

**Caracterización de la densidad poblacional de bacterias celulolíticas y de *Butyrivibrio fibrisolvens*, al suplementar dietas forrajeras (*Pennisetum clandestinum*) con harina de yuca y biomasa efluente de la producción de etanol en el simulador de rumen- Rusitec**

**Licet Paola Molina Guzmán**

**Universidad de Antioquia  
Escuela de Microbiología  
Medellín, Colombia  
2011**

**Caracterización de la densidad poblacional de bacterias celulolíticas y de *Butyrivibrio fibrisolvens*, al suplementar dietas forrajeras (*Pennisetum clandestinum*) con harina de yuca y biomasa efluente de la producción de etanol en el simulador de rumen - Rusitec**

**Licet Paola Molina Guzmán**

**Tesis para optar al título de Magister en Microbiología y Bioanálisis  
Énfasis en Microbiología Veterinaria**

**Tutora de tesis:**

**Lina Andrea Gutiérrez Builes, PhD**

**Miembros del Comité tutorial:**

**Judy Natalia Jiménez Q, MSc, PhD(c)**

**Mario A. Zapata, MSc, PhD(e)**

**Universidad de Antioquia**

**Escuela de Microbiología**

**Medellín, Colombia**

**2011**

# **Caracterización de la densidad poblacional de bacterias celulolíticas y de *Butyrivibrio fibrisolvens*, al suplementar dietas forrajeras (*Pennisetum clandestinum*) con harina de yuca y biomasa efluente de la producción de etanol en el simulador de rumen- Rusitec**

Licet Paola Molina Guzmán<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Estudiante de maestría, Grupo de Investigación en Microbiología Veterinaria, Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia, Calle 67 Número 53 – 108 Bloque 5-437, Medellín, Colombia.

## **RESUMEN**

La producción ganadera en regiones tropicales como Colombia, se basa principalmente en el suministro de forrajes para la alimentación animal. La degradación del material lignocelulósico contenido en los forrajes está a cargo del consorcio microbiano ruminal, en el cual las bacterias celulolíticas participan en la degradación de los carbohidratos estructurales hasta ácidos grasos volátiles asimilables por el rumiante, lo que sugiere que estos microorganismos tienen un potencial metabólico con alta capacidad para aprovechar diferentes sustratos. El estudio de los microorganismos ruminales involucrados en el metabolismo de los ácidos grasos insaturados es de gran importancia y utilidad debido al efecto positivo que tienen este tipo de compuestos sobre la salud humana, específicamente el ácido linoléico conjugado contenido en la carne, leche y demás productos alimenticios derivados de la industria ganadera que han mostrado actividad anticancerígena, antidiapogénica y antidiabética. La dieta, la variación individual, el flujo de ácido vaccénico desde el rumen, y la actividad de la  $\Delta 9$ -desaturasa en glándula mamaria, han sido implicados como factores que influyen en la concentración final del ácido linoléico conjugado en la carne y la leche proveniente de los rumiantes. En la búsqueda de suplementos alimenticios que contribuyan al mejoramiento de los procesos de digestión y utilización de los forrajes por parte de los bovinos, se ha propuesto que la harina de yuca y la biomasa, como residuo de la producción de biocombustibles, podrían constituirse en suplementos de los forrajes y en una fuente rica de proteína y energía para el rumiante. Considerando la participación de las bacterias celulolíticas ruminales, y específicamente de *Butyrivibrio fibrisolvens*, en el proceso de biohidrogenación y demás procesos de la fermentación ruminal, el objetivo de este estudio fue caracterizar aislamientos nativos de *B. fibrisolvens*, determinar la densidad poblacional de bacterias celulolíticas, de *B. fibrisolvens* y la concentración de ácido vaccénico, al suplementar dietas basadas en pasto kikuyo (*Pennisetum clandestinum* Hoechst Ex Chiov.), con harina de yuca y biomasa efluente de la producción de etanol en el simulador de Rumen -

Rusitec. Se caracterizaron dos aislamientos nativos de bacterias ruminales identificados como *B. fibrisolvens* y se evaluaron cuatro tratamientos (T) con la siguiente composición: T1/Control 1: 100% pasto Kikuyo con un aporte total de 23,9% de proteína, T2: una mezcla constituida por 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% 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. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.005$ ) en la densidad poblacional de bacterias celulíticas viables (UFC/ml) y de *B. fibrisolvens* (células/ml) con el tratamiento T2, con respecto a los tratamientos T1, T3 y T4. Adicionalmente, se detectó un aumento significativo ( $p < 0.005$ ) en la concentración de ácido vaccénico (mg/L) en el contenido ruminal del Rusitec con el mismo tratamiento (T2). 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 celulíticas ruminales y de *B. fibrisolvens*, 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.

## INTRODUCCIÓN

La producción ganadera en regiones tropicales como Colombia, se basa principalmente en el suministro de forrajes para la alimentación animal (1). La degradación del material lignocelulósico contenido en los forrajes está a cargo del consorcio microbiano ruminal, específicamente, las bacterias celulíticas participan en la degradación de los carbohidratos estructurales hasta ácidos grasos volátiles asimilables por el rumiante, lo que sugiere que estos microorganismos tienen un potencial metabólico con alta capacidad para aprovechar diferentes sustratos (2). La biodiversidad (riqueza y abundancia) de especies microbianas que habitan el ecosistema ruminal está influenciada por múltiples factores, tanto intrínsecos al ecosistema ruminal como externos a este. Entre los factores internos se destacan la temperatura del rumen, el pH, el potencial redox, la capacidad de amortiguación del contenido del rumen y la presión osmótica, y entre los factores externos esta la frecuencia de alimentación y edad del animal, condiciones geográficas y ambientales además del tipo de

dieta consumida, siendo este ultimo uno de los factores que influye principalmente en la biodiversidad de la microbiota ruminal (2-4).

*Butyrivibrio fibrisolvens* es una bacteria ruminal anaerobia estricta, con alta actividad celulolítica, hemicelulolítica, proteolítica y urolítica, representa una porción significativa (10-30%) de las bacterias ruminales cultivables (5). Esta bacteria cumple un papel central en la degradación de la fibra, ha sido identificada como la principal especie bacteriana que participa en el proceso de biohidrogenación de los ácidos grasos insaturados contenidos en las dietas basadas en forrajes, granos y aceites (6), proceso que conlleva al incremento de la concentración de ácidos grasos en la leche y la carne proveniente de los rumiantes (7). El Acido Linoléico Conjugado (ALC), por ejemplo, es uno de los ácidos grasos derivados del proceso de biohidrogenación, al cual se le atribuyen diversos efectos benéficos en la salud humana (5, 6, 9), como actividad anticancerígena, antiadiapogénica y antidiabética (10). El ALC se encuentra en una proporción muy pequeña en los granos y en el forraje y es en el ambiente reductor del rumen donde se da inicio a su síntesis, mediante la transformación (hidrogenación) del ácido linoléico en ácido vaccénico y ácido ruménico, principalmente (9). En este sentido, la bacteria *Butyrivibrio fibrisolvens* está involucrada de manera significativa en la hidrogenación del ácido linoléico, al participar en el proceso que da origen al ácido vaccénico como uno de los precursores principales del ALC (8, 9). Posterior al metabolismo ruminal, el ácido vaccénico (trans-11C18:1) puede ser desaturado en el carbono 9 por las enzimas desaturasas de la glándula mamaria, intestinales y/o hepáticas de los rumiantes, transformándose en ALC (forma 9c-11t) (10).

La calidad nutricional de algunos pastos disponibles en diferentes regiones de Colombia, es generalmente baja y su producción es estacional, lo que disminuye el rendimiento y calidad en la obtención de la carne y leche como productos derivados de la ganadería (11). Algunos estudios han sugerido que la suplementación de las dietas mejora la utilización de los forrajes con alto contenido en fibra y baja digestibilidad, potencia la biodiversidad de los microorganismos ruminales, los procesos de fermentación ruminal, y por ende, la productividad de los animales (6, 7). En la búsqueda de suplementos alimenticios como una alternativa para el mejoramiento de los procesos de digestión y degradación de los forrajes por parte de los bovinos, se han propuesto varias alternativas de suplementación de los pastos,

principalmente con carbohidratos fermentables y aditivos tales como aceites, alimento concentrado y granos (12).

En el año 2008 y con el apoyo del Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural de Colombia, se creó en el país el Programa Nacional de Alcoholes Carburantes, con el propósito de evaluar la factibilidad de la producción de etanol a partir de la caña de azúcar y otras fuentes agrícolas como banano, yuca y sorgo, con el fin de mejorar la calidad de las gasolinas mediante la oxigenación biológica y la sustitución de compuestos como el éter metil tert butílico, debido a la contaminación del suelo y agua subterránea que genera su uso (13,15). En este sentido, la yuca (*Manihot esculenta* Crantz) ha sido considerada como una de las alternativas potenciales para la producción de etanol que junto con el maíz, la caña de azúcar y el arroz, constituyen las fuentes de energía más importantes en las regiones tropicales del mundo, convirtiéndose en uno de los cultivos alternativos con mayor potencial para la producción de etanol (17). Del proceso de producción de etanol se derivan algunos subproductos, como la biomasa (levaduras ricas en proteína), para la cual es pertinente buscar una disposición final que sea amigable con el ambiente e incluso útil para otros sistemas de producción del país. Una de las líneas estratégicas de investigación del Programa Nacional de Alcoholes Carburantes, ha sido el diseño y optimización de dietas alimenticias para bovinos, basadas en el uso de algunos de los subproductos de la industria de los biocombustibles, con el fin de incrementar la productividad y mejorar la calidad composicional de la leche y carne bovina. La yuca ha sido considerada un alimento energético básico en gran parte de la industria de alimentos balanceados para animales, por su contenido de proteína y almidón (15, 16). En consideración, se ha propuesto que la harina de yuca y la biomasa proveniente de la producción de etanol podrían constituirse en una estrategia adecuada de suplementación de pastos en situaciones en que las praderas son insuficientes para lograr niveles aceptables de producción, y como una fuente adicional de proteína y energía para los bovinos (17). El pasto kikuyo (*Pennisetum clandestinum* Hoechst Ex Chiov.) se ha constituido en la base de la alimentación de los sistemas de producción lechera especializada en Colombia (20). Esta gramínea tiene un crecimiento agresivo evitando la invasión por parte de otras especies forrajeras, es resistente al pisoteo y responde positivamente a la fertilización orgánica, está distribuida ampliamente en la región Andina del país y es reconocida fácilmente por técnicos y productores (21). Considerando que la calidad del forraje disminuye a mayor edad de la planta, donde se incrementa la porción fibrosa, disminuye el contenido de proteínas, la

digestibilidad y la disponibilidad de energía para el animal, siendo necesario la evaluación de diferentes alternativas de suplementación energética que aporten a la nutrición del animal (18, 19), es posible que la suplementación de forrajes como el Kikuyo, ampliamente usado y aceptado en la industria ganadera, podría potenciar aún más el proceso de biohidrogenación ruminal, con la formación subsecuente de los principales componentes del ALC: ácido ruménico (cis-9, trans-11) y ácido vaccénico (trans-11C18:1).

Considerando la participación de las bacterias celulolíticas ruminales en la degradación de la fibra y otros polímeros insolubles vegetales no degradados por el animal hasta la producción de ácidos grasos volátiles (acético, láctico, propiónico y butírico) como la principal fuente de energía para las células, así como la participación de *B. fibrisolvens* en el proceso de biohidrogenación para la producción de ALC como indicadores importantes de la fermentación ruminal, el objetivo de este estudio fue caracterizar aislamientos nativos de *B. fibrisolvens* y la densidad poblacional de bacterias celulolíticas, de *B. fibrisolvens* y la concentración de ácido vaccénico, en respuesta a la suplementación de dietas forrajeras (*Pennisetum clandestinum* Hoechst Ex Chiov.), con harina de yuca y biomasa efluente de la producción de etanol en un simulador de la fermentación ruminal (Rusitec).

## **MATERIALES Y METODOS**

**Aspectos éticos del estudio.** Este estudio contó con el aval del Comité de Ética en experimentación con animales de la Universidad Nacional de Colombia sede Medellín, acta código CEMED-07 del 2 de diciembre del 2008, que verificó la protección del medio ambiente y de los bovinos canulados con propósito experimental.

