of measurement. When the evaluation of the population growth during the 7th day of the sampling period was made, a higher ($p=0.0001$) population of viable

La calidad y concentración del ADN extraído de cada muestra se evaluaron utilizando el Espectrofotómetro NanoDrop ND1000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE) y para el análisis de cada muestra se utilizaron 80 ng del ADN extraído.

La PCR cuantitativa se efectuó en el sistema PCR en tiempo real Applied Biosystems 7500 Fast (Applied Biosystems, CA, EE.UU). Las reacciones de amplificación del gen 16S rRNA se llevaron a cabo en un volumen final de 25 μ l que contenían 12.5 μ l de SYBR® Green (QIAGEN, MD, EE.UU) y 0.5 μ M de cada base o partidor. Después de 15 minutos de desnaturalización a 95°C, el programa de amplificación y cuantificación se repitió 35 veces (30 seg a 94°C; 30 seg a 55°C y 30 seg a 72°C), seguido por el análisis de la curva de fusión (46°C-95°C, con aumentos de temperatura de 3°C por minuto y medición continua de fluorescencia).

El valor Ct fue calculado automáticamente por el equipo y la amplificación de la muestra se consideró negativa cuando el valor Ct estuvo por debajo de 8 y por encima de 35, o cuando no se obtuvo una curva de amplificación. La reacción de amplificación se repitió para todas las muestras con valores de Ct por encima de 35. Cada protocolo de amplificación incluyó un control negativo (sin plantilla de ADN), seis controles positivos en triplicado, correspondientes a la concentración conocida de ADN (de la curva estándar) y el ADN de los controles internos.

Los resultados se presentaron considerando el número de células/ml. La Eficiencia (E) PCR se calculó de la pendiente durante la fase exponencial, en cada ciclo, de acuerdo con la ecuación $E=10^{(-1/\text{pendiente})}$. Los productos de la amplificación obtenidos mediante PCR se verificaron mediante electroforesis con gel de agarosa al 1% y se tiñeron con EZvision™Dye (AMRESCO, OH, EE.UU).

Análisis estadístico. Los datos de la densidad poblacional de las bacterias celulolíticas (UFC/ml) y *B. fibrisolvens* (células/ml) durante el período de muestreo, como resultado de la suplementación del pasto kikuyo con harina de yuca y biomasa residual de la producción de etanol, en un simulador Rusitec, se examinaron con un análisis de varianza (ANOVA) de una y dos vías, tras haber cumplido con las condiciones de normalidad bivariable y homocedasticidad. Adicionalmente, se realizó un análisis de mediciones repetidas en el tiempo usando el estadístico de Friedman y Wilcoxon. Se determinó también el coeficiente de correlación de Pearson entre la concentración de ácido vaccénico y la

cellulolytic bacteria was found in T2, in contrast to T1 (good-quality grass content) and T4 (mixture of low quality grass, biomass and cassava flour).

Considering cellulolytic bacteria population in T3, growth in the population was evident, but there were not statistically significant differences in comparison with the other treatments. A statistically significant decrease ($p=0.003$) in the population was evident, in contrast to treatments T1 and T4 on the 7th day of measurement (Figure 1). Statistically significant differences on the days of population density measurement were evident when the paired comparison, between the collective average recounts of both viable cellulolytic and *B. fibrisolvans* bacteria, was made. Statistically significant differences were evident in the population density of both viable cellulolytic and *B. fibrisolvans* from the 7th day, in contrast to the 5th and 6th days of measurement, when the average recount was lower than the one found on the 7th day. The pH of the ruminal content in the different Rusitec fermenters did not change significantly ($p=0.165$) during the three sampling days, however, a statistically significant decrease in the pH observed in the Rusitec was evident (\sim pH 6.8), in relation to the pH value that the ruminal flow initial inoculum presented.

