

Ruminal activators, general features and their advantages for feeding ruminants

Activadores ruminales, aspectos generales y sus ventajas en la alimentación de animales rumiantes

Juana Galindo, A. Elías, E. Muñoz, Yoandra Marrero, Niurca González and Areadne Sosa

Apartado Postal 24, San José de las Lajas, C.P. 32700, Mayabeque, Cuba

Email: jgalindo@ica.co.cu

This paper compiles information related to ruminant activators, their action mechanism and their function in fermentative processes produced in the rumen of the animals. It is composed by four sections: 1) particularities of the digestive system of ruminants, 2) ruminal microbial ecosystem, 3) manipulation of rumen fermentative processes and 4) ruminal activators. Rumen is presented as the largest of the pre-stomach compartments of ruminants, with one of the most complex ecosystems in nature. It integrates bacteria, fungi, protozoa, bacteriophages and, occasionally, yeasts and final products of fermentation (organic acids, ammonia and gases, among others). Fermentative processes that occur in this organ can be manipulated with the application of different strategies, aimed at modifying sensitive sites for microbial development, enzyme production, final products of microbial action, specifically the fermentation pattern, nutrient passage, and some others. One of the procedures for manipulating ruminal fermentation is the use of ruminant activators. These increase the digestive utilization of food consumed by the animals, which is transformed into higher voluntary intake and milk, meat and wool production.

Key words: rumen, bacteria, fungi, protozoa, VFA

INTRODUCTION

In ruminant animals, most of the energy and available protein is generated from ruminal fermentation. Volatile fatty acids provide energy for metabolic processes in these species. Microbial protein is produced from the fermentation of different nitrogen compounds (true protein and non-protein nitrogen) and of the energy available in rumen, besides being the main protein source for animals (most of metabolizable protein) under normal feeding conditions.

For many years, nutritionists have been working on the manipulation of ruminal fermentation processes, with the aim of achieving synchronization between energy and nitrogen metabolism in the rumen and, consequently, increasing the productive response of animals (Di Lorenzo *et al.* 2015, Henry *et al.* 2015 and Mercadante *et al.* 2015).

This review has the objective of compiling information related to ruminal activators, their action mechanism and their role in fermentative processes that occur in the rumen of animals.

Se compendia información relacionada con los activadores ruminales, su mecanismo de acción y su función en los procesos fermentativos que se producen en el rumen de los animales. Se estructura en cuatro acápite: 1) particularidades del sistema digestivo de los rumiantes, 2) ecosistema microbiano ruminal, 3) manipulación de los procesos fermentativos del rumen y 4) activadores ruminales. Se presenta el rumen como el mayor de los compartimientos preestomacales de los rumiantes, con uno de los ecosistemas más complejos de la naturaleza. En este se integran bacterias, hongos, protozoos, bacteriófagos y, de manera ocasional, levaduras y productos finales de la fermentación (ácidos orgánicos, amoníaco y gases, entre otros). Los procesos fermentativos que se producen en este órgano se pueden manipular con la aplicación de diferentes estrategias, encaminadas a modificar los sitios sensibles para el desarrollo microbiano, producción de enzimas, productos finales de la acción microbiana, específicamente el patrón de fermentación, pasaje de nutrientes, entre otros. Entre las vías que se pueden emplear para manipular la fermentación ruminal se encuentra el uso de activadores ruminales. Estos incrementan la utilización digestiva de los alimentos que consumen los animales, lo que se traduce en mayor consumo voluntario, producción de leche, carne y lana.

Palabras clave: rumen, bacterias, hongos, protozoos, AGV

INTRODUCCIÓN

En los animales rumiantes, la mayor parte de la energía y de la proteína disponible se genera a partir de la fermentación ruminal. Los ácidos grasos volátiles proveen energía para los procesos metabólicos en estas especies. La proteína microbiana se produce a partir de la fermentación de los diferentes compuestos nitrogenados (proteína verdadera y nitrógeno no proteico) y de la energía disponible en el rumen, además de constituir la fuente proteica principal para el animal (la mayor parte de la proteína metabolizable) en condiciones normales de alimentación.