**Simulación de la fermentación ruminal (Rusitec), cuantificación de bacterias celulolíticas viables y de *Butyrivibrio fibrisolvens*.**

**Tipo de estudio:** experimental comparativo por tratamientos.

**-Inoculo de microorganismos ruminales.** Como inoculo inicial para la puesta en marcha del Simulador de la fermentación ruminal (Rusitec), se empleó contenido ruminal proveniente de cuatro vacas hembras de raza Holstein ( $700 \pm 25$  kg peso vivo) fistuladas al rumen, alimentadas con una dieta basal de pasto kikuyo (*Pennisetum clandestinum* Hoechst Ex Chiov.) y mantenidas en la finca Paysandú de la Universidad Nacional de Colombia sede

Medellín, ubicada en el corregimiento de Santa Elena, a una altura de 2500 m.s.n.m. y una temperatura promedio de 14°C (22). El Rusitec está compuesto por ocho vasos secuenciales (fermentadores), con una capacidad máxima de 700 ml (23). Los experimentos de simulación de la fermentación ruminal fueron realizados en el laboratorio del Grupo de Biotecnología Ruminal y Silvopastoreo - BIORUM de la Universidad Nacional, de acuerdo a los protocolos propuestos por Czerkawski *et al*, (23). Para la puesta en marcha del Rusitec, en cada fermentador se depositó lo siguiente: 200 ml de saliva artificial (pH= 8,4, 9,8 g de NaHCO<sub>3</sub>, 3,72g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,47 g de NaCl, 0,57 g de KCl, 0,053g de CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O y 0,128 g de MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O de cada componente por litro), 500 ml de fluido ruminal y una porción sólida de contenido ruminal (80 gr), estas fracciones fueron obtenidas de manera separada después de la filtración usando cuatro capas de tela muselina, esto para garantizar la inclusión de los microorganismos presentes tanto en la fracción líquida como solida del contenido ruminal, todo el experimento se realizó a una temperatura constante de 39°C. El procedimiento de simulación de la fermentación ruminal se realizó en dos periodos de siete días distribuidos así: un período de adaptación de cuatro días y un periodo de medición de tres días (quinto al séptimo día de simulación).

**-Tratamientos a evaluar en el Rusitec.** El pasto kikuyo (*Pennisetum clandestinum* Hoechst Ex Chiov) fue la especie forrajera seleccionada para evaluar el efecto de la suplementación con harina de yuca y biomasa proveniente de la producción de etanol, sobre la densidad poblacional de bacterias celulolíticas y de *B. fibrisolvens*, en el sistema de simulación ruminal Rusitec. El pasto kikuyo fue obtenido en el municipio de San Pedro de los Milagros, con una edad de rebrote de 35 días, manejado bajo fertilización nitrogenada con urea; se incluyeron dos tipos de kikuyo de calidad nutritiva contrastante de acuerdo con el contenido de proteína, clasificándose de buena y baja calidad, para evaluar la respuesta a la suplementación con biomasa y harina de yuca. La cantidad de pasto Kikuyo mas el sustrato evaluado en cada fermentador fue de 18 gr. (10,3 – 15,5 g de materia seca). El pasto con un tamaño de partícula de 1,5 mm se depositó en bolsas de nylon con un tamaño de poro de 45 µm. Para evitar diluir los productos de la fermentación en el sistema, se establecieron tasas de dilución de 3,5%/hora (24). La evaluación de los tratamientos en el Rusitec fue de la siguiente manera: en el día cero del experimento se inició con una prueba en el fermentador Rusitec con 8 vasijas de fermentación (2 vasijas por tratamiento), una vez fue agregado a cada vasija el líquido ruminal y la saliva artificial, en cada vasija se introdujo una bolsa de nylon que



contenía 18 g del tratamiento correspondiente a evaluar y una bolsa de nailon con contenido ruminal (80 g), y esta última bolsa se retiró a las 48 horas de iniciada la incubación. En los días siguientes (1 al 7) la bolsa que había permanecido dos días en cada fermentador fue sustituida por una nueva bolsa con sustrato cada 24 horas. Durante los días 5, 6 y 7 se recolectó líquido ruminal de cada vasija de fermentación antes de cambiar la bolsa con el sustrato, para la cuantificación de microorganismos ruminales, la determinación de ácido vaccénico y la medición inmediata del pH. Se realizaron dos réplicas del experimento de simulación en dos momentos diferentes, con un intervalo de tiempo entre las réplicas de 15 días manteniendo las mismas condiciones entre ellas, esto para estimar de manera más precisa el efecto de la suplementación del Kikuyo sobre la población microbiana a evaluar. Los tratamientos evaluados fueron: T1/Control 1: 100% pasto Kikuyo con un aporte total de 23,9% de proteína, T2: una mezcla constituida por 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% proteína y T4: 70% pasto Kikuyo 20% biomasa y 10% harina de yuca con un aporte total de 15,3% de proteína (Tabla 1 y 2).

**-Procedimiento de muestreo para la cuantificación de bacterias celulolíticas viables y de *B. fibrisolvens*.** De la mezcla resultante del contenido ruminal recolectado de las cuatro vacas hembras de raza Holstein, se tomaron 35 ml para realizar el aislamiento de cepas nativas de *B. fibrisolvens* y determinar la cantidad inicial de bacterias celulolíticas, de *B. fibrisolvens* y la concentración inicial de ácido vaccénico, contenidas en el inoculo inicial. Luego del periodo de adaptación del sistema, durante los tres días de muestreo, se extrajo de cada fermentador y cada 24 horas dos alícuotas de líquido ruminal: 15 ml para realizar la medición del pH y los procedimientos de cuantificación de bacterias celulolíticas, y 20 ml que fueron almacenados a -20°C con dos propósitos: la extracción de ADN para la cuantificación de *B. fibrisolvens* mediante qPCR en tiempo real y la medición del ácido graso vaccénico mediante cromatografía de gases usando un cromatógrafo gaseoso de la marca Agilent 6890, en una columna: DB-23, capilar de 50.0 m con diámetro interno de 0.25 mm, un espesor de película de 1.4 µm, temperatura del detector de 280 °C y temperatura del Inyector de 250 °C, inyección de Hidrógeno (gas portador): 40 m/seg, detector Flujo de H<sub>2</sub> = 45 mL/min y Flujo de aire = 450 mL/min.

**-Cuantificación de bacterias celulolíticas viables.** A partir de 1 ml de la muestra tomada del inoculo inicial y de cada fermentador, durante el periodo de muestreo, se

realizaron diluciones seriadas (hasta  $10^{-6}$ ) por triplicado en medio de dilución (sales de fosfato y minerales, Resarzurina, Carbonato de calcio y L-cisteina HCL). De las diluciones  $10^{-3}$  a  $10^{-6}$  se tomó 1 ml y se adicionó en medios sólidos pre-reducidos preparados con la técnica del tubo rodado o *Roll tube* (25). Los medios de cultivo contenían fluido ruminal clarificado al 40%, celubiosa al 0,1% y extracto de levadura al 0,25%, y demás componentes recomendados por Grubb and Dehoroty (26). Para la formación de la película de medio solido en los tubos de cultivo, se adicionó agar a una concentración final de 1,5% (26), y el procedimiento de siembra se realizó en condiciones de anaerobiosis mantenidas por medio de la inoculación de la muestra a través del tapón de caucho del tubo herméticamente cerrado usando una jeringa gasificada con  $N_2$ . El recuento bacteriano se realizó en un estéreomicroscopio (Olympus SZ61, California, USA) después de 72 horas de incubación a  $39^{\circ}C$  y los resultados fueron expresados como Unidades Formadoras de Colonia (UFC/ml).

**-Caracterización morfológica, funcional y molecular de las cepas nativas de *B. fibrisolvens* aisladas a partir del inóculo inicial.**

Para la caracterización morfológica, funcional y molecular de las cepas nativas se empleó la cepa de referencia de *Butyrivibrio fibrisolvens* ATCC (American Type Culture Collection) #19171. Los medios de cultivo para *B. fibrisolvens* se prepararon con glucosa, maltosa y almidón soluble cada uno al 0.05%, se suplementaron con fluido ruminal clarificado al 30% y se ajustaron a un pH de 6.9. Este microorganismo se cultivó a  $39^{\circ}C$  en condiciones anaerobias en atmosfera de  $CO_2$  usando una cámara BACTRON II (Sheldon Manufacturing Inc., OR, USA). Para garantizar la viabilidad de la cepa de referencia y de los aislamientos nativos se preservaron varias alícuotas congeladas a  $-80^{\circ}C$  con medio líquido suplementado con fluido ruminal clarificado (40%) y glicerol (17%).

Se evaluaron las colonias obtenidas en medio sólido a partir del inóculo inicial, mediante la observación directa de cada colonia en un estéreomicroscopio (Olympus SZ61, CA, USA), adicionalmente se realizó tinción de Gram con modificación de Koppelof (27) para la descripción microscópica de las células en el microscopio (Nikon-Eclipse E200, MA, USA). A partir de cultivo puro en medio líquido se evaluó la fermentación de los siguientes sustratos: xilosa, celubiosa, maltosa, glucosa, esculina, lactosa, caseína, gelatina, citrato, almidón, y se determinó la producción de ácido sulfúrico, indol, movilidad y gas, así como el requerimiento de fluido ruminal, según lo descrito por Dehoroty para algunas bacterias

ruminales (28). Adicionalmente como evidencia para la identificación de las cepas nativas de *B. fibrisolvans*, se realizó la determinación de los productos finales de la fermentación de ácidos grasos volátiles, fórmico, láctico, butírico, propiónico y succinato mediante cromatografía en capa fina (29) con el método Silica Gel HR, extra puro (E. Merck AG, Darmstadt, Alemania), el solvente usado fue dietil éter-hexano (1:1). Los compuestos fueron detectados como puntos oscuros en las placas e irradiados con luz ultravioleta, posteriormente se calcularon los valores del factor de retención ( $R_f$ ) de cada compuesto por comparación con los valores de  $R_f$  de la cepa control ATCC #19171 (29)

Para la caracterización molecular de los aislamientos nativos, se tomaron los cultivos puros correspondientes a las cepas con características morfológicas y funcionales compatibles con *B. fibrisolvans*. Se realizó la extracción del ADN usando el estuche comercial DNeasy® Blood & Tissue (QIAGEN, MD, USA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR convencional) se amplificó la secuencia nucleotídica parcial del gen ARNr 16S (246 pb). Los cebadores usados para la amplificación del gen ARNr 16S de *B. fibrisolvans* fueron los descritos por Balamurugan *et al.* (30). En cada procedimiento de PCR se utilizó como control positivo de la amplificación el ADN extraído de la cepa de referencia ATCC #19171. Se optimizaron las condiciones de PCR mediante el análisis de un gradiente de temperatura (52-58°C) en un Termociclador convencional (BIO-RAD, CA, USA).

Cada reacción de PCR se realizó en un volumen final de 25  $\mu$ l con Buffer 1x, 1.5 mM de  $MgCl_2$ , 0.5  $\mu$ M de cada cebador, 0.65 U de Taq DNA polimerasa (Bioline, MA, USA), 0.2 mM de dNTPs y 50 ng del ADN genómico. Los ciclos de amplificación incluyeron la desnaturalización inicial a 94°C durante 3 minutos, y la repetición 30 veces del ciclo de amplificación (94 °C -30 s, 55 °C-30 s y 72 °C-30 s) con un ciclo de extensión final a 72°C durante 3 min. Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñidos con EZvision™ Dye como agente intercalante (AMRESCO Inc. OH, USA) y visualizados en un fotodocumentador Gel Doc 2000 system (BIORAD, CA, USA). Los productos obtenidos de la amplificación fueron enviados a la empresa MACROGEN (Rockville, MD, USA) para su purificación y secuenciación bidireccional.

Las secuencias de ADN fueron editadas, ensambladas y alineadas usando el programa Geneious Pro 5.4.4 (31). Desde el programa Geneious se realizó un análisis BLASTn (NCBI,

GenBank) y los análisis filogenéticos, máxima verosimilitud e inferencia bayesiana, usando las secuencias obtenidas de los aislamientos nativos y secuencias reportadas en el GenBank para cepas de referencia de los géneros *Butyrivibrio* y *Pseudobutyrvibrio* provenientes de diferentes estudios (Tabla 3). Los análisis de máxima verosimilitud fueron llevados a cabo usando el programa PAUP 4.0b10 (32) con el modelo evolutivo seleccionado con el programa ModelTest 1.2.1 (33) bajo el criterio AIC (Akaike information criterion). El modelo seleccionado fue implementado en el archivo de entrada para PAUP 4.0b10, con una búsqueda heurística de la topología y el algoritmo TBR para intercambiar las ramas y finalmente generar un árbol consenso a partir de 1000 replicas (Bootstrapping). El análisis de las relaciones filogenéticas mediante inferencia bayesiana (34) fue realizado en el programa MrBayes (35) usando el modelo evolutivo específico para el conjunto de secuencias parciales ARNr 16S incluidas en el análisis. El número de generaciones fue de 1100000 con dos ejecuciones simultáneas y 8 cadenas, representando 2751 muestras analizadas de la distribución de probabilidades *a posteriori*.