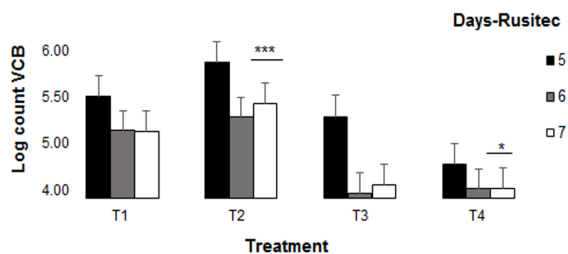


Figure 1. Population density of viable cellulolytic bacteria (VCB) according to diet and sampling time (one measurement per fermenter). Results are given as means \pm standard deviation of the determinations obtained over the sampling period in the Rusitec. A P-value of <0.05 was considered statistically significant. * $p<0.05$, ** $p<0.01$ and *** $p<0.001$.

qPCR of *B. fibrisolvans*. The specificity of the qPCR amplification for the ARNr 16S gene partial sequence was assessed by agarose gel electrophoresis at 1%, where a single 246 pb long band was observed, in accordance to the expected size for the reference strain ATCC #19171. In addition, the fusion curve analysis obtained showed a specific and defined curve for each PCR product, without the dimer formation of

densidad poblacional de *B. fibrisolvans*, por medio del Paquete Estadístico para las Ciencias Sociales versión 21 para Windows software SPSS (IBM SPSS, Armonk, NY: IBM Corp.).

RESULTADOS

Densidad poblacional de bacterias celulolíticas viables y pH en el Rusitec. La cantidad de Unidades Formadoras de Colonias/ml obtenida del inóculo inicial, utilizada para iniciar el simulador de fermentación ruminal, fue 7.5×10^5 UFC/ml. El análisis de la cantidad UFC/ml de bacterias celulolíticas, entre los diferentes tratamientos, mostró diferencias estadísticamente significativas ($p=0.03$). El crecimiento de la población microbiana durante el 5° y 6° día del período de muestreo en los tratamientos T1, T2 y T4 en promedio fue de 19.23×10^5 UFC/ml, en contraste con la población de bacterias celulolíticas en T3, cuyo recuento medio fue inferior en relación a los otros tratamientos (1.5×10^5 UFC/ml en promedio) en el 6° día de medición. Cuando se hizo la evaluación del crecimiento poblacional durante el 7° día del período de muestreo, se encontró en T2 una población mayor ($p=0.0001$) de bacterias celulolíticas viables, en contraste con T1 (contenido de pasto de buena calidad) y T4 (mezcla de pasto de baja calidad, biomasa y harina de yuca).

Considerando la población de bacterias celulolíticas en T3, el crecimiento poblacional fue evidente, pero no hubo diferencias estadísticamente significativas en comparación con los otros tratamientos. En el 7° día de medición, se encontró una disminución estadísticamente significativa ($p=0.003$) en la población, en contraste con los tratamientos T1 y T4 (Figura 1). En los días de medición de densidad poblacional, cuando se hizo la comparación por pares, las diferencias estadísticamente significativas fueron evidentes, entre los recuentos promedio colectivos de ambas bacterias celulolíticas viables y *B. fibrisolvans*. Estas diferencias también se vieron en la densidad poblacional tanto de la bacterias celulolíticas viables como de *B. fibrisolvans* del día 7°, en contraste con los días 5° y 6° de medición, cuyo recuento promedio fue inferior. Durante los tres días de muestreo el pH del contenido ruminal, en los diferentes fermentadores Rusitec, no cambió significativamente ($p=0.165$), sin embargo, se encontró una disminución estadísticamente significativa del pH observado en el Rusitec (\sim pH 6,8), en relación al valor del pH que presentó el inóculo inicial del fluido ruminal.

the primers. High efficiency was observed in the PCR amplification of the analyzed samples, from 80 ng of genomic DNA, with efficiency values within the range of 1.76 to 2, and high linearity between the results obtained in the slope of each sample (Pearson correlation coefficient, $r > 0.9$). Real-time qPCR intra-assay accuracy reached a high level, with a 4% variation coefficient estimated from the Ct data average in each three-repetition cycle, in all samples from the curve under the same experiment. Likewise, real-time qPCR reproducibility of the assessed samples in three experiments performed on different occasions, showed a 12% variation coefficient. The standard curve generated for the quantification of *B. fibrisolvans* through real-time qPCR presented a linear relation (98% relation coefficient) with an efficiency of 1.84 for the six points included in the standard curve.