Desde hace muchos años, los nutricionistas trabajan en la manipulación de los procesos de fermentación ruminal, con el propósito de alcanzar sincronización entre los metabolismos energéticos y nitrogenados en el rumen y, consecuentemente, elevar la respuesta productiva de los animales (Di Lorenzo *et al.* 2015, Henry *et al.* 2015 y Mercadante *et al.* 2015).

Esta revisión tiene como objetivo recopilar la información relacionada con los activadores ruminales, el mecanismo de acción de los mismos y su función en los procesos fermentativos que se producen en el rumen de los animales.

SPECIAL FEATURES OF DIGESTIVE SYSTEM OF RUMINANTS

Ruminants have distinctive characteristics regarding the rest of mammals because the rumen and the reticulum, two of the pre-stomach compartments, are inhabited by one of the most varied, dense and active microbial populations known in nature (protozoa, bacteria, fungi and bacteriophages), which have a significant function in the degradation of food consumed by animals (Galindo and Marrero 2005 and González *et al.* 2011).

Reticulum-rumen does not produce enzymes capable of hydrolyzing the β 1.4 and 1.6 glycosidic bonds within cellulose and other components that constitute the cell walls of plants. However, it contains a ruminal ecosystem with the largest enzymatic complex, which is the main site of degradation of cellulose, hemicellulose and lignin present in fibrous materials (Kung *et al.* 2000, Galindo *et al.* 2004, Masai *et al.* 2007 and Martínez-Anaya *et al.* 2008).

The rumen is the most voluminous reservoir of the digestive system and represents 70 to 75 % of the gastrointestinal tract. The microbial community that inhabits it is characterized by its high population density, wide diversity and complexity of interactions. In this organ, there are representatives of the three domains: bacteria, archaea and eukarya. It contains a large number of bacteria (more than 10^{11} cells \cdot mL⁻¹, comprising approximately 200 species), ciliate protozoa (10^4 - 10^6 cells \cdot mL⁻¹ distributed in 25 genera), anaerobic ruminal fungi (10^3 - 10^5 zoospores \cdot mL⁻¹ divided into six genera) and bacteriophages (10^7 - 10^9 particles \cdot mL⁻¹) (Mackie *et al.* 2002 and Kamra 2005). Different microbial groups can change significantly with time. From the agricultural point of view, among the factors that cause these changes, the most important is the diet of the host animal, but there is also the influence of other aspects like age of the animal, season and use of therapeutic and antibiotic growth promoters (Edwards *et al.* 2008).

As in any other ecosystem, the populations within the rumen interact with each other. An example of this is the important relationship between cellulolytic and non-cellulolytic microorganisms in forage degradation. The products of cellulose hydrolysis by *Ruminococcus flavefaciens* and *Fibrobacter succinogenes* are used as substrate for the growth of *Selenomonas ruminantium*. In turn, the disappearance of these products stimulates the fiber degradation of the first two (Sawanon and Kobayashi 2006). During the fiber digestion, *F. succinogenes* and *R. flavefaciens* produce succinate, which is transformed into propionate by *S. ruminantium*. Another case of positive relation is the one established between some protozoans and methanogenic archaea. Methanogens adhere to the entodiniomorphs, when H₂ is limiting, and provide them with vitamin B₁₂ that they are not able to synthesize (Tokura *et al.*, 1997). There are

PARTICULARIDADES DEL SISTEMA DIGESTIVO DE LOS RUMIANTES

Los rumiantes presentan características distintivas con respecto al resto de los mamíferos porque el rumen y el retículo, dos de los compartimientos preestomacales, se encuentran habitados por una de las más variadas, densas y activas poblaciones microbianas conocidas en la naturaleza (protozoos, bacterias, hongos y bacteriófagos), que desempeñan una función significativa en la degradación del alimento que consumen los animales (Galindo y Marrero 2005 y González *et al.* 2011).