**-Cuantificación de *B. fibrisolvens* mediante qPCR en tiempo real.** La curva estándar para la cuantificación de *B. fibrisolvens* mediante qPCR en tiempo real se realizó con la cepa de referencia ATCC #19171 mantenida en cultivo axénico ( $10^8$  células/ml). El número de células en el cultivo después de 24 horas fue estimado mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 640 nm en el equipo Espectronic Genesys 2 (Cienytec, FL, USA), se tomó 1 ml del cultivo para centrifugación y se realizó la extracción del ADN usando el estuche comercial DNeasy® Blood & Tissue (QIAGEN, MD, USA). Se realizó la dilución seriada ( $10^{-1}$  a  $10^{-6}$ ) del ADN extraído de la cepa de referencia y se incluyeron estas diluciones para la construcción de la curva estándar específica para la cuantificación de *B. fibrisolvens* mediante qPCR en tiempo real en las muestras de rumen obtenidas del sistema Rusitec. La curva fue generada al considerar los valores del ciclo umbral ( $C_t$ ) observados en 35 ciclos versus el logaritmo del número de células por mililitro, a partir de las seis diluciones del ADN de cultivo puro de concentración conocida. El protocolo de qPCR en tiempo real utilizado en este estudio fue validado mediante el análisis de dos controles internos, ADN genómico de la cepa de referencia ATCC #19171 (control 1) y ADN de la cepa de referencia ATCC #19171 adicionado a 1 ml contenido ruminal y sometido al protocolo de extracción (control 2). La amplificación de ambos controles fue comparada en reacciones separadas y múltiples, para determinar la eficiencia y especificidad del método y descartar la presencia de

inhibidores en las muestras de contenido ruminal (36). A partir de las muestras mantenidas a -20°C, recolectadas del inoculo inicial y de cada fermentador del Rusitec durante el periodo de muestreo, se realizó la extracción de ADN genómico usando el estuche comercial DNeasy® Blood & Tissue (QIAGEN, MD, USA). Se evaluó la calidad y concentración del ADN extraído por medio de espectrofotometría (NanoDrop ND 1000 Spectrophotometer, Thermo Scientific Wilmington, DE) y se analizó una cantidad de 80 ng del ADN extraído de cada muestra.

La cuantificación por PCR en tiempo real se realizó en el equipo Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR system (Applied Biosystems, CA, USA). Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un volumen final de 25 µl, que contenía: 12,5 µl de SYBR® Green (QIAGEN, MD, USA) y 05 µM de cada cebador para la amplificación del gen ARNr 16S. Después de una desnaturalización de 15 minutos a 95 °C, el programa de amplificación y cuantificación fue repetido 35 veces (30 s a 94 °C, 30 s a 55 °C y 30 s a 72 °C), seguido por el análisis de la curva de fusión (46°C - 95°C con incremento de la temperatura de 3 C por minuto y la medición continua de la fluorescencia). El ciclo umbral (Ct) fue calculado automáticamente por el equipo (Software v 2.0, Applied Biosystems, CA, USA). La amplificación de una muestra fue considerada como negativa cuando el valor de Ct fue menor de 8 y mayor de 35 o cuando no se obtuvo ninguna curva de amplificación. Se repitió la reacción de amplificación para todas las muestras con valores de Ct mayores a 35. En cada protocolo de amplificación se incluyó un control negativo (sin ADN molde), seis controles positivos por triplicado que correspondían a ADN de concentración conocida (pertenecientes a la curva estándar), y el ADN de los controles internos. Los resultados fueron reportados en términos de número de células por mililitro (células/ml). La Eficiencia (E) de la PCR en tiempo real fue calculada a partir de la pendiente arrojada por el software Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR v 2.0, durante la fase exponencial en cada ciclo de acuerdo con la ecuación  $E=10^{(-1/\text{pendiente})}$ . Los productos de la amplificación resultante en la qPCR en tiempo real fueron verificados por electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñidos con EZvision™ Dye (AMRESCO Inc. OH, USA).

**Análisis estadístico.** Los datos de la densidad poblacional de bacterias celulolíticas (UFC/ml) y de *B. fibrisolvens* (células/ml) en el periodo de muestreo, en respuesta a la suplementación del pasto Kikuyo con harina de yuca y biomasa efluente de la producción de etanol en el

Rusitec, fueron examinados mediante un análisis de varianza (ANOVA) de una y dos vías previo cumplimiento de los supuestos de normalidad bivariada y homoscedasticidad, adicionalmente se realizó una análisis de medidas repetidas en el tiempo usando el estadístico de Friedman y Wilcoxon, se determinó el coeficiente de correlación de Pearson para medir el grado de relación entre la concentración de ácido vaccénico respecto a la densidad poblacional de *B. fibrisolvens*, usando el paquete estadístico SPSS v19 para Windows (SPSS Inc., Chicago, USA).

## RESULTADOS

**Densidad poblacional de bacterias celulolíticas viables y pH en el sistema Rusitec.** El número de UFC/ml obtenidas del inoculo inicial usado para la puesta en marcha del simulador de la fermentación ruminal fue de  $7.5 \times 10^5$  UFC/ml. El análisis del número de UFC/ml de bacterias celulolíticas entre los distintos tratamientos presentó diferencias estadísticamente significativas ( $p=0.03$ ), se obtuvo crecimiento constante de la población microbiana en los días cinco y seis del periodo de muestreo bajo los tratamientos T1, T2 y T4 ( $19,23 \times 10^5$  UFC/ml en promedio), en comparación con la población de bacterias celulolíticas en crecimiento en el tratamiento T3, donde la media del recuento fue menor con respecto a los demás tratamientos ( $1,5 \times 10^5$  UFC/ml en promedio) en el día seis de medición. Al evaluar el crecimiento de la población al séptimo día durante el periodo de muestreo, se encontró una mayor ( $p=0.0001$ ) población de bacterias celulolíticas viables bajo el tratamiento T2, en comparación con el tratamiento T1 (constituido por pasto de buena calidad) y con el tratamiento T4 (constituido por la mezcla de pasto de baja calidad más biomasa y harina de yuca). Respecto al crecimiento de la población de bacterias celulolíticas en el tratamiento T3, se evidenció crecimiento de la población, pero no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p>0.005$ ) en comparación con los demás tratamientos y, se observó una disminución estadísticamente significativa ( $p= 0.003$ ) de la población en comparación con los tratamientos T1 y T4 en el día séptimo de medición (Figura 1). Al realizar las comparaciones pareadas de los promedios de los recuentos de bacterias celulolíticas viables y de *B. fibrisolvens* en conjunto se obtuvo diferencias estadísticamente significativas ( $p< 0.05$ ) entre los días de medición de la densidad poblacional, y al hacer la comparación de las medidas por pares, se obtuvo diferencias estadísticamente significativas ( $p< 0.05$ ) en la densidad

poblacional tanto de las bacterias celulolíticas viables como de *B. fibrisolvans* en el día 7 en comparación con los días 5 y 6 de medición, donde el promedio del recuento fue menor al hallado en el día 7. El pH del contenido ruminal en los diferentes fermentadores del Rusitec no varió significativamente ( $p=0.165$ ) durante los tres días de muestreo, sin embargo, se observó una disminución estadísticamente significativa ( $p<0.05$ ) en el pH observado en el Rusitec (~pH 6,8) respecto al valor de pH que presentaba el inoculo inicial de fluido ruminal (pH 8,4).

#### **Caracterización de cepas nativas de *B. fibrisolvans* aisladas a partir del inoculo inicial.**

Las características morfológicas y el perfil de fermentación de los dos aislamientos nativos de *B. fibrisolvans* obtenidos en este estudio, se muestran en la Tabla 4. Las cepas nativas son, bacilos ligeramente curvos, móviles, Gram variables con crecimiento en cultivo anaerobio estricto a una temperatura entre 37°C y 39 °C. Ambos aislamientos fermentan esculina, glucosa, maltosa, celubiosa y xilano, hidrolizan el almidón, reducen el citrato, no producen ácido sulfúrico, indol y ninguna presenta licuefacción de gelatina, y tienen requerimiento de fluido ruminal clarificado. La cepa nativa ruminal 1 no fermenta la lactosa y caseína, caso contrario ocurrió con la cepa nativa ruminal 2 la cual si aprovecha estos sustratos. En la cuantificación de los productos finales de la fermentación de la glucosa por parte de ambos aislamientos nativos, se encontró que presentan formación de ácido butírico, láctico y propiónico con mayor factor de retención (0,7, 0,85 y 0,9 respectivamente) en comparación con los ácidos fórmico y succínico (0,4 y 0,8 respectivamente). Este resultado concordó con el patrón de fermentación de ácidos estimado para la cepa de referencia de *B. fibrisolvans* ATCC #19171 (Figura 2).

El análisis BLASTn y Megablast de las secuencias nucleotídicas parciales obtenidas del gen ARNr 16S para las dos cepas nativas aisladas a partir del inoculo inicial de contenido ruminal, mostró entre 92-98% de identidad con bacterias incultivables del rumen. No obstante, al realizar el análisis BLASTn especificando en la base de datos GenBank que *B. fibrisolvans* fue el microorganismo del cual provienen las secuencias, se encontró entre 84-93% de identidad con diferentes cepas de *B. fibrisolvans*, como la cepa con código de acceso AY699276 (incluida en los análisis filogenéticos). Los resultados del análisis de máxima verosimilitud (MV, Figura 3) e inferencia bayesiana (Figura 4) basados en las secuencias parciales del gen ARNr 16S (Tabla 3) muestran dos grupos principales con alto soporte en las

ramas. Uno de los grupos incluyó las secuencias de las bacterias ruminales nativas obtenidas en este trabajo, la secuencia de la cepa de referencia ATCC #19171 y varias de las secuencias analizadas de bacterias del género *Butyrivibrio* (MV Bootstrap: 88.8%, IB probabilidad *a posteriori* de 0.99), mientras que el segundo grupo incluyó de manera predominante las secuencias de las cepas pertenecientes al género *Pseudobutyrvibrio*.

**Cuantificación de *B. fibrisolvens* mediante qPCR en tiempo real.** La especificidad de la amplificación de la secuencia parcial del gen ARNr 16S mediante qPCR en tiempo real fue evaluada por electroforesis en gel de agarosa al 1% donde se observó una única banda con un tamaño de 246 pb acorde con el tamaño esperado para la cepa de referencia ATCC #19171 (Figura 5). Adicionalmente, el análisis de la curva de fusión obtenida en el equipo Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR system mostró una curva específica y definida para cada producto de PCR, sin la formación de dímeros de los cebadores (Figura 6). Se observó alta eficiencia en la amplificación de las muestras analizadas mediante qPCR en tiempo real con valores de eficiencia en el rango de 1.76 a 2, a partir de 80 ng de ADN genómico y alta linealidad entre los resultados obtenidos de la pendiente de cada muestra (Coeficiente de correlación de Pearson,  $r > 0.9$ ). La precisión intra-ensayo de la qPCR en tiempo real fue alta con un coeficiente de variación de 4% estimado mediante el promedio de los datos de Ct en cada ciclo de tres repeticiones de todas las muestras de la curva bajo un mismo experimento. De la misma manera, la reproducibilidad de la qPCR en tiempo real de las muestras evaluadas en tres experimentos realizados en fechas diferentes mostró un coeficiente de variación del 12%. La curva estándar generada para la cuantificación de *B. fibrisolvens* mediante qPCR en tiempo real presentó una relación lineal (coeficiente de relación del 98%) con una eficiencia del 1,84 para los seis puntos incluidos en la curva estándar (Figura 7).

La densidad poblacional de *B. fibrisolvens* obtenida a partir del inóculo inicial para la cuantificación por qPCR en tiempo real, fue de  $4,94 \times 10^6$  células/ml. La densidad de *B. fibrisolvens*, durante los tres días de muestreo fue de  $9,19 \times 10^6$  células/ml (media  $\pm$  ESM). No se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0.05$ ), en la densidad poblacional de *B. fibrisolvens* en los días cinco y seis de muestreo con el tratamiento T1 y T4, donde la población se mantuvo constante, mientras que con el tratamiento T2 se observó una disminución en la población sin diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.005$ ) y con el tratamientos T3 la densidad poblacional incrementó significativamente ( $p = 0.045$ ) en un rango de  $5,2 \times 10^4$  a  $1,25 \times 10^6$  células/ml. No obstante, al realizar el análisis de la densidad



poblacional de *B. fibrisolvens* durante el séptimo día, se obtuvo un incremento estadísticamente significativo ( $p=0.001$ ) con el tratamiento T2 ( $1,18 \times 10^6$  células/ml). La suplementación del pasto Kikuyo (19,4% de proteína) con 20% de biomasa y 10 % de harina de yuca resultó en un incremento significativo de la población de *B. fibrisolvens* en comparación con los demás tratamientos (Figura 8).

La concentración de ácido vaccénico obtenida a partir del inoculo inicial fue de 15 mg/L. Con los tratamientos T1, T3 y T4 no se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $p>0.05$ ) en la concentración de ácido vaccénico en el contenido ruminal del Rusitec durante el periodo de muestreo. Sin embargo, con el tratamiento T2 se presentó un incremento estadísticamente significativo ( $p=0.001$ ) en la concentración de este ácido, y al correlacionar el número de células/ml de *B. fibrisolvens* y la concentración de ácido vaccénico, se observó una correlación positiva ( $r=86\%$ ,  $p=0.0038$ ), es decir, la concentración del ácido vaccénico fue directamente proporcional a la densidad de la población de *B. fibrisolvens* presente en el contenido ruminal durante la simulación en el Rusitec (figura 9 y 10 ).