The population density of *B. fibrisolvans* obtained from qPCR initial inoculum was 4.94×10^6 cells/ml. The density of *B. fibrisolvans*, during the three sampling days was 9.19×10^6 cells/ml (media \pm ESM). Statistically significant differences were not found in the population density of *B. fibrisolvans* on the fifth and sixth days of sampling with T1 and T4, where population remained constant, whereas a decrease in the population without statistically significant differences was observed in T2. In T3, the population density increased significantly ($p = 0.045$) within a range of 5.2×10^4 a 1.25×10^6 cells/ml. However, when the analysis of the population density of *B. fibrisolvans* during the 7th day was carried out, a statistically significant increase was observable ($p = 0.001$) in T2 (1.18×10^6 cells/ml). The supplementation of kikuyu grass (19.4% protein) with 20% biomass and 10% cassava flour caused a significant surge in the population of *B. fibrisolvans* in contrast to the other treatments (Figure 2).

The concentration of vaccenic acid obtained from the initial inoculum was 15 mg/L. Statistically significant differences in the concentration of vaccenic acid in the ruminal content from the Rusitec, during the sampling period, for treatments T1, T3 and T4, were not found. However, in T2, there was a statistically significant increase ($p = 0.001$) in the concentration of this acid. Also, a positive correlation between the amount of cells/ml of *B. fibrisolvans* and the concentration of vaccenic acid, was evident ($r = 86\%$, $p = 0.0038$). In other words, the vaccenic acid concentration was directly proportional to the population density of *B. fibrisolvans* in the ruminal content during the Rusitec simulation.

PCR de *B. fibrisolvans*. Se evaluó la especificidad de la amplificación mediante PCR para la secuencia parcial del gen 16S rRNA, mediante electroforesis con gel de agarosa al 1%, observándose única banda con un tamaño de 246 pb, de acuerdo con el tamaño esperado para la cepa de referencia ATCC #19171. Además, el análisis de la curva de fusión obtenida mostró una curva definida y específica para cada producto de PCR, sin la formación de dímeros de cebadores. Se observó alta eficiencia en la amplificación PCR de las muestras analizadas, de 80 ng de ADN genómico, con valores de rendimiento dentro del rango de 1.76 a 2, y una alta linealidad entre los resultados obtenidos en la pendiente de cada muestra (coeficiente de correlación de Pearson, $r > 0.9$). La precisión intra-ensayo de la PCR en tiempo real, alcanzó un alto nivel, con un coeficiente estimado de variación del 4% de los datos promedio Ct en cada ciclo de tres repeticiones, en todas las muestras de la curva según el mismo experimento. Igualmente, la reproducibilidad de la PCR en tiempo real de las muestras evaluadas en tres experimentos realizados en diferentes ocasiones, mostró un coeficiente de variación del 12%. La curva estándar generada por la cuantificación del *B. fibrisolvans* a través de la PCR en tiempo real, presentó una relación lineal (98% coeficiente de relación) con una eficiencia de 1.84 para los seis puntos incluidos en la curva estándar.

La densidad poblacional de *B. fibrisolvans* obtenida en el inoculo mediante la cuantificación por PCR fue de 4.94×10^6 células/ml. La densidad de *B. fibrisolvans*, durante los tres días de muestreo fue de 9.19×10^6 células/ml (media \pm ESM). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la densidad poblacional de *B. fibrisolvans* en los días 5° y 6° de muestreo con T1 y T4, manteniéndose la población constante, mientras que se observó en T2 una disminución en la población sin diferencias estadísticamente importantes. En T3, la densidad poblacional se incrementó significativamente ($p = 0.045$) dentro de un rango de 5.2×10^4 a 1.25×10^6 células/ml. Sin embargo, cuando se llevó a cabo el análisis de la densidad poblacional de *B. fibrisolvans* durante el 7° día, se observó un incremento estadísticamente significativo ($p = 0.001$) en T2 (1.18×10^6 células/ml). La suplementación del pasto kikuyo (19.4% de proteína) con 20% de biomasa y 10% de harina de yuca causó un aumento considerable en la población de *B. fibrisolvans* en contraste con los otros tratamientos (Figura 2).

La concentración de ácido vaccénico obtenido del inoculo inicial fue de 15 mg/L. Durante el período de muestreo, para los tratamientos T1, T3 y T4 no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la concentración del ácido en

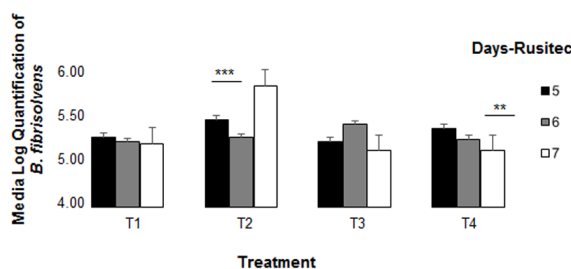


Figure 2. Population density of *B. fibrisolvans* according to diet and sampling time (one measurement per fermenter). Results are given as means \pm standard deviation of the determinations obtained over the sampling period in the Rusitec. A P-value of <0.05 was considered statistically significant. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.