El retículo-rumen no produce enzimas capaces de hidrolizar las uniones β 1,4 y 1,6 glucosídicas presentes en la celulosa y otros componentes que constituyen las paredes celulares de los vegetales. Sin embargo, contiene un ecosistema ruminal con el mayor complejo enzimático que se conoce, sitio principal de degradación de la celulosa, hemicelulosa y lignina presentes en los materiales fibrosos (Kung *et al.* 2000, Galindo *et al.* 2004, Masai *et al.* 2007 y Martínez-Anaya *et al.* 2008).

El rumen es el reservorio más voluminoso del sistema digestivo y representa del 70 al 75 % del tracto gastrointestinal. La comunidad microbiana que lo habita se caracteriza por su alta densidad de población, amplia diversidad y complejidad de interacciones. En este órgano se encuentran representantes de los tres dominios: bacteria, archaea y eucarya. Contiene un gran número de bacterias (más de 10^{11} células \cdot mL⁻¹, que comprenden aproximadamente 200 especies), protozoos ciliados (10^4 - 10^6 células \cdot mL⁻¹ distribuidos en 25 géneros), hongos anaerobios del rumen (10^3 - 10^5 zoosporas \cdot mL⁻¹ divididos en seis géneros) y bacteriófagos (10^7 - 10^9 partículas \cdot mL⁻¹) (Mackie *et al.* 2002 y Kamra 2005). Los diferentes grupos microbianos pueden cambiar significativamente con el tiempo. Desde el punto de vista agrícola, entre los factores que provocan estos cambios, el más importante es la dieta del animal hospedero, aunque también influyen otros aspectos como la edad del animal, la estación del año y el uso de terapéuticos y antibióticos promotores del crecimiento (Edwards *et al.* 2008).

Como en cualquier otro ecosistema, las poblaciones presentes en el rumen interactúan entre sí. Un ejemplo de ello es la importante relación entre microorganismos celulolíticos y no celulolíticos en la degradación de los forrajes. Los productos de la hidrólisis de la celulosa por *Ruminococcus flavefaciens* y *Fibrobacter succinogenes* sirven de sustrato para el crecimiento de *Selenomonas ruminantium*. A su vez, la desaparición de estos productos estimula la degradación de la fibra por las dos primeras (Sawanon y Kobayashi 2006). Durante la digestión de la fibra, *F. succinogenes* y *R. flavefaciens* producen succinato, que se convierte a propionato por *S. ruminantium*. Otro caso de relación positiva es la que se establece entre algunos protozoos

also competitive relationships between species for the substrates they need. An example of this is the reduction in colonization of plant cell walls by fungi with the presence of *Ruminococcus albus* and *R. flavefaciens* (Dehority and Tirabasso 2000).

THE RUMINAL MICROBIAL ECOSYSTEM

Bacteria constitute the largest and most diverse microbial community within the rumen, where they perform several vital functions. Among them, there are species with morphological types and varied groupings. According to the use of substrates and final products they produce, rumen bacteria are classified into cellulolytic, hemicellulolytic (Koike and Kobayashi 2001), amylolytic, proteolytic, sugar fermenters, bacteria that use acids, methanogenic (Whitford *et al.* 2001 and Stevenson y Weimer 2007), lipolytic, pectinolytic and vitamin synthesizing bacteria, as well as amino acid as a source of energy (Edwards *et al.*, 2004, Stevenson and Weimer 2007). They also appear in different amounts, depending on the animal species and the diet they consume (Sun *et al.* 2008, Welkie *et al.* 2010 and Yang *et al.* 2010).

Protozoa are organisms that have a relatively big size (between 15 and 200 microns). They are strict anaerobes and are commonly divided into two groups: holotricos and entodiniomorfic. The holotricos have the body surface covered of cilia and they are oval or rounded. They are mobile and use non-structural carbohydrates, basically soluble. Entodiniomorphs are more complex, in terms of their morphology, and more specific in their nutritional requirements (Kamra 2005).