## DISCUSIÓN

En años recientes se ha despertado gran interés por el estudio de los microorganismos ruminales involucrados en el metabolismo de los ácidos grasos insaturados, con el fin de potenciar su contenido en la carne, leche y demás productos alimenticios derivados de la industria ganadera (37). Por el otro lado, la industria de los biocombustibles ha buscado una disposición pertinente para sus subproductos, dentro de los cuales se encuentra la biomasa, mediante la suplementación de dietas alimenticias para bovinos (17). Varios estudios se han enfocado en investigar el efecto que tiene sobre la microbiota ruminal, la suplementación de los pastos tradicionales con productos ricos en proteínas, fibra, lípidos y minerales (38, 39). Se ha detectado que la combinación de lípidos (40), aceite de pescado (41), soya y maíz, con los pastos en la dieta suministrada a cabras, ovejas y bovinos (42), resulta en cambios significativos de la microbiota ruminal, siendo este uno de los factores que influye en el cambio del perfil de ácidos grasos presentes en la leche y la carne (7). Diferentes estudios sugieren que la composición del alimento puede estimular una variación en la diversidad microbiana del rumen (5, 43). Se ha observado que cuando bovinos, caprinos y ovinos son

alimentados con dietas ricas en celulosa, aumentan las bacterias celulolíticas como *Ruminococcus albus* y *Fibrobacter succinogenes*, en comparación a los animales alimentados con dietas basadas en fibra y lípidos, donde predomina la población de bacterias hemicelulolíticas y proteolíticas, tales como *Butyrivibrio fibrisolvens* y *Prevotella* spp. ó en el caso de dietas suplementadas con productos alimenticios comerciales ricos en proteína, donde predominan bacterias como *Clostridium ruminantium*, *Peptostreptococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Lactobacillus* spp. y *Ruminococcus amylophilus* (44). La diversidad de la microbiota ruminal es amplia y altamente influenciada por la dieta que se suministra a los animales, las principales bacterias celulolíticas del rumen, *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens*, *Ruminococcus albus* y *Butyrivibrio fibrisolvens*, pueden representar entre el 10 y el 40% del total de la población bacteriana (45), los protozoos juegan un papel importante en la digestión de la pared celular de las plantas, pudiendo digerir entre el 5 y el 21% de los materiales celulósicos, según el tipo de dieta que consuma el animal (46, 47) y los hongos, representan aproximadamente el 8% de la biomasa microbiana (48) y una porción de éstos producen celulasas y hemicelulasas altamente activas (49).

En el presente estudio se observó que la densidad poblacional de bacterias celulolíticas, y específicamente de *B. fibrisolvens*, aumentó significativamente en respuesta a la suplementación del pasto Kikuyo (19,4% de proteína) con harina de yuca y biomasa efluente de la producción de etanol, debido posiblemente al aporte de almidón y proteína presente en este tratamiento (15, 20, 21), estimulando la actividad hemicelulolítica y proteolítica de este tipo de bacterias (5,14, 50-52). En concordancia, en un trabajo realizado por Belenguer *et al.* (6) reportaron que la suplementación de dietas forrajeras con una combinación de aceite de pescado y aceite de girasol promovió un cambio significativo en la composición de la microbiota de ovinos, y específicamente, un incremento significativo de la población de bacterias del género *Butyrivibrio*. No obstante, los resultados obtenidos en este estudio, con los tratamientos T3 y T4, fueron totalmente contrarios a lo obtenido en el tratamiento T2, lo que podría sugerir que la respuesta positiva a la suplementación en el tratamiento T2 se da en respuesta a la calidad nutritiva del pasto kikuyo. Estudios realizados por García *et al.*, evaluaron el efecto de la suplementación con biomasa obtenida como subproducto de la producción de etanol reemplazando diferentes porcentajes de proteína de tres forrajes de pasto kikuyo de calidad nutritiva contrastante (alta, media y baja) por proteína proveniente de la biomasa, al evaluar la degradabilidad de las fracciones: materia seca, fibra detergente neutra y

fibra detergente acida, observaron que la suplementación tuvo un efecto positivo significativo ( $p < 0.01$ ) sobre los parámetros de fermentación evaluados con el pasto de alta calidad en contraste con los resultados obtenidos con la suplementación del pasto kykuyo de media y baja calidad, sugiriendo que la respuesta positiva a la suplementación con biomasa, está en función de la calidad nutritiva del pasto kykuyo, lo que podría estar influyendo de la misma manera en la población de bacterias celulolíticas y de *B. fibrisolvens* observada en el presente estudio con el tratamiento 2, el cual incluía la suplementación de pasto de buena calidad con biomasa y harina de yuca.

El género *Butyrivibrio* incluye diversidad de bacterias Gram negativas, móviles, productoras de butirato, aisladas principalmente del rumen de bovinos y cabras (53), aunque también ha sido detectado como parte de la flora intestinal de humanos (54), conejos y caballos (55). La variabilidad morfológica, funcional y genética que se ha detectado en las bacterias pertenecientes al género *Butyrivibrio*, aisladas desde diversos hospederos y de diferentes regiones del mundo, sugiere que este género es ampliamente diverso en cuanto a las especies que contiene. El género *Butyrivibrio* puede dividirse en varios grupos correspondientes a tres biotipos diferentes, de acuerdo a su capacidad de producción de algunos ácidos grasos, clasificándose en productores de ácido láctico y succínico, no productores de acetato y productores de butirato (56, 59, 63, 65). Willems *et al.* (66), identificaron que los aislamientos de *Pseudobutyrovibrio ruminis* y *Butyrivibrio proteoclasticum* encontrados en rumen de bovinos, producen succinato y propionato, pero no ácido butírico y acetato, en contraste con la cepa tipo de *B. fibrisolvens* que produce ácidos butírico y láctico, y baja cantidad de los ácidos fórmico y succínico (66). En este estudio se caracterizaron dos aislamientos nativos de bacterias ruminales, identificados como *B. fibrisolvens*, por que presentaron características morfológicas y metabólicas compatibles con la cepa tipo de *B. fibrisolvens* (ATCC #19171), produciendo en mayor proporción ácido butírico, láctico y propiónico y en menor cantidad ácido fórmico y succínico, además de que están relacionadas filogenéticamente.

Las especies de este género pertenecen al grupo XIVa del Subphylum *Clostridium* (56) y participan en funciones importantes del ecosistema ruminal, incluyendo procesos de proteólisis para la degradación de la fibra (57) y la biohidrogenación de los ácidos grasos (18, 58, 59), muestran gran habilidad para hidrogenar ácido linoléico a ácido vaccénico, mediante la actividad de las enzimas, ácido linoléico isomerasa y ácido linoléico reductasa,

confiriéndole gran especificidad en la utilización del ácido linoléico para la formación del ácido linoléico conjugado (ALC) (54). Diferentes estudios han demostrado que la síntesis y concentración del ALC en leche y carne de bovinos puede ser potenciada o inhibida por factores como la composición microbiana del rumen, la raza del animal, la composición bromatológica de los pastos y la suplementación con otros alimentos ricos en proteína, lípidos y fibra e incluso con algunas condiciones propias de la ubicación geográfica, tales como la altitud (60). En el presente estudio se detectó un aumento significativo en la concentración de ácido vaccénico en presencia del tratamiento T2 en el Rusitec, este es un ácido graso monoinsaturado *trans* que predomina en la fracción grasa de los productos de origen ruminal (60-63), y se forma como producto intermedio durante la biohidrogenación microbiana de los ácidos grasos insaturados (39), su concentración está directamente relacionada con la dieta suministrada a los animales, rica en ácido linoléico y alfa- linoléico, proteína y fibra, y requiere de la participación activa de los microorganismos ruminales encargados de dicho proceso, como es el caso de la bacteria ruminal *B. fibrisolvens* (6, 7, 38, 64). Aunque en este estudio no se realizó una cuantificación directa de la producción de ALC, por haberse ejecutado en un sistema de simulación ruminal *in vitro* y este ácido se encuentra principalmente en la carne y los productos lácteos (61-63), si se observó que la concentración del ácido vaccénico en el Rusitec fue directamente proporcional a la densidad de la población de *B. fibrisolvens* bajo la suplementación del pasto Kikuyo con la harina de yuca y biomasa. Estos resultados sugieren que la aplicación de este tipo de suplementación en campo, podrían conllevar a un incremento significativo de la concentración de ALC en leche y carne de bovinos, si se considera que el ácido vaccénico es uno de sus principales precursores en el rumen (63, 64).

En un estudio realizado en paralelo a la presente investigación, se observó que la suplementación del pasto Kikuyo con harina de yuca y biomasa (tratamiento T2) tuvo un efecto positivo estadísticamente significativo ( $p < 0.05$ ) sobre algunos indicadores de la digestibilidad ruminal, tales como el porcentaje de degradación de la materia seca, la materia orgánica y la producción de amoníaco, y no tuvo un efecto significativo ( $p > 0.05$ ) sobre el porcentaje de degradación de la pared celular, la proteína cruda, el pH, y la producción de gas (67). Los resultados obtenidos en este estudio con el aumento significativo de la densidad poblacional de las bacterias celulolíticas viables y de *B. fibrisolvens*, así como la concentración del ácido vaccénico en respuesta a la suplementación del pasto kikuyo con la

harina de yuca y biomasa, sumado a los resultados obtenidos por García y Giraldo (67) respecto a los indicadores de la digestibilidad ruminal, sugieren que este tipo de dieta podría potenciar significativamente la actividad metabólica de los microorganismos ruminales y por consecuencia aportar al balance energético de los bovinos, resultando en un incremento de la calidad nutricional de los productos como la leche y la carne derivados de estos animales (68). Se ha reportado que la yuca es un alimento energético básico en la industria de alimentos balanceados para animales, ya sea en la presentación como harina, hojuelas o gránulos (16). La yuca es un compuesto altamente energético gracias a su contenido de materia seca, celulosa, hemicelulosa, proteínas, almidón, entre otros polisacáridos fácilmente fermentables (15). En concordancia, la biomasa (levadura rica en proteína) efluente de la producción de etanol, también presenta alto contenido de materia seca, proteínas, lignina, celulosa y hemicelulosa (15, 69). Los resultados obtenidos en este estudio, aunque fueron obtenidos en un sistema *in vitro*, sugieren el potencial nutricional de la harina de yuca y la biomasa efluente de la producción de etanol, como suplementos en la alimentación de bovinos en pastoreo. No obstante, se necesitan investigaciones adicionales en campo que evalúen el efecto de la suplementación con harina de yuca y biomasa en la dieta de los bovinos, evaluando indicadores importantes como la palatabilidad de la dieta, ganancia de peso, producción de leche, así como, el efecto *in situ* en la población de microorganismos ruminales, incluyendo por ejemplo la caracterización de la población de bacterias celulolíticas y de *B. fibrisolvens*, que en conjunto permitan determinar si estos aditivos pueden ser utilizados en la formulación de dietas para el ganado.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al grupo de investigación en Microbiología Veterinaria adscrito a la Escuela de Microbiología de la Universidad de Antioquia, por el apoyo logístico, técnico y humano que hicieron posible la realización de este trabajo. Al grupo de investigación BIORUM de la Universidad Nacional de Colombia sede Medellín, quienes realizaron el montaje de los experimentos de simulación ruminal en el Rusitec. A la unidad de gestión CEAGRO de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Nacional de Colombia sede Medellín, al Departamento de Formación Académica de Haciendas adscrito a la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad de Antioquia y al personal administrativo y técnico de la Hacienda

La Montaña de la Universidad de Antioquia y de la Hacienda Paysandú de la Universidad Nacional de Colombia sede Medellín, por su valiosa colaboración para la ejecución de los muestreos y en el cuidado de los animales canulados.

## **FUENTES DE FINANCIACIÓN**

Este trabajo estuvo anidado al proyecto financiado por el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural de Colombia código 2008D31067-3724 producto de la alianza entre la Universidad de Antioquia, FUNDAUNIBAN y la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín. Además estuvo anidado al proyecto de menor cuantía año 2010 financiado por el CODI de la Universidad de Antioquia titulado: Aislamiento e identificación de cepas nativas de bacterias celulolíticas de contenido ruminal de bovinos, para el establecimiento de un banco de germoplasma especializado en microbiota ruminal.

## REFERENCIAS

1. Preston TR, Leng R. Matching Ruminant production systems with avail resources in the tropics and sub-tropics. Journal [serial on the Internet]. *Penambul Boocks*, Australia. 2002. Available from: [http:// www.utafoundation.org](http://www.utafoundation.org).
2. 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.
3. 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):572-82.
4. Dehority BA. Gross anatomy, physiology and enviroment of the ruminant stomach. In: Elsevier, editor. *Rumen Microbiology*. London; 2003.
5. Kopečný J, Zorec M, Mrazek J, Kobayashi Y, Marinsek-Logar R. *Butyrivibrio hungatei* sp. nov. and *Pseudobutyrvibrio xylanivorans* sp. nov., butyrate-producing bacteria from the rumen. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2003; 53(Pt 1):201-9.
6. 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):3275-86.
7. Toral PG, A. Belenguer, P. Frutos, Hervás. G. Effect of the supplementation of a high-concentrate diet with sunflower and fish oils on ruminal fermentation in sheep. *Small Rumin Res*. 2009; 81:119-125.
8. Huws SA, Kim EJ, Kingston-Smith AH, Lee MR, Muetzel SM, Cookson AR, et al. Rumen protozoa are rich in polyunsaturated fatty acids due to the ingestion of chloroplasts. *FEMS Microbiol Ecol*. 2009; 69(3):461-71.
9. Blanch M, Calsamiglia S, DiLorenzo N, DiCostanzo A, Muetzel S, Wallace RJ. Physiological changes in rumen fermentation during acidosis induction and its control using a multivalent polyclonal antibody preparation in heifers. *J Anim Sci*. 2009; 87(5):1722-30.
10. Loor JJ, Herbein JH. Dietary canola or soybean oil with two levels of conjugated linoleic acids (CLA) alter profiles of 18:1 and 18:2 isomers in blood plasma and milk fat from dairy cows. *Anim Feed Sci Technol*. 2003; 103(1-4):63-83
11. 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):239-48.
12. Jouany J, Michalet-Doreau B, Doreau M. Manipulation of the rumen ecosystem to support high-performance beef cattle – review Asian - Aus. *J Anim Sci*. 2000; 13:96 -114.
13. Martínez H. Plan Energético Nacional 2006-2025. Contexto y Estrategias. Unidad de Planeación Minero Energética – UPME. 2007.