DISCUSSION

In this study, it was observed that population density of cellulolytic bacteria and specifically *B. fibrisolvans*, increased significantly in response to the supplementation of kikuyu grass (19.4% protein) with cassava flour and biomass effluent from ethanol production. It may be due to the starch and protein input in this treatment, contrary to other treatment where the percentage of starch and protein were lower (13) which may have stimulated the amilolytic and proteolytic activity of this type of bacteria (4,11). Likewise, research carried out by Wanapat et al (13) reports that cassava chip and other forms of cassava root can be successfully fermented with yeast (*Saccharomyces cereviceae*) to obtain a final product with high Crude protein and a relatively high profile of amino acids. It was found that cassava could replace soybean meal completely and was beneficial to cattle in terms of the efficiency of rumen fermentation, microbial protein synthesis, nitrogen retention and nutrient digestibility. Nevertheless, the results from this study in treatments T3 and T4 were completely opposite to results in T2, which may suggest that the positive response to supplementation in T2, relies on the nutritional quality of kikuyu grass. Studies carried out by Garcia et al (20) assessed the effect of supplementation with biomass obtained as a byproduct from ethanol production by replacing different percentages of protein, of contrasting nutritional quality (high, mid, low) in three kikuyu grass fodders, with protein from biomass. After the evaluation of the fractions (dry matter, neutral detergent fiber and acid detergent fiber) researchers observed that supplementation had a significant positive effect ($p < 0.01$) on the fermentation parameters evaluated with the

el contenido ruminal del Rusitec. Sin embargo, en T2, hubo un incremento estadísticamente significativo ($p = 0.001$) en la concentración del ácido. También fue evidente una correlación positiva entre la cantidad de células/ml de *B. fibrisolvans* y la concentración de ácido vaccénico ($r = 86\%$, $p = 0.0038$). En otras palabras, durante la simulación en el Rusitec, la concentración de ácido vaccénico fue directamente proporcional a la densidad poblacional de *B. fibrisolvans* en el contenido ruminal.

DISCUSIÓN

En este estudio, se observó que la densidad poblacional de las bacterias celulolíticas y específicamente *B. fibrisolvans*, se incrementó significativamente, en respuesta a la suplementación del pasto kikuyo (19.4% de proteína) con harina de yuca y biomasa residual de la producción de etanol. Posiblemente se deba al ingreso de almidón y proteína a este tratamiento, al contrario de otro donde el porcentaje de almidón y proteína fue inferior (13). Esto puede haber estimulado las actividades amilolítica y proteolítica de este tipo de bacteria (4,11). De igual manera, la investigación llevada a cabo por Wanapat y colaboradores (13) reporta que la yuca, ya sea como chips o de otra forma se puede fermentar exitosamente con levadura (*Saccharomyces cereviceae*) para obtener un producto final con alta proteína bruta y alto perfil de aminoácidos. Se encontró que la yuca podría reemplazar completamente la harina de soya y era benéfica para el ganado en términos de eficiencia en la fermentación ruminal, síntesis proteínica microbiana, retención de nitrógeno y digestibilidad nutricional. No obstante, los resultados de este estudio en los tratamientos T3 y T4 fueron completamente opuestos a los de T2, lo cual puede sugerir que la respuesta positiva a la suplementación en T2, depende de la calidad nutricional del pasto kikuyo.

En estudios realizados por García y colaboradores (20) se evaluó el efecto de la suplementación con biomasa, obtenida como un subproducto del etanol, reemplazando diferentes porcentajes de proteína en tres forrajes de pasto kikuyo, de calidad nutritiva contrastante (alta, media, baja) por proteína procedente de la biomasa. Después de la evaluación de las fracciones (materia seca, fibra detergente neutra y fibra detergente ácida), los investigadores observaron que la suplementación había tenido un efecto positivo ($p < 0.01$) sobre los parámetros de fermentación evaluados con el pasto de alta calidad, en contraste con los resultados obtenidos con la suplementación del pasto de media y baja calidad. Esto sugiere que la respuesta positiva a la suplementación con biomasa se relaciona con la calidad del pasto kikuyo, lo cual puede también

high-quality grass, in contrast to the results obtained with the supplementation of mid and low-quality kikuyu grass. This suggests that the positive response to supplementation with biomass is related with the nutritional quality of kikuyu grass, which may also influence the population of cellulolytic and *B. fibrisolvans* bacteria observed in this study in T2, which included the supplementation of high-quality grass with biomass and cassava flour.