Protozoans represent up to 40 % of the total microbial nitrogen and are responsible for 25 % of the cellulolytic activity in the rumen (Jouany 1996, Michalowski *et al.* 2001 and Béra-Maillet *et al.* 2005). They are considered as pH stabilizers because they include starch granules that come from the diet and thus suppress the potential damage of bacterial amylolytic fermentation to lactic acid and prevent nutritional disorders of lactic acidosis (Belzecki and Michalowski 2002). They decrease the use efficiency of protein by ingestion of bacteria, fungal zoospores, plant proteins and free amino acids, which the host consumes (Williams and Coleman 1992, Koenig *et al.* 2000, Nhan *et al.* 2001 and Santra *et al.* Karim 2002). For these and other characteristics, protozoa affect the speed of animal growth, the digestibility of the ration and the quality and quantity of microbial protein available at intestinal level.

Anaerobic fungi of rumen belong to the order of

y arqueas metanogénicas. Los metanógenos se adhieren a los entodiniomorfos, cuando el H_2 es limitante, y les suministran la vitamina B_{12} que estos no son capaces de sintetizar (Tokura *et al.* 1997). También se observan relaciones de competencia entre las especies por los sustratos que necesitan. Un ejemplo de ello es la reducción en la colonización de las paredes celulares de las plantas por hongos con la presencia de *Ruminococcus albus* y *R. flavefaciens* (Dehority y Tirabasso 2000).

EL ECOSISTEMA MICROBIANO RUMINAL

Las bacterias constituyen la mayor y más diversa comunidad microbiana presente en el rumen, donde realizan varias de las funciones vitales. Entre ellas se encuentran especies con tipos morfológicos y agrupaciones variadas. De acuerdo a la utilización de sustratos y productos finales que producen, las bacterias del rumen se clasifican en celulolíticas, hemicelulolíticas (Koike y Kobayashi 2001), amilolíticas, proteolíticas, fermentadoras de azúcares, bacterias que utilizan los ácidos, metanogénicas (Whitford *et al.* 2001, Cheng *et al.* 2009), lipolíticas, pectinolíticas y bacterias sintetizadoras de vitaminas y de aminoácidos como fuente de energía (Edwards *et al.* 2004 y Stevenson y Weimer 2007). También se presentan en cantidades diferentes según la especie animal y la dieta que consumen (Sun *et al.* 2008, Welkie *et al.* 2010 y Yang *et al.* 2010).

Los protozoos son organismos que presentan un tamaño relativamente grande (entre 15 y 200 micras). Son anaerobios estrictos y comúnmente se dividen en dos grupos: holotricos y entodiniomorfos. Los holotricos tienen la superficie del cuerpo cubierta de cilios y su forma es ovalada o redondeada. Son móviles y utilizan carbohidratos no estructurales, fundamentalmente solubles. Los entodiniomorfos son más complejos, en cuanto a su morfología, y más específicos en sus requerimientos nutritivos (Kamra 2005).

Los protozoos representan hasta 40 % del nitrógeno microbiano total y son responsables de 25 % de la actividad celulolítica en el rumen (Jouany 1996, Michalowski *et al.* 2001 y Béra-Maillet *et al.* 2005). Se consideran como estabilizadores del pH, debido a que engolfan gránulos de almidón que provienen de la dieta y de esta forma, suprimen el daño potencial de la fermentación amilolítica bacteriana a ácido láctico y previenen desórdenes nutricionales de la acidosis láctica (Belzecki y Michalowski 2002). Disminuyen la eficiencia de utilización de la proteína mediante la ingestión de bacterias, zoosporas de hongos, proteínas de las plantas y aminoácidos libres, que consume el hospedero (Williams y Coleman 1992, Koenig *et al.* 2000, Nhan *et al.* 2001 y Santra y Karim 2002). Por estas y otras características, los protozoos afectan la velocidad de crecimiento del animal, la digestibilidad de la ración y la calidad y cantidad de la proteína microbiana disponible a nivel intestinal.

Los hongos anaerobios del rumen pertenecen

the Neocallimastigales, from Neocallimastigomycota division. Up to this moment, six genera have been described, with more than 20 species (James *et al.* 2006 and Chen *et al.* 2007).