14. Asanuma N, Kawato M, Hino T. Presence of *Butyrivibrio fibrisolvens* in the digestive tract of dogs and cats, and its contribution to butyrate production. *J Gen Appl Microbiol.* 2001; 47(6):313-9.
15. 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.
16. Gil J, Buitrago J. La yuca en la alimentación animal. Centro Nacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali, Colombia 1990. p. 446.
17. FAO. Global cassava market study. Business opportunities for the use of cassava. 2004 [updated 2004; cited 2010 6 Junio]; Available from: <http://www.fao.org/docrep/007/y5287e/y5287e00.htm>.
18. Van de Vossenberg JL, Joblin KN. Biohydrogenation of C18 unsaturated fatty acids to stearic acid by a strain of *Butyrivibrio hungatei* from the bovine rumen. *Lett Appl Microbiol.* 2003; 37(5):424-8.
19. McSweeney CS, Denman SE. Effect of sulfur supplements on cellulolytic rumen micro-organisms and microbial protein synthesis in cattle fed a high fibre diet. *J Appl Microbiol.* 2007; 103(5):1757-65.
20. Carulla JE, Cárdenas E, Sánchez N, Riveros C. Valor nutricional de los forrajes más usados en los sistemas de producción lechera especializada de la zona andina colombiana; En: Seminario Nacional de Lechería Especializada, Bases Nutricionales y su Impacto en la Productividad; 2004; Medellín, septiembre 1 y 2: 21 - 38.: Eventos y Asesorías Agropecuarias EU (ed).
21. 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.
22. Rios 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 (Medellín, Colombia). *Revista Facultad Nacional de Agronomía.* 2004; 57(2).
23. Czerkawski JW, Breckenridge G. Design and development of a long-term rumen simulation technique (Rusitec). *Br J Nutr.* 1977; 38(3):371-84.
24. Carmona J, M, Giraldo LA. El gas metano en la producción ganadera y alternativas para medir sus emisiones y aminorar su impacto a nivel ambiental y productivo. *Rev Col Cienc Pec.* 2005; 18(1): 49-63.
25. Bryant MP. Commentary on the Hungate technique for culture of anaerobic bacteria. *Am J Clin Nutr.* 1972; 25(12):1324-8.



26. 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):262-7.
27. Rodríguez F, Diaz T, Mackenzie G, Guativa L, Afanador G. Aislamiento, patrón de fermentación de carbohidratos y caracterización morfológica de bacterias celulolíticas del rumen bovinos alimentados con heno de Raigras en Colombia. *Rev Copeica.* 1996; 1:23-8.
28. Dehority BA. Carbon dioxide requirement of various species of rumen bacteria. *J Bacteriol.* 1971; 105(1):70-6.
29. Chen W, Supanwong K, Ohmiya K, Shimizu S, Kawakami H. Anaerobic degradation of veratrylglycerol-beta-guaiacyl ether and guaiacoxycetic acid by mixed rumen bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 1985; 50(6):1451-6.
30. Balamurugan R, Chittaranjan SP, Chandragunasekaran AM, Ramakrishna BS. Molecular detection of the ruminal bacterium, *Butyrivibrio fibrisolvens*, in feces from rural residents of southern India. *Microb Ecol Health D.* 2009; 21(1):38-43.
31. Drummond A, Ashton B, Buxton S, Cheung M, Cooper A, Duran C, et al., inventors; Geneious v5.4, Available from <http://www.geneious.com/>. 2011.
32. Swofford D. PAUP\* version 4.0. Phylogenetic analysis using parsimony (and other methods). Sinauer Associates Inc, Sunderland, Massachusetts. 2000.
33. Posada D, Crandall K. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics.* 1998; 14(9): 817-8.
34. Huelsenbeck JP, Ronquist F, Nielsen R, Bollback JP. Bayesian inference of phylogeny and its impact on evolutionary biology. *Science.* 2001; 294: 2310-4. .
35. Ronquist F, Huelsenbeck JP. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics.* 2003; 19:1572-4.
36. Ouwerkerk D, Klieve AV, Forster RJ. Enumeration of *Megasphaera elsdenii* in rumen contents by real-time Taq nuclease assay. *J Appl Microbiol.* 2002; 92(4):753-8.
37. Palmquist DL, Lock AL, Shingfield KJ, Bauman DE. Biosynthesis of conjugated linoleic acid in ruminants and humans. *Adv Food Nutr Res.* 2005; 50:179-217.
38. Boeckaert C, Boon N, Abdulsudi IZ, Verstraete W, Fievez V. Accumulation of biohydrogenation intermediates and changes in the rumen protozoal population after micro algae feeding to dairy cattle. *Commun. Agric Appl Biol Sci.* 2006; 71(1):83-6.
39. Kim EJ, Huws SA, Lee MR, Wood JD, Muetzel SM, Wallace RJ, et al. Fish oil increases the duodenal flow of long chain polyunsaturated fatty acids and trans-11 18:1 and decreases 18:0 in steers via changes in the rumen bacterial community. *J Nutr.* 2008; 138(5):889-96.

40. Van Nieuwenhove CP, Oliszewski R, González SN, Pérez Chaia AB. Influence of bacteria used as adjunct culture and sunflower oil addition on conjugated linoleic acid content in buffalo cheese. *Food Res Int.* 2007; 40(5):559-64.
41. Wasowska I, Maia MR, Niedzwiedzka KM, Czauderna M, Ribeiro JM, Devillard E, et al. Influence of fish oil on ruminal biohydrogenation of C18 unsaturated fatty acids. *Br J Nutr.* 2006; 95(6):1199-211.
42. Mir Z, Rushfeldt ML, Mir PS, Paterson LJ, Weselake RJ. Effect of dietary supplementation with either conjugated linoleic acid (CLA) or linoleic acid rich oil on the CLA content of lamb tissues. *Small Rumin Res.* 2000; 36(1):25-31.
43. Čepeljnik T, Zorec M, Kostanjšek R, Nekrep F, Marinšek-Logar R. Is *Pseudobutyrvibrio xylanivorans* strain Mz5T suitable as a probiotic? An in Vitro study. *Folia Microbiol (Praha).* 2003; 48(3):339-45.
44. Dehority BA, Tirabasso PA. Effect of ruminal cellulolytic bacterial concentrations on in situ digestion of forage cellulose. *J Anim Sci.* 1998; 76(11):2905-11.
45. Krause DO, Denman SE, Mackie RI, Morrison M, Rae AL, Attwood GT, et al. Opportunities to improve fiber degradation in the rumen: microbiology, ecology, and genomics. *FEMS Microbiol Rev.* 2003; 27(5):663-93.
46. Bach A, Yoon IK, Stern MD, Jung HG, Chester-Jones H. Effects of type of carbohydrate supplementation to lush pasture on microbial fermentation in continuous culture. *J Dairy Sci.* 1999; 82(1):153-60.
47. Hook SE, Steele MA, Northwood KS, Wright AD, McBride BW. Impact of High-Concentrate Feeding and Low Ruminal pH on Methanogens and Protozoa in the Rumen of Dairy Cows. *Microb Ecol.* Published online May 31, 2011
48. Orpin CG. The role of ciliate protozoa and fungi in the rumen digestion of plant cell walls. *Anim Feed Sci Technol.* 1983; 10:121-43.
49. Ljungdahl LG. The cellulase/hemicellulase system of the anaerobic fungus *Orpinomyces* PC-2 and aspects of its applied use. *Ann N Y Acad Sci.* 2008; 1125:308-21.
50. Michalet-Doreau B, I. Fernandez, C. Peyron, Millet L, G. Fonty. Fibrolytic activities and cellulolytic bacterial community structure in the solid and liquid phases of rumen contents. *Reprod Nutr Dev.* 2001; 41:187-94.
51. Colombatto C.D., F. L. Mould, M. K. Bhat, D. P. Morgavi, Beauchemin KA, E. Owen. Influence of fibrolytic enzymes on the hydrolysis and fermentation of pure cellulose and xylan by mixed ruminal microorganisms in vitro. *J Anim Sci.* 2003; 81:1040-50.
52. Ranilla MJ, Carro MD. Diet and procedures used to detach particle-associated microbes from ruminal digesta influence chemical composition of microbes and estimation of microbial growth in Rusitec fermenters. *J Anim Sci.* 2003; 81(2):537-44.

53. Mrázek J, Tepšič K, Avguštin G, Kopečný J. Diet-dependent shifts in ruminal butyrate-producing bacteria. *Folia Microbiol (Praha)*. 2006; 51(4):294-8.
54. 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):417-22.
55. Wilde PF, Dawson RM. The biohydrogenation of alpha-linolenic acid and oleic acid by rumen micro-organisms. *Biochem J*. 1966; 98(2):469-75.
56. Paillard D, McKain N, Chaudhary L, Walker N, 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):417-22.
57. Bessa RJB, Santos-Silva J, Ribeiro JMR, Portugal AV. Reticulo-rumen biohydrogenation and the enrichment of ruminant edible products with linoleic acid conjugated isomers. *Livest Prod Sci*. 2000; 63(3):201-11.
58. Stewart CS. Factors Affecting the Cellulolytic Activity of Rumen Contents. *Appl Environ Microbiol*. 1977; 33(3):497-502.
59. 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):2247-54.
60. Biondi L, Valvo MA, Di Gloria M, Tenghi ES, Galofaro V, Priolo A. Changes in ewe milk fatty acids following turning out to pasture. *Small Rumin Res*. 2008; 75(1):17-23
61. 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. *Appl Microbiol Biot*. 2009; 84(6):1033-43.
62. Maia MRG, Chaudhary LC, Figueres L, Wallace RJ. Metabolism of polyunsaturated fatty acids and their toxicity to the microflora of the rumen. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2007; 91(4):303-14.
63. Zlatanov S, Laskaridis K, Feist C, Sagredos A. CLA content and fatty acid composition of Greek Feta and hard cheeses. *Food Chemistry*. 2002; 78(4):471-7.
64. Irmak S, Dunford NT, Gilliland SE, Banskalieva V, Eisenmenger M. Biocatalysis of linoleic acid to conjugated linoleic acid. *Lipids*. 2006; 41(8):771-6.
65. Margherita SS, Hungate RE, Storz H. Variation in Rumen *Butyrivibrio* Strains. *J Bacteriol*. 1964; 87:1304-8.
66. Willems A, Amat-Marco M, Collins MD. Phylogenetic analysis of *Butyrivibrio* strains reveals three distinct groups of species within the *Clostridium* subphylum of the gram-positive bacteria. *Int J Syst Bacteriol*. 1996; 46(1):195-9.

67. Garcia W, Giraldo LA. Efecto de la suplementación del pasto Kykuyo (*Pennisetum clandestinum*) con coproductos del bioetanol obtenido a partir de harina de yuca en un fermentador RUSITEC. IV Congreso internacional de ciencia y tecnología de los biocombustibles CIBSCOL Seminario internacional: Biocombustibles y Co-productos a partir de Microalgas; 2010; Bucaramanga, Colombia Libro de Memorias; 2010. p. 4.
68. Collomb M, Sollberger H, Bütikofer U, Sieber R, Stoll W, Schaeren W. Impact of a basal diet of hay and fodder beet supplemented with rapeseed, linseed and sunflowerseed on the fatty acid composition of milk fat. *Int Dairy J.* 2004; 14(6):549-59.
69. Giraldo A, Velasco R, Villada H. Digestibilidad Aparente de una Harina Proveniente de Hojas de Yuca (*Manihot esculenta* Crantz). *Información Tecnológica.* 2008; 19(1):11-8.70.
70. Barcenilla A, Pryde SE, Martin JC, Duncan SH, Stewart CS, Henderson C, et al. Phylogenetic relationships of butyrate-producing bacteria from the human gut. *Appl Environ Microbiol.* 2000; 66(4):1654-61.
71. Attwood GT, Reilly K, Patel BK. *Clostridium proteoclasticum* sp. nov., a novel proteolytic bacterium from the bovine rumen. *Int J Syst Bacteriol.* 1996; 46(3):753-8.
72. Dalrymple BP, Swadling Y, Layton I, Gobius KS, Xue GP. Distribution and evolution of the xylanase genes *xynA* and *xynB* and their homologues in strains of *Butyrivibrio fibrisolvens*. *Appl Environ Microbiol.* 1999; 65(8):3660-7.
73. Reilly K, Carruthers VR, Attwood GT. Design and use of 16S ribosomal DNA-directed primers in competitive PCRs to enumerate proteolytic bacteria in the rumen. *Microb Ecol.* 2002; 43(2):259-70.
74. Van Gylswyk NO, Hippe H, Rainey FA. *Pseudobutyrvibrio ruminis* gen. nov., sp. nov., a Butyrate-Producing Bacterium from the Rumen That Closely Resembles *Butyrivibrio fibrisolvens* in Phenotype. *Int J Syst Bacteriol.* 1996; 46:559-63.
75. Forster RJ, Teather RM, Gong J, Deng SJ. 16S rDNA analysis of *Butyrivibrio fibrisolvens*: phylogenetic position and relation to butyrate-producing anaerobic bacteria from the rumen of white-tailed deer. *Lett Appl Microbiol.* 1996; 23(4):218-22
76. Varel VH, Tanner RS, Woese CR. *Clostridium herbivorans* sp. nov., a cellulolytic anaerobe from the pig intestine. *Int J Syst Bacteriol.* 1995; 45(3):490-4.