The genus *Butirivibrio* may be divided in several groups corresponding to three different biotypes, in accordance to its capacity to produce some fatty acids. Such fact classifies them as lactic and succinic acid producers, instead of acetate and butyrate producers (6, 21, 22). Mrazek et al (23), identified that the *Pseudobutyrvibrio ruminis* and *Butyrvibrio proteoclasticum* isolations found in bovine rumen, produce succinate and propanoate, but they do not produce butyric and acetate, in contrast to the type strain for *B. fibrisolvans*, which produces butyric and lactic acids and formic and succinic acids at a lower quantity. The species of this genus belong to the cluster XIVa of the Subphylum Clostridium and take part in important functions of the ruminal ecosystem, including proteolysis process for fiber degradation and fatty acids biohydrogenation (13,21,24). They also have the ability to hydrogenate linoleic to vaccenic acid, through enzymatic activity, linoleic acid isomerase and linoleic acid reductase, conferring specificity to the use of linoleic acid for conjugated linoleic acid formation (6). Previous research has showed that the synthesis and concentration of CLA in milk and meat from bovines may be enhanced or inhibited by factors such as the microbial composition of the rumen, animal breed, bromatologic composition of pastures and supplementation with other food rich in protein, lipids and fiber and even with some geographical conditions, such as altitude (3,12,13).

In this study, a significant increase in the vaccenic acid concentration was detected in T2 in Rusitec, this is a monounsaturated acid trans that predominates in the fat fraction of the products of ruminal origin and it originates as intermediate product, during the microbial biohydrogenation of unsaturated fatty acids (22). Its concentration is directly related with the diet supplied to animals, which is rich in linoleic, alpha-linolenic acid, protein and fiber and requires active participation of the ruminal microorganisms in charge of such process, as it is the case for ruminal bacteria *B. fibrisolvans* (6,7,13,24). Although during this study a direct quantification of CLA production was not carried out, due to the use of a ruminal simulation system *in vitro*, instead of meat and

influenciar la población de bacterias celulolíticas y *B. fibrisolvans* observada en este estudio en T2, incluyendo la suplementación de pasto de alta calidad con biomasa y harina de yuca.

El género *Butirivibrio* se puede dividir en varios grupos, correspondientes a tres biotipos diferentes, de acuerdo con su capacidad para producir algunos ácidos grasos. Tal hecho los clasifica como productores de ácido succínico y láctico, en vez de productores de butirato y acetato (6,21,22). Mrazek et al (23), identificó que los aislamientos de *Pseudobutyrvibrio ruminis* y *Butyrvibrio proteoclasticum* encontrados en el rumen bovino, producen succinato y propanoato, pero no producen butirato y acetato, en contraste a la cepa tipo de *B. fibrisolvans*, el cual produce ácidos láctico y butírico y más baja cantidad de ácidos fórmico y succínico. Las especies de este género pertenecen al grupo XIVa de la Subphylum Clostridium y toman parte en funciones importantes del ecosistema ruminal, incluyendo el proceso de proteólisis para la degradación de la fibra y en la biohidrogenación de ácidos grasos (13,21,24). Estos también tienen la habilidad para hidrogenar los ácidos vaccénico y linoleico, mediante la actividad enzimática; el ácido linoleico isomerasa y el ácido linoleico reductasa confieren especificidad al uso del ácido linoleico en la formación del ácido linoleico conjugado (CLA) (6). Investigaciones anteriores demostraron que la síntesis y la concentración del CLA en la leche y en la carne de los bovinos se pueden mejorar o inhibir por factores tales como la composición microbiológica del rumen, la raza animal, la composición bromatológica de los pastizales y la suplementación con otros alimentos ricos en proteína, lípidos y fibra e incluso con algunas condiciones geográficas, como la altitud (3,12,13).