These microorganisms have great ability to colonize lignified cell walls and weaken fibrous tissues of plants (Edwards *et al.* 2008). They have a powerful enzymatic battery (cellulases, xylanases and esterases), which allows the degradation of structural components of the cell wall of plants and the fermentation of resulting monosaccharides (Srinivasan *et al.* 2001 and Rezaeian *et al.* 2005). By using substrates that are less accessible to bacteria and protozoa, they have a strategic function in the digestion of fibrous foods and are so important in the digestion of low quality forages (Lee *et al.* 2000).

The ruminal ecosystem is also integrated by final products of microbial fermentation that occurs in the organ, including volatile fatty acids (VFA) and other acids, ammonia, gases and others.

MANIPULATION OF FERMENTATIVE PROCESSES IN THE RUMEN

Manipulating ruminal fermentation is using a set of strategies with the purpose of activating or modifying the sensitive places of microbial development, enzyme production and final products of microbial action, specifically fermentation pattern and passage of nutrients, among others. This concept has been described in Cuba by Marty (1972), as an alternative for countries which food baseline for livestock is composed by low quality fibrous feeds. Since then, this concept has been expanded and, currently, may be used for modifying ruminal microbial fermentation, depending on the intended purpose (Galindo and Marrero 2005 and Edwards *et al.*, 2008).

The main aspects to be considered for modulation in ruminal fermentation are the following:

- Establish efficient fermentation by optimizing microbial growth, increasing the efficiency of ruminal microbial protein synthesis (Pierre *et al.* 2013), maximizing fiber digestion, SCFA production, stimulation of propionate production, reduction of methane production (Abdalla *et al.* 2008, 2012 and Abecia *et al.* 2012), control of lactate production and ruminal pH (Sosa *et al.* 2007 and Galindo *et al.* 2009).
 - Reach an efficient metabolism and nutrient balance.
 - Consider ruminal microorganism nutrition and the host animal.
 - Ensure the supply of bypass protein, which provides essential amino acids to the animal.
 - Provide bypass starch that supplies additional glucose.
 - Provide lipids, which contain long chain fatty acids for synthesis of tissues and milk fat.
- One of the most successful and relatively easy

al orden de los Neocallimastigales, de la división Neocallimastigomycota. Hasta la fecha se han descrito seis géneros, con más de 20 especies (James *et al.* 2006 y Chen *et al.* 2007).

Estos microorganismos tienen gran habilidad para colonizar paredes celulares lignificadas y debilitar los tejidos fibrosos de las plantas (Edwards *et al.* 2008). Poseen una potente batería enzimática (celulasas, xilanasas y esterases), que les permite la degradación de los componentes estructurales de la pared celular de las plantas y la fermentación de los monosacáridos resultantes (Srinivasan *et al.* 2001 y Rezaeian *et al.* 2005). Por utilizar sustratos que son menos accesibles a las bacterias y protozoos, desempeñan una función estratégica en la digestión de alimentos fibrosos y son tan importantes en la digestión de forrajes de baja calidad (Lee *et al.* 2000).

El ecosistema ruminal se integra además, por productos finales de la fermentación microbiana que se produce en el órgano, entre ellos los ácidos grasos volátiles (AGV) y otros ácidos, amoníaco, gases y otros.

MANIPULACIÓN DE LOS PROCESOS FERMENTATIVOS DEL RUMEN

Manipular la fermentación ruminal no es más que utilizar un conjunto de estrategias con el propósito de activar o modificar los sitios sensibles de desarrollo microbiano, producción de enzimas y productos finales de la acción microbiana, específicamente el patrón de fermentación y el pasaje de nutrientes, entre otros. Este concepto ha sido descrito en Cuba por Marty (1972), como alternativa para los países cuya base alimentaria para el ganado está compuesta por alimentos fibrosos de baja calidad. Desde entonces, este concepto se ha ampliado y en la actualidad se puede emplear para modificar la fermentación microbiana ruminal, en dependencia del propósito que se desee (Galindo y Marrero 2005 y Edwards *et al.* 2008).