**Tabla 1.** Composición química de los tratamientos evaluados en el simulador de rumen Rusitec.

Tratamiento	P.C	E.E	FDN	FDA	LDA	CEN	M.O
	(%) MS						
<i>Kikuyo alta calidad</i>							
<b>T1</b>	23.9	3.06	57.5	25.0	2.3	12.9	87.1
<b>T2</b>	19.4	2.94	52.0	24.1	4.2	11.0	89.0
<i>Kikuyo baja calidad</i>							
<b>T3</b>	17.8	2.75	66.6	29.3	3.2	9.8	90.2
<b>T4</b>	15.3	2.38	58.3	28.0	5.5	9.2	90.8

PC: Proteína cruda; FDN: Fibra en detergente neutro; FDA: Fibra en detergente ácido; LDA: Lignina en detergente ácido; E.E: Extracto etéreo; CEN: Cenizas; M.O: Materia orgánica.

**Tabla 2. Composición química de la harina de yuca y la biomasa producto de la producción de etanol**

<b>Biomasa*</b>	<b>P.C</b>	<b>E.E</b>	<b>FDN</b>	<b>FDA</b>	<b>LDA</b>	<b>CEN</b>	<b>M.O</b>	<b>E.B</b>	<b>DIVMS</b>
	(%) MS								
	11.08	2.03	50.87	42.43	16.59	11.12	88.88	4.359	74.58

<b>Harina de Yuca*</b>	<b>P.C</b>	<b>E.E</b>	<b>H</b>	<b>CEN</b>	<b>CHO</b>	<b>A</b>	<b>F.C</b>	<b>N</b>
	(%) MS							
	3.17	0.39	10.35	2.12	84.00	72.03	1.66	0.51

PC: Proteína cruda; FDN: Fibra en detergente neutro; FDA: Fibra en detergente ácido; LDA: Lignina en detergente ácido; E.E: Extracto etéreo; CEN: Cenizas; M.O: Materia orgánica, E.B: energía bruta (Kcal/kg MS), DIVMS: Digestibilidad "in vitro" de la materia seca, H: humedad, CHO: carbohidrato, A: almidón, FC: fibra cruda, N: nitrógeno

*\*Estos datos corresponden a muestras tomadas al azar de la harina producida en Mutatá y a la biomasa subproducto de la producción de etanol. Grupo Biotransformación, Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia.*

**Tabla 3.** Secuencias nucleotídicas parciales del gen ARNr 16S obtenidas de los aislamientos nativos y reportadas en el GenBank para cepas de referencia de los géneros *Butyrivibrio* y *Pseudobutyrvibrio*

Código GenBank	Cepa de referencia	Origen	Lugar	Referencia
Pendiente	<b>Bacteria_Ruminal_Nativa1</b>	Rumen de Bovinos	Medellín, Colombia	Este trabajo
Pendiente	<b>Bacteria_Ruminal_Nativa2</b>	Rumen de Bovinos	Medellín, Colombia	Este trabajo
AY699276	<i>B. fibrisolvens</i>	Tracto gastrointestinal de camello domestico	Queensland, Australia	Ghali, M.B <i>et al.</i> ,(datos sin publicar)
AJ270476	<b>Butyrate-producing_bacterium</b>	Intestino Humano	Aberdeen, AB21 9SB, Reino Unido	Barcenilla,A. <i>et al.</i> , (70)
AJ428549	<i>Pseudobutyrvibrio ruminis</i>	Rumen de Bovinos	Republica Checa	Kopecny, <i>et al.</i> (5)
AJ428553	<i>Butyrivibrio hungatei</i>	Rumen de Bovinos	Republica Checa	Kopecny, <i>et al.</i> (5)
AJ428548	<i>Pseudobutyrvibrio xylanovorans</i>	Rumen de Bovinos	Republica Checa	Kopecny, <i>et al.</i> (5)
AJ428550	<i>Pseudobutyrvibrio xylanovorans</i>	Rumen de Bovinos	Republica Checa	Kopecny, <i>et al.</i> (5)
CPU37378	<i>Butyrivibrio proteoclasticus</i>	Rumen de Bovinos	Palmerston North, Nueva Zelanda	Attwood, G.T <i>et al.</i> (71)
AF125902	<i>B. fibrisolvens</i>	Rumen de Bovinos	Indooroopilly, QLD 4068, Australia	Dalrymple, B.P <i>et al.</i> , (72)
AF396926.1	<i>B. fibrisolvens</i>	Rumen de Bovinos	Palmerston North 5301, Nueva Zelanda	Reilly,K <i>et al.</i> ,2002. (73)
X89971.1	<i>B. fibrisolvens</i>	Rumen de Bovinos	Reino Unido	Willems, A <i>et al.</i> , (66).
X89972.1	<i>B. fibrisolvens</i>	Rumen de Bovinos	Reino Unido	Willems, A <i>et al.</i> ,(66).
X89973.1	<i>B. fibrisolvens</i>	Rumen de Bovinos	Reino Unido	Willems, A <i>et al</i> (66)
X89974.1	<i>B. fibrisolvens</i>	Rumen de Bovinos	Reino Unido	Willems, A <i>et al.</i> , (66).
X89976.1	<i>B. fibrisolvens</i>	Rumen de Bovinos	Reino Unido	Willems, A <i>et al.</i> , (66)
X89978.1	<i>B. fibrisolvens</i>	Rumen de Bovinos	Reino Unido	Willems, A <i>et al.</i> , (66)
X89979.1	<i>B. fibrisolvens</i>	Rumen de Bovinos	Reino Unido	Willems, A <i>et al.</i> , (66)
X89981.1	<i>Butyrivibrio-crossotus</i>	Rumen de Bovinos	Reino Unido	Willems, A <i>et al.</i> , (66)
X95893.1	<i>Pseudobutyrvibrio ruminis</i>	Rumen de Bovinos	Braunschweig, Alemania	Van Gylswyk, N.O <i>et al.</i> , (74)..
BFU77343	<i>B. fibrisolvens</i>	Rumen de Bovinos	Ottawa, Canadá	Forster,R.J. and Gong,J.(datos sin publicar)
BFU77342	<i>B. fibrisolvens</i>	Rumen de Bovinos	Ottawa, Canadá	Forster,R.J. and Gong,J datos sin publicar)
BFU77339	<i>B. fibrisolvens</i>	Rumen de Bovinos	Ottawa, Canadá	Forster,R.J. and Gong,J datos sin publicar)
BFU41167	<i>B. fibrisolvens</i>	Rumen de venado cola blanca	Ottawa, Canadá	Forster,R.J <i>et al</i> (75)
BFU41168	<i>B. fibrisolvens</i>	Rumen de Bovinos	Ottawa, Canadá	Forster,RJ <i>et al.</i> , (75).
ATCC_19171 U41172	<i>B. fibrisolvens</i>	Rumen de Bovinos	Ottawa, Canadá	Forster,R.J <i>et al.</i> , (75)
M59109.1	<i>Clostridium_oroticum</i>	Intestino de cerdo	Nebraska, Estados Unidos	Varel, VH <i>et al.</i> , 1995. (76)

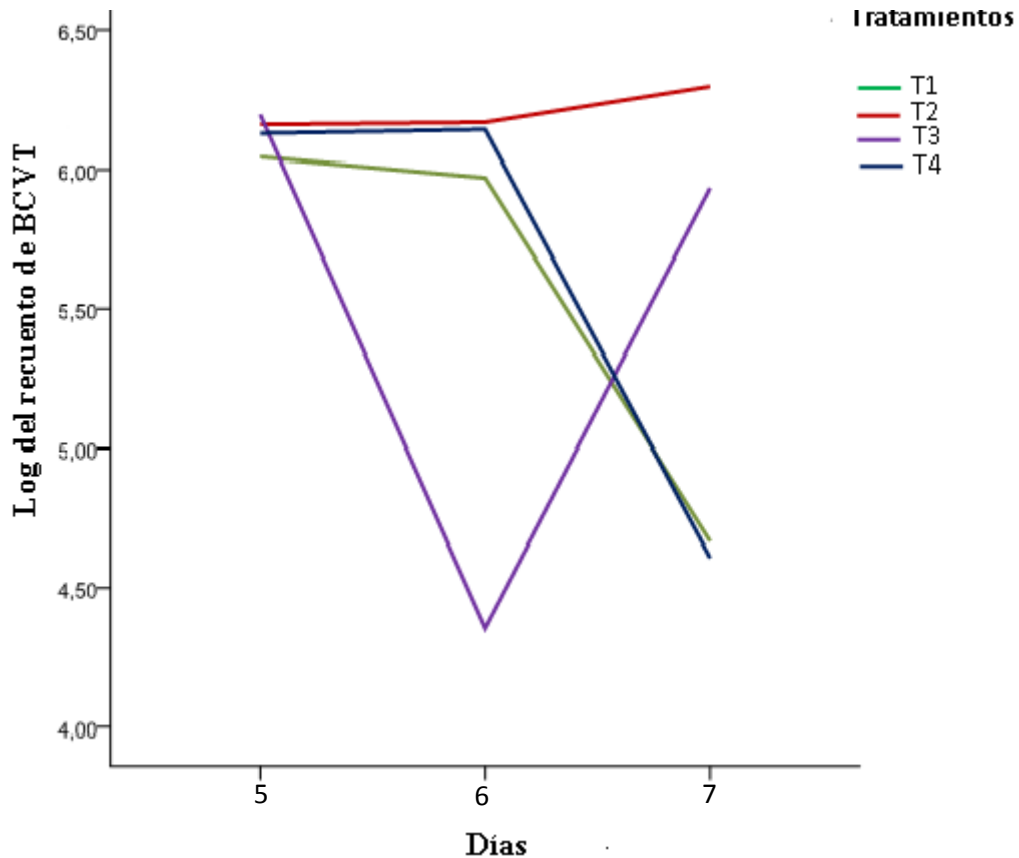
**Tabla 4.** Características morfológicas y patrón de fermentación de las cepas nativas de *B. fibrisolvens* en comparación con la cepa de referencia.