En este estudio, en Rusitec, se detectó en T2, un incremento considerable de la concentración del ácido vaccénico; éste es un ácido monoinsaturado trans que predomina en la fracción grasosa de los productos de origen ruminal y origina un producto intermedio durante la biohidrogenación microbiana de ácidos grasos insaturados (22). Su concentración se relaciona directamente con la dieta suministrada a los animales, la cual es rica en ácidos linoleicos y alfa-linoléico, proteína y fibra y requiere activa participación de los microorganismos ruminales encargados de dicho proceso, como es el caso de la bacteria ruminal *B. fibrisolvans* (6,7,13,24). Aunque durante este estudio no se realizó una cuantificación directa de la producción del CLA (debido a la utilización del sistema de simulación ruminal *in vitro*) en carne y productos lácteos, fue posible observar que la concentración de ácido vaccénico en Rusitec, fue directamente proporcional a la densidad poblacional de *B. fibrisolvans* conforme a la suplementación del pasto kikuyo con harina

dairy products, it was possible to observe that the vaccenic acid concentration in Rusitec was directly proportional to the population density of *B. fibrisolvens* under the supplementation of kikuyu grass with cassava flour and biomass. These results suggest that the application of this type of supplementation in the field may cause a significant increase in the CLA concentration in milk and meat from bovines, if the role of vaccenic acid as one of its main originators is considered (6,24).

In a parallel study to this research, it was observed that the supplementation of kikuyu grass with cassava flour and biomass (T2) had an statistically significant effect on some digestibility indicators, such as the degradation of dry and organic matter and the production of ammonia and did not have any significant effect on the degradation of the cell wall, raw protein and gas production (13,20). The results from this study, regarding the significant increase of viable cellulolytic and *B. fibrisolvens* bacteria population density, as well as the vaccenic acid concentration in response to the supplementation of kikuyu grass with cassava flour and biomass, together with the results obtained by García et al (20), in regard of the ruminal digestibility indicators, suggest that this type of diet could enhance significantly the metabolic capacity of ruminal microorganisms and, consequently improve the energetic balance of bovines, which would result in an increase of the nutritional quality of products derived from cattle, as it is the case of milk and meat (6). It has been reported that cassava is a basic energetic food in the industry of balanced food for animals without any relevance to it being flour, flake or granular type (13). Cassava is a highly energetic compound, due to its content of dry matter, cellulose, hemicellulose, protein, starch and other polysaccharides easily fermentable (9,13). Likewise, biomass (protein-rich yeast) effluent from ethanol production, also presents high content of dry matter, protein, lignin, cellulose and hemicelluloses (9, 13).

In conclusions the results from this study, although gathered from an *in vitro* system, suggest the nutritional potential of cassava flour and biomass effluent from ethanol production, as supplements in grazing bovines feeding. However, additional field research is required to assess the effect of supplementation with cassava flour and biomass in the diet for bovines, and to analyze important indicators such as diet palatability, weight gain, milk production, as well as the *in situ* effect on the population of ruminal microorganisms, including the characterization of cellulolytic and *B. fibrisolvens* bacteria, that together, may be useful to determine whether these additives can be used in the formulation of diets for cattle.

de yuca y biomasa. Estos resultados sugieren que la aplicación de este tipo de suplementación en el campo puede causar un aumento considerable en la concentración de CLA de la leche y carne de los bovinos, si se tiene en cuenta la función del ácido vaccénico como una de las principales precursores (6,24).

En un estudio paralelo a esta investigación, se observó que la suplementación del pasto kikuyo con harina de yuca y biomasa (T2) tuvo un efecto estadísticamente significativo sobre algunos indicadores de digestibilidad, tales como la degradación de la materia orgánica y seca y en la producción de amoníaco y no tuvo efecto importante sobre la degradación de la pared celular, la proteína bruta y la producción de gas (13,20). Los resultados de este estudio, respecto al incremento significativo de la densidad poblacional de las bacterias celulolíticas viables y *B. fibrisolvens*, también como de la concentración de ácido vaccénico, en respuesta a la suplementación del pasto kikuyo con harina de yuca y biomasa y junto con los resultados obtenidos por García et al (20), en cuanto a los indicadores de digestibilidad ruminal, sugieren que este tipo de dieta podría aumentar considerablemente la capacidad metabólica de los microorganismos y, por consiguiente mejorar el balance energético de los bovinos, lo que daría lugar a un aumento de la calidad nutricional de los productos derivados del ganado, como es el caso de la leche y la carne (6). Se ha reportado que la yuca es un alimento energético básico en la industria de los alimentos balanceados para animales, sin importar si es de tipo granular, hojuela o harina (13). La yuca es un compuesto altamente energético, debido a su contenido de materia seca, celulosa, hemicelulosa, proteína, almidón y otros polisacáridos fácilmente fermentables (9,13). De igual forma, la biomasa (levadura rica en proteína) residual de la producción de etanol, también presenta un alto contenido de materia seca, proteína, lignina, celulosa y hemicelulosa (9,13).