Los aspectos fundamentales que se deben considerar para la modulación en la fermentación ruminal son los siguientes:

- Establecer una fermentación eficiente mediante la optimización del crecimiento microbiano, al incrementar la eficiencia de síntesis de proteína microbiana ruminal (Pierre *et al.* 2013), maximización de la digestión de la fibra, producción de AGCC, estimulación de la producción de propionato, reducción de la producción de metano (Abdalla *et al.* 2008, 2012 y Abecia *et al.* 2012), control de la producción de lactato y del pH ruminal (Sosa *et al.* 2007 y Galindo *et al.* 2009).
- Lograr un metabolismo y balance de nutrientes eficiente.
- Considerar la nutrición de los microorganismos del rumen y la del animal hospedero.
- Garantizar el aporte de proteína de sobrepaso, que provee de aminoácidos esenciales al animal.
- Suministrar almidón de sobrepaso, que provee suministro de glucosa adicional

practices in manipulation is to balance the diet considering the nutritional requirements of the animal and the microorganisms that inhabit the rumen (Elias 2000 and Zebeli *et al.* 2010). To manipulate ruminal microbial fermentation from the diet that is supplied, two ways can be used: to optimize the fermentation by the use of different management methods of the ration and to modify the feed before its supply to the animals.

In Cuba, the Instituto de Ciencia Animal, for more than 40 years, has worked on different techniques for achieving a better efficiency in ruminal fermentation. However, a project was carried out in 1996, which includes all the researches that follow the concept of manipulation of ruminal fermentation. The results are useful for the integration of technologies applied to productive systems (Galindo and Marrero 2005). From this concept, ruminal activators were successfully evaluated.

RUMINAL ACTIVATORS

Ruminal activators are products able to manipulate fermentative processes that are produced within the rumen and increase digestive use of feeds consumed by animals, which is transformed into an increase of voluntary intake, production of milk, meat and wool (Carro and Ranilla 2002, Díaz *et al.* 2005, 2009, 2011 and Galindo and Marrero 2005).

These activators may be liquid, solid, in grains, solid compact or as multinutritional blocks (MNB). They have to be supplied in small amounts and formulate them in a way that animals may regulate their intake for 24 hours. It means that they should not be consumed only once because small doses that get into the rumen at every moment of the day are able to activate the microbial flora that live in this reservoir. This guarantees that the rumen remains as a large continuous fermentation chamber.

The continuous fermentation chamber is a system or procedure in which fresh foods, nutrient solution and saliva are constantly introduced, which are mixed with the mass during the fermenting process that produces a constant outflow.

In general, the ruminal ecosystem is guaranteed by the regular supply of nutrients for microorganisms and the host animal, from food ingestion; the continuous removal of metabolic final products (by direct absorption through the walls of rumen or by passage into the lower parts of the gastrointestinal tract and by belching) and the relatively constant atmosphere of gases located at dorsal sac level.

One of the principles on which the technology of ruminant activators is based is to ensure that at every moment of the day the nutrients necessary for the synthesis of microbial protein exist in the rumen. If, at a given time, food arrives to the rumen,

- Suministrar lípidos, que contienen ácidos grasos de cadena larga para la síntesis de tejidos y grasa de la leche.

Una de las prácticas más acertadas y relativamente fáciles de realizar en materia de manipulación, es balancear la dieta considerando los requerimientos nutricionales del animal y de los microorganismos que habitan en el rumen (Elías 2000 y Zebeli *et al.* 2010). Para manipular la fermentación microbiana ruminal a partir de la dieta que se suministra, se pueden utilizar dos vías: optimizar la fermentación mediante el empleo de diferentes métodos de manejo de la ración y modificar el alimento antes de su suministro a los animales.