Características	Cepas nativas		ATCC 19171
	1	2	
<b>Morfología de colonia</b>	Translúcida	Translúcida	Translúcida
	Color marrón claro	Color marrón claro	Color marrón claro
<b>Morfología celular</b>	Bacilos curvos	Bacilos curvos	Bacilos en cadena o individuales
<b>Apetencia tintorial</b>	Gram variable	Gram variable	-
<b>Anaerobiosis</b>	+	+	+
<b>Movilidad</b>	+	+	+
<b>Hidrólisis de almidón</b>	+	+	+
<b>Licuefacción de gelatina</b>	-	-	-
<b>Producción de gas</b>	+	+	+
<b>Producción de H<sub>2</sub>S</b>	-	-	-
<b>Indol</b>	-	-	-
<b>Xilano</b>	+	±	+
<b>Esculina</b>	+	+	+
<b>Lactosa</b>	-	+	+
<b>Glucosa</b>	+	+	+
<b>Caseína</b>	+	-	-
<b>Maltosa</b>	+	+	+
<b>Celubiosa</b>	+	+	+
<b>Citrato</b>	+	+	+
<b>FRC<sup>a</sup></b>	+	+	+
<b>Butírico<sup>b</sup></b>	0.7	0.7	0.7
<b>Láctico<sup>b</sup></b>	0.85	0.85	0.85
<b>Propiónico<sup>b</sup></b>	0.9	0.9	0.9
<b>Fórmico<sup>b</sup></b>	0.4	0.4	0.4
<b>Succínico<sup>b</sup></b>	0.8	0.8	0.8

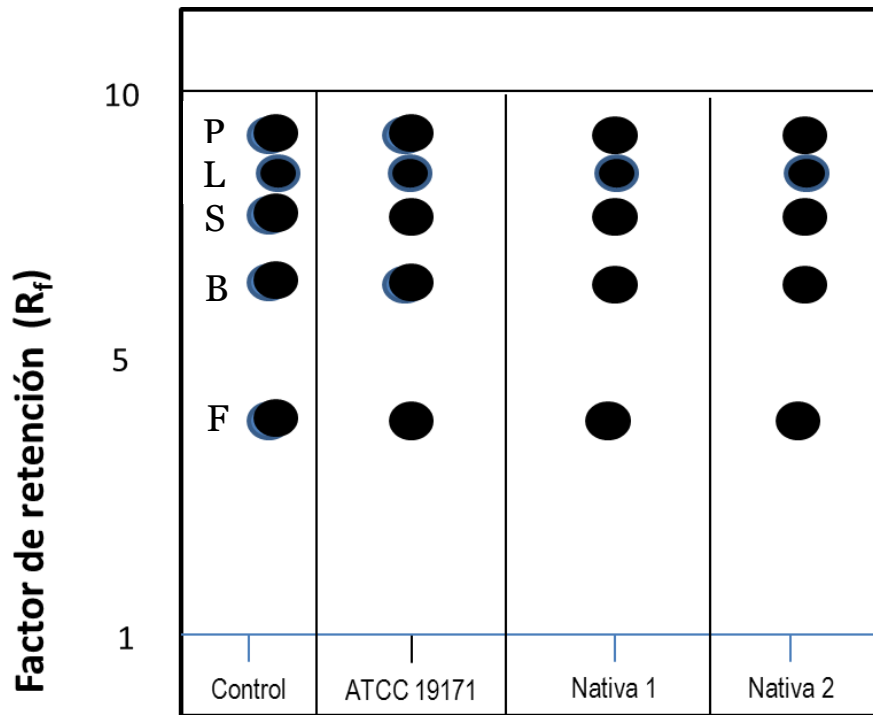
<sup>a</sup> RFC: Requerimiento de fluido ruminal clarificado

<sup>b</sup> Resultados expresados según el Factor de retención (R<sub>f</sub>)

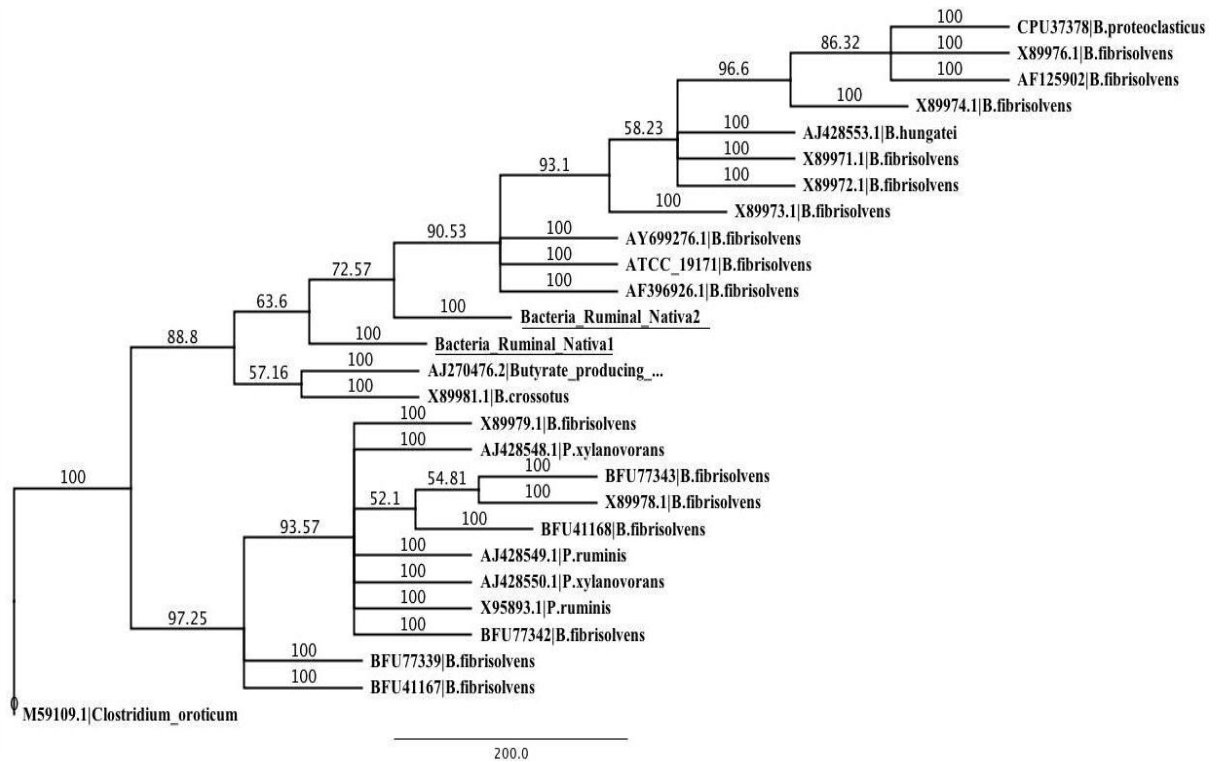




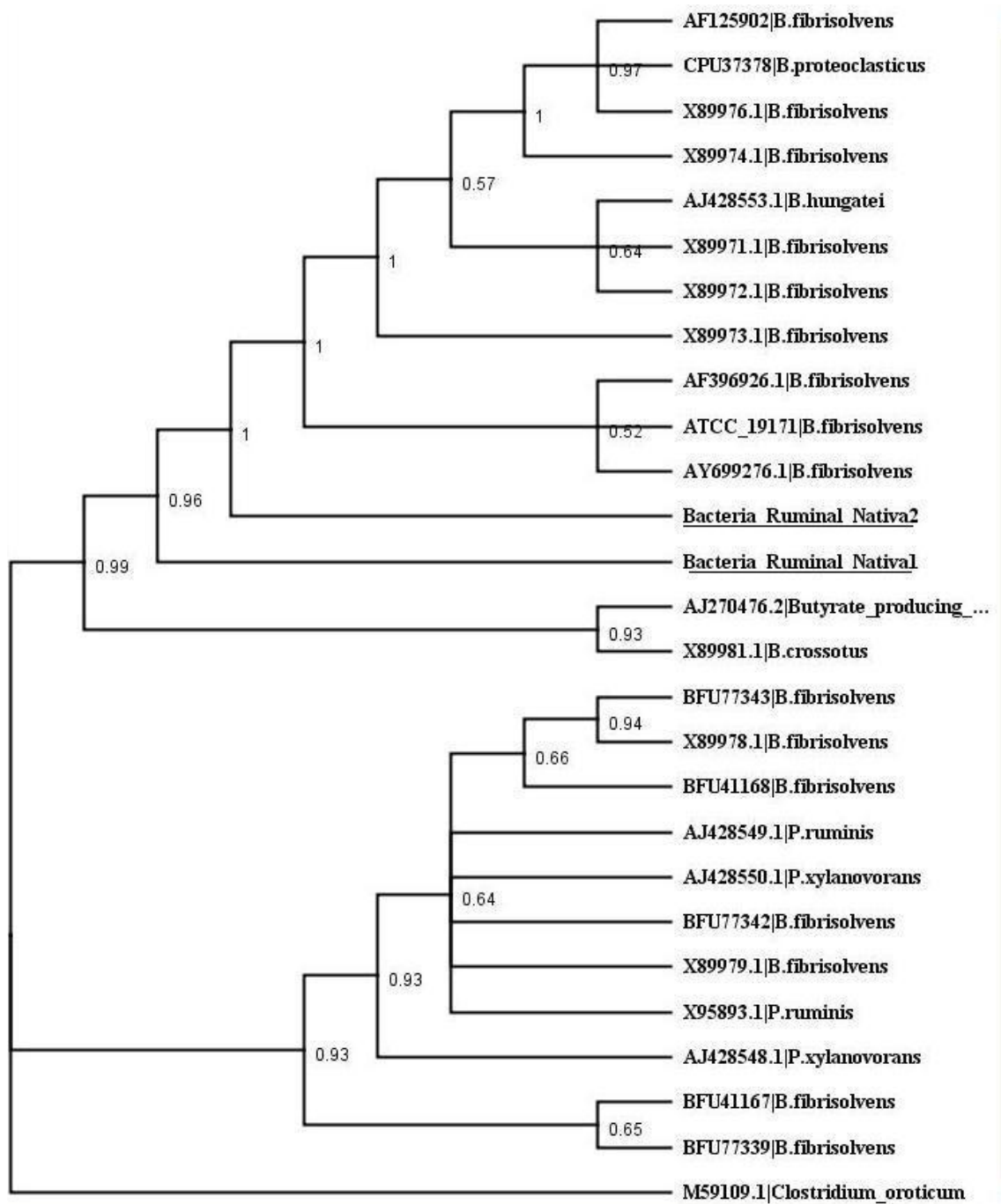
**Figura 1.** Densidad poblacional de bacterias celulolíticas viables con respecto al periodo de muestreo en el Rusitec. T1/Control 1 (línea verde): 100% pasto Kikuyo con un contenido de 23,9% de proteína, T2 (línea roja): mezcla constituida por 70% pasto Kikuyo con un contenido de 19,4% de proteína, 20% biomasa y 10% harina de yuca, T3/Control 2 (línea morada): 100% pasto Kikuyo con un contenido de 17,8% de proteína y T4 (línea negra): 70% pasto Kikuyo con un contenido de 15,3% proteína, 20% biomasa y 10% harina de yuca.



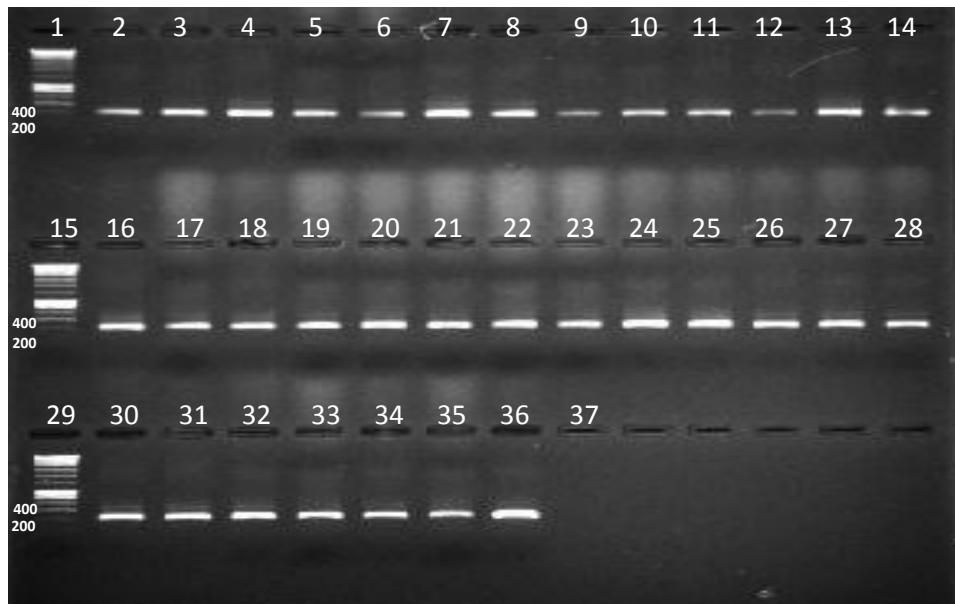
**Figura 2.** Esquema gráfico que representa el resultado de la cromatografía en capa delgada para la determinación de productos finales de la fermentación de glucosa hasta ácidos orgánicos analizada de manera independiente para cada una de las cepas. Valores de factor de retención ( $R_f$ ) de la cepa nativa ruminal 1, Valores de  $R_f$  de la cepa nativa ruminal 2 y valores de  $R_f$  de la cepa tipo ATCC #19171. Las manchas P (Propiónico), L (Láctico) S (succínico), B (Butírico) y F (Fórmico), corresponden al orden de los valores de  $R_f$  de cada ácido orgánico determinado en cada muestra, respectivamente.



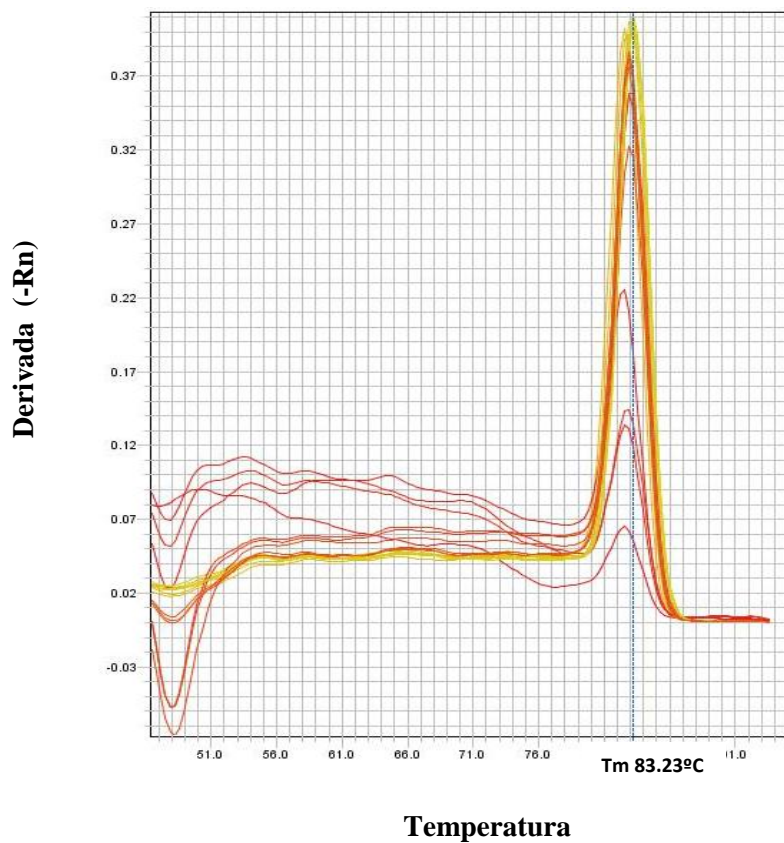
**Figura 3. Árbol filogenético consenso reconstruido según el criterio de máxima verosimilitud y basado en secuencias nucleotídicas parciales del gen ARNr 16S.** Se subrayan los aislamientos de *Butyrivibrio fibrisolvens* obtenidos en este estudio, se mencionan los números de acceso de las secuencias reportadas en el GenBank para cepas de referencia provenientes de diferentes estudios (Tabla 3). Los números adyacentes a las ramas indican los valores de Bootstrap >50% luego de 1.000 repeticiones. Como grupo externo se incluyó en el análisis una secuencia de *Clostridium oroticum*.