Para concluir, los resultados de este estudio, aunque recogidos de un sistema *in vitro*, indican el potencial nutricional de la harina de yuca y de la biomasa residual de la producción del etanol, como suplementos en la alimentación de bovinos de pastoreo. Sin embargo, para evaluar el efecto de la suplementación con harina de yuca y biomasa en la dieta del ganado, se requiere una investigación de campo adicional para analizar los indicadores importantes, tales como la apetencia de la dieta, aumento de peso, producción de leche, así como el efecto *in situ* sobre la población de microorganismos ruminales, incluyendo la caracterización de las bacterias celulolíticas y *B. fibrisolvens*, que en conjunto, puede ser útil para determinar si estos aditivos se pueden utilizar en la formulación de dietas para el ganado.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Acknowledgements

We thank funding from Ministerio de Agricultura y Desarrollo rural de Colombia (MADR-code-2008D31067-3724) and CODI-Menor cuantía 2010 of Universidad de Antioquia (UdeA). CEAGRO of Universidad Nacional de Colombia sede Medellín (UNALMED), Departamento de Formación Académica de Haciendas-UdeA and the administrative and technical staff from La Montaña farm-UdeA and Paysandú farm-UNALMED.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no tienen conflicto de intereses.

Agradecimientos

Agradecemos la financiación del Ministerio de Agricultura y Desarrollo rural de Colombia (MADR-code-2008D31067-3724) y CODI-Menor cuantía 2010 de Universidad de Antioquia (UdeA). CEAGRO de Universidad Nacional de Colombia sede Medellín (UNALMED), Departamento de Formación Académica de Haciendas de la UdeA y el personal administrativo y técnico de La Montaña, finca de la UdeA y finca Paysandú UNALMED.

REFERENCES

1. Barahona R, Sanchez S. Physical and chemical limitations to the digestibility of tropical forages and strategies to overcome them. *Revista CORPOICA* 2005; 6(1):69-82.
2. Denman SE, McSweeney CS. Development of a real-time PCR assay for monitoring anaerobic fungal and cellulolytic bacterial populations within the rumen. *FEMS Microbiol Ecol* 2006; 58(3):572-582.
3. Hernandez-Sanabria E, Goonewardene LA, Wang Z, Durunna ON, Moore SS, Guan LL. Impact of feed efficiency and diet on adaptive variations in the bacterial community in the rumen fluid of cattle. *Appl Environ Microbiol* 2012; 78(4):1203-1214.
4. Or-Rashid M, Wright T, McBride B. Microbial fatty acid conversion within the rumen and the subsequent utilization of these fatty acids to improve the healthfulness of ruminant food products. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2009; 84(6):1033-1043. [10.1007/s00253-009-2169-3].
5. Belenguer A, Toral PG, Frutos P, Hervas G. Changes in the rumen bacterial community in response to sunflower oil and fish oil supplements in the diet of dairy sheep. *J Dairy Sci* 2010; 93(7):3275-3286.
6. Kaleem M, Enjalbert F, Farizon Y, Troegeler-Meynadier A. Effect of chemical form, heating, and oxidation products of linoleic acid on rumen bacterial population and activities of biohydrogenating enzymes. *J Dairy Sci* 2013; 96(11):7167-180.
7. Toral PG, Shingfield KJ, Hervás G, Toivonen V, Frutos P. Effect of fish oil and sunflower oil on rumen fermentation characteristics and fatty acid composition of digesta in ewes fed a high concentrate diet. *J Dairy Sci* 2010; 93:4804-4817.
8. Vergara -Lopez J, Araujo-Febres O. Producción, Composición Química y Degradabilidad Ruminal In Situ de *Brachiaria humidicola* (RENDLE) Schweick en el Bosque Seco Tropical. *Rev Cient (Maracaibo)*. 2006; 16(3):239-248.
9. Arroyo H, Guardia M, Flórez J. Caracterización bromatológica de materias primas y subproductos en el municipio de Quibdó, Chocó. *Revista Institucional Universitaria tecnológica del Chocó* 2007; 26(2):9-12.
10. Singh KM, Tripathi AK, Pandya PR, Pamerkar S, Rank DN, Kothari RK, et al. Use of real-time PCR technique in determination of major fibrolytic and non fibrolytic bacteria present in Indian Surti buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Pol J Microbiol* 2013; 62(2):195-200.