En Cuba, el Instituto de Ciencia Animal desde hace más de 40 años trabaja en diferentes técnicas para lograr mayor eficiencia en la fermentación ruminal, pero no es hasta 1996 que se conduce un proyecto que integra todas las investigaciones con el concepto de Manipulación de la Fermentación Ruminal. Los resultados obtenidos son útiles en la integración de tecnologías aplicadas a los sistemas productivos (Galindo y Marrero 2005). A partir de este concepto se evaluaron de manera exitosa los activadores ruminales.

LOS ACTIVADORES RUMINALES

Los activadores ruminales son productos capaces de manipular los procesos fermentativos que se producen en el rumen e incrementar la utilización digestiva de los alimentos que consumen los animales, lo que se traduce en incremento del consumo voluntario, producción de leche, carne y lana (Carro y Ranilla 2002, Díaz *et al.* 2005, 2009, 2011 y Galindo y Marrero 2005).

Los activadores se pueden elaborar en forma líquida, sólida, granulada, sólida compacta o como bloques multinutricionales (BMN). Se caracterizan porque se deben suministrar en pequeñas cantidades y formularlos de manera que los animales regulen su consumo durante 24 horas. Es decir, no deben consumirlos una sola vez, ya que las pequeñas dosis que arriban al rumen en cada momento del día son capaces de activar la flora microbiana que vive en ese reservorio. Esto garantiza que el rumen se mantenga como una gran cámara de fermentación continua.

La cámara de fermentación continua es un sistema o procedimiento en el que ingresan constantemente los alimentos frescos, solución nutritiva y saliva, que se mezclan con la masa en proceso de fermentación, en el que se produce flujo de salida constante.

En sentido general, el ecosistema ruminal se garantiza por el aporte regular de nutrientes para los microorganismos y el animal hospedero, procedentes de la ingestión de alimentos; la eliminación continua de productos finales del metabolismo (por absorción directa a través de las paredes del rumen o por pasaje hacia las partes bajas del tracto gastrointestinal y por eructación) y la atmósfera relativamente constante de gases situados al nivel del saco dorsal.

Uno de los principios en los que se sustenta la

the microbial balance is broken and, consequently, disorders and loss of nutrients by excretion occur. Feeding, once a day, produces decreases in pH and in the counts of protozoa and ruminal bacteria, which will be more or less drastic depending on the type of diet the animals receive. In contrast, the supply of small amounts several times a day produces smaller variations, because the rumen will resemble more closely the model of continuous fermentation previously explained.

ADVANTAGES OF USING RUMINAL ACTIVATORS

Ruminal activators increase the population of total viable and cellulolytic bacteria, and cellulolytic fungi in the rumen, stimulate the digestive function of the rumen by increasing the intake and digestibility of pastures and other low quality fibrous feeds, and maintain ruminal pH in optimal ranges for ruminal cellulolysis. They also increase the concentration of ammonia (NH_3) and the concentration of short chain fatty acids in the rumen (SCFA), increase milk production and reproductive state of animals and improve live weight gain in cattle, as well as their physical state and health.

Several researches have been carried out at the Instituto de Ciencia Animal in Cuba related to the use of ruminal activators, among them the so-called activating nitrogen supplements (ANS). They are formulations that include different relations of non-protein nitrogen (NPN) and true protein (TP), as well as the addition of pre-mixtures of vitamins and minerals. These nitrogen supplements were first used to activate the ruminal microbial populations of animals that consumed sugar cane forage. Table 1 shows different ANS formulations.

ANSs have been used in low-protein diets, such as diets based on sugar cane (Muñoz *et al.* 1986 and Galindo *et al.* 2004), in which the most important groups of cellulolytic bacteria in the rumen are reduced, and the microorganisms that should degrade the cellulose almost disappear. In such circumstances, nitrogen supplementation, either as true protein or NPN, increases the population and activity of ruminal microorganisms, mainly due to the fact that the first factor limiting the action of microorganisms and their activity is the low nutritional value of food consumed by animals. When this limiting factor disappears, a high proliferation of microorganisms is observed and, consequently, a better ruminal degradability of dry matter, neutral detergent fiber and acid detergent fiber is obtained.