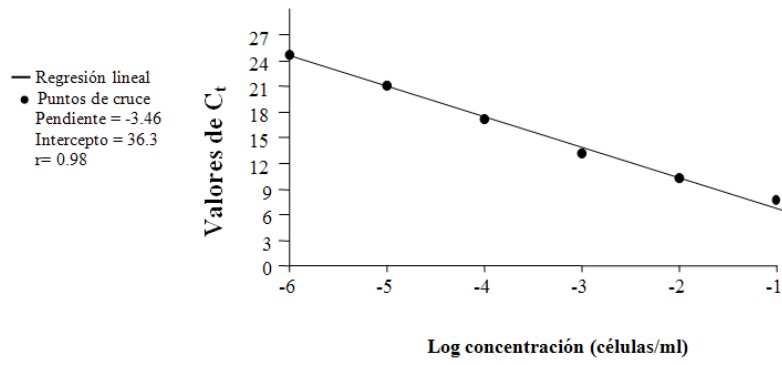
**Figura 4.** Árbol basado en la inferencia bayesiana mediante el programa Mr. Bayes analizando secuencias nucleotídicas parciales del gen ARNr 16S. Se subrayan los aislamientos de *Butyrivibrio fibrisolvens* obtenidos en este estudio, se indican los números de acceso de las secuencias reportadas en el GenBank para cepas de referencia provenientes de diferentes estudios (Tabla 3). Los números adyacentes a las ramas indican los valores de probabilidad “a posteriori”. Como grupo externo se incluyó en el análisis una secuencia de *Clostridium orticum*.



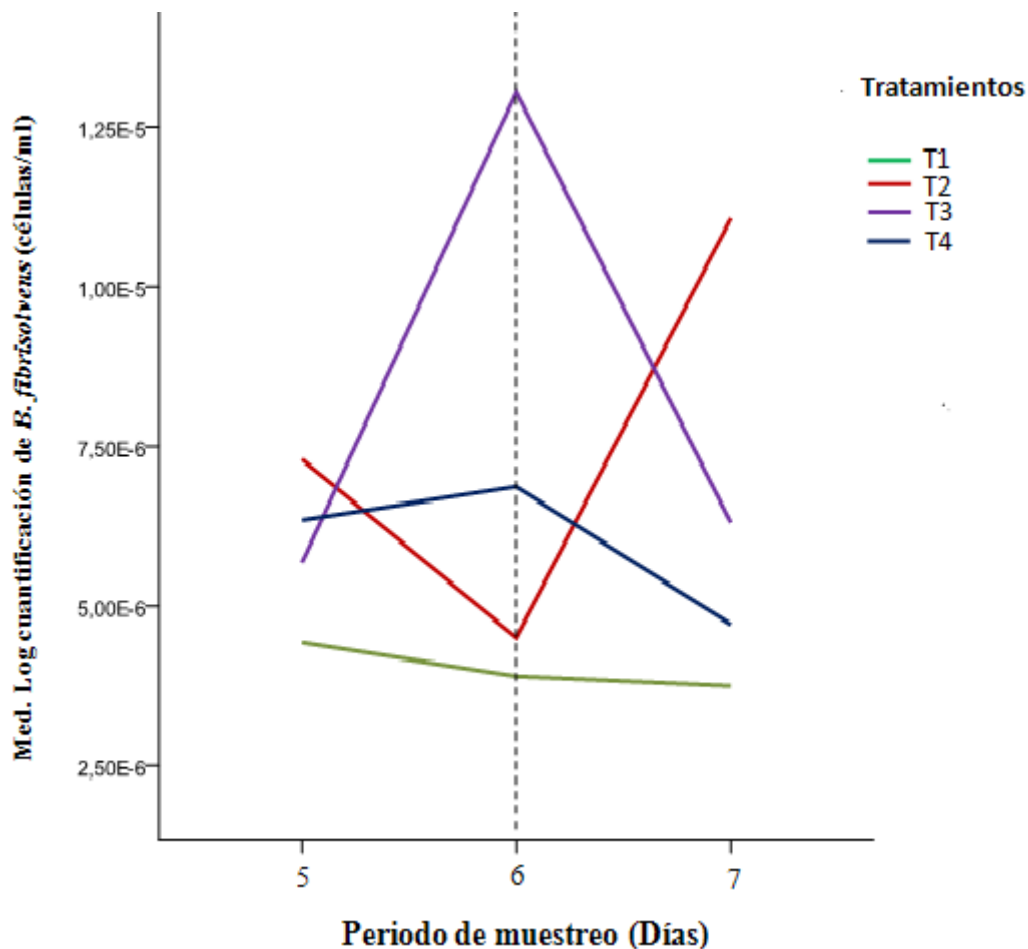
**Figura 5.** Amplificación de la secuencia nucleotídica parcial del gen ARNr 16S de *Butyrivibrio fibrisolvens* (producto de PCR esperado de 246 pb aproximadamente). Electroforesis de agarosa al 1%. Los carriles 1, 15 y 29 corresponden al marcador de peso molecular en pb. Carriles 2-14: Productos de PCR amplificados del ADN genómico extraído de las muestras de fluido ruminal tomadas del Rusitec. Carriles 16 y 17 corresponden al a la amplificación del ADN extraído de la cepa de referencia ATCC #19171. Carriles 18-36: ADN de referencia para la curva estándar, diluciones por triplicado de  $10^{-1}$  a  $10^{-6}$ . Carril 37: Control negativo - agua ultra pura.



**Figura 6.** Curva de fusión obtenida para las diferentes muestras cuantificadas en el equipo Applied Biosystems 7500 Fast Real Time PCR system. Temperatura de alineamiento de 83,23 °C definida y específica para el producto de amplificación del gen ARNr 16S.

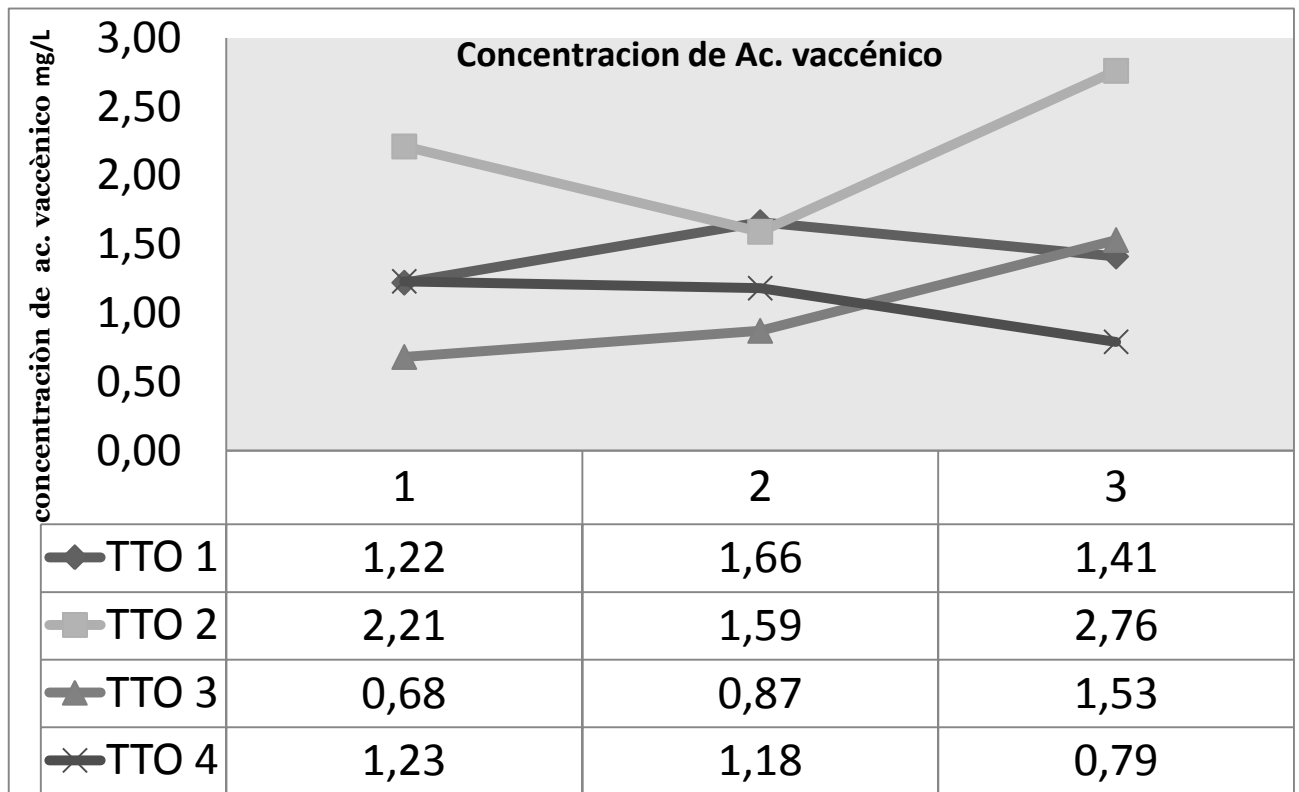


**Figura 7.** Curva estándar para la cuantificación de *B. fibrisolvens* mediante qPCR en tiempo real

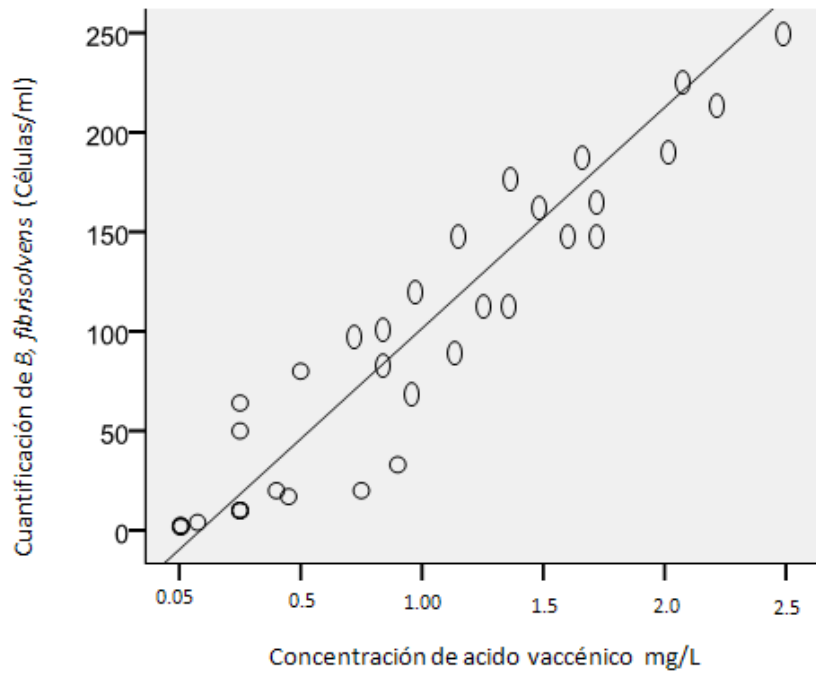


**Figura 8.** Densidad poblacional de *B. fibrisolvens* con respecto al periodo de muestreo en el Rusitec. T1/Control 1 (línea verde): 100% pasto Kikuyo con un contenido de 23,9% de proteína, T2 (línea roja): mezcla constituida por 70% pasto Kikuyo con un contenido de 19,4% de proteína, 20% biomasa y 10% harina de yuca, T3/Control 2 (línea morada): 100% pasto Kikuyo con un contenido de 17,8% de proteína y T4 (línea azul): 70% pasto Kikuyo con un contenido de 15,3% proteína, 20% biomasa y 10% harina de yuca.





**Figura 9.** Relación de la concentración de ácido vaccénico (mg/L) con respecto al tiempo de medición (días).



**Figura 10.** Relación de la concentración de ácido vaccénico (mg/L) con respecto a la densidad poblacional de *B. fibrisolvens*.