11. Wanapat M. Potential uses of local feed resources for ruminants. *Trop Anim Health Prod* 2009; 41(7):1035-1049.
12. McKain N, Shingfield KJ, Wallace RJ. Metabolism of conjugated linoleic acids and 18 : 1 fatty acids by ruminal bacteria: products and mechanisms. *Microbiology* 2010; 156(2):579-588.
13. Wanapat M, Kang S, Polyorach S. Development of feeding systems and strategies of supplementation to enhance rumen fermentation and ruminant production in the tropics. *J Anim Sci Biotechnol* 2013; 4(1):32.
14. Correa CHJ, Pabón RML, Carulla FJE. Valor nutricional del pasto kikuyo (*Pennisetum clandestinum* Hoechst Ex Chiov.) para la producción de leche en Colombia (Una revisión): I - Composición química y digestibilidad ruminal y posruminal. *Livestock Research for Rural Development* 2008; 20(4). <http://www.lrrd.org/lrrd20/4/corra20059.htm>
15. Ríos J, Gallego A, Vélez L, Agudelo J, Toro L, Lema A, et al. Caracterización y evaluación de agroecosistemas a escala predial. Un estudio de caso; Centro agropecuario Paysandú (Medellin, Colombia). *Revista Facultad Nacional de Agronomía* 2004; 57(2).
16. Martinez ME, Ranilla MJ, Tejido ML, Ramos S, Carro MD. Comparison of fermentation of diets of variable composition and microbial populations in the rumen of sheep and Rusitec fermenters. I. Digestibility, fermentation parameters, and microbial growth. *J Dairy Sci* 2010; 93(8):3684-3698.
17. Czerkawski JW, Breckenridge G. Design and development of a long-term rumen simulation technique (Rusitec). *Br J Nutr* 1977; 38(3):371-384.
18. Londoño FA, Fernández CJ, Molina GL, Polanco ED, Gutiérrez BL. Cuantificación de bacterias celulolíticas anaerobias provenientes del rumen de ganado bovino: comparación de tres técnicas. *Revista Hechos Microbiológicos*. 2011; 2(1):51-59.
19. Grubb JA, Dehority BA. Variation in colony counts of total viable anaerobic rumen bacteria as influenced by media and cultural methods. *Appl Environ Microbiol* 1976; 31(2):262-267.
20. García W, Giraldo L A. Composición química del destilado de yuca y su efecto sobre los parámetros de fermentación ruminal del pasto kikuyo in vitro. *Livestock Research for Rural Development* [en línea]. 2014 Diciembre 18; 26: URL disponible en: <http://www.lrrd.org/lrrd26/5/garc26086.html>.
21. Paillard D, McKain N, Chaudhary LC, Walker ND, Pizette F, Koppova I, et al. Relation between phylogenetic position, lipid metabolism and butyrate production by different *Butyrivibrio*-like bacteria from the rumen. *Antonie van Leeuwenhoek* 2007; 91(4):417-422.
22. Wallace RJ, McKain N, Shingfield KJ, Devillard E. Isomers of conjugated linoleic acids are synthesized via different mechanisms in ruminal digesta and bacteria. *J Lipid Res* 2007; 48(10):2247-2254.
23. Mrazek J, Tepsic K, Avgustin G, Kopecny J. Diet-dependent shifts in ruminal butyrate-producing bacteria. *Folia Microbiol (Praha)* 2006; 51(4):294-298.
24. Zhao XH, Liu CJ, Liu Y, Li CY, Yao JH. Effects of replacing dietary starch with neutral detergent-soluble fibre on ruminal fermentation, microbial synthesis and populations of ruminal cellulolytic bacteria using the rumen simulation technique (RUSITEC). *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 2012; 97(6):1161-1169.