In a general sense it has been shown that to be effective, rumen manipulating supplements should continuously provide adequate levels of ammonia nitrogen for constant growth of microorganisms.

tecnología de los activadores ruminales consiste en garantizar que en cada momento del día exista en el rumen los nutrientes necesarios para la síntesis de proteína microbiana. Si en un momento determinado arriban al rumen alimentos, se rompe el equilibrio microbiano y, consecuentemente, se producen desórdenes y pérdida de nutrientes por excreción. La alimentación, una vez al día, produce grandes disminuciones en el pH y en los conteos de protozoos y bacterias ruminales, el que será más o menos drástico en dependencia del tipo de dieta que reciben los animales. Por el contrario, el suministro de pequeñas cantidades varias veces al día, produce variaciones más pequeñas, ya que el rumen se asemejará más al modelo de fermentación continua antes explicado.

VENTAJAS DEL USO DE LOS ACTIVADORES RUMINALES

Los activadores ruminales incrementan la población de bacterias viables totales, celulolíticas y hongos celulolíticos en el rumen; estimulan la función digestiva del rumen, por lo que incrementan el consumo y la digestibilidad de pastos y otros alimentos fibrosos de baja calidad; mantienen el pH del rumen en rangos óptimos para la celulolisis ruminal; incrementan la concentración de amoníaco (NH_3) y la concentración de ácidos grasos de cadena corta en el rumen (AGCC); aumentan la producción de leche y el estado reproductivo de los animales y mejoran la ganancia de peso vivo en el ganado, así como su estado físico y de salud.

En el Instituto de Ciencia Animal de Cuba se han realizado numerosas investigaciones relacionadas con el uso de los activadores ruminales, entre ellos se destacan los denominados suplementos nitrogenados activadores (SNA). Estos consisten en formulaciones que abarcan diferentes relaciones de nitrógeno no proteico (NNP) y proteína verdadera (PV), así como la adición de premezclas de vitaminas y minerales. Estos suplementos nitrogenados se utilizaron, primeramente, para activar las poblaciones microbianas ruminales de animales que consumieron forraje de caña de azúcar. La tabla 1 presenta diferentes formulaciones de SNA.

Los SNA se han utilizado en dietas de bajo valor proteico, como son las dietas basadas en caña de azúcar (Muñoz *et al.* 1986 y Galindo *et al.* 2004) en las que se reducen los grupos más importantes de bacterias celulolíticas del rumen, y casi desaparecen los microorganismos que deben degradar la celulosa. En tales circunstancias la suplementación nitrogenada, ya sea en forma de proteína verdadera o NNP, incrementa la población y actividad de los microorganismos ruminales debido, principalmente, al hecho de que el primer factor que limita la acción de los microorganismos y su actividad, es el bajo valor nutritivo de los alimentos que consumen los animales. Cuando desaparece esta limitante, se observa una alta proliferación de microorganismos y consecuentemente, se obtiene una

Table 1. Composition of ANS, Muñoz *et al.* (1986)

Components	ANS-100	ANS -85	ANS -70
Bagasse pith	46.00	39.04	32.07
Urea	13.00	11.30	9.6
Final molasses	30.00	25.00	20.00
Sunflower meal	-	13.66	27.33
Na ₂ SO ₄	2.00	2.00	2.00
Vitamin premix AD ⁻¹	1.00	1.00	1.00
Mineral premix M-6	5.00	5.00	5.00
NaCl	3.00	3.00	3.00
Total	100	100	100
NPN: LW relation	100:0	85:15	70:30

M-6 mineral premix composition in g/kg is the following: (PO₄)₂ Ca₃, 500; NaCl, 400; CO₃Zn, 20; SO₄ Cu, 10; SO₄Fe, 27; SO₄Mg, 23; SO₄Co, 0.1, Sodium selenite, 0.02 and 19.86 of ground maize

AD⁻¹ vitamin premix provides 1,200,000 IU of vitamin A, 300,000 IU of vitamin D and they were mixed with 937.5 g of ground maize

By including high concentrations of salt-urea and molasses-urea, the fast intake of these supplements is suppressed.

In this sense, the best response to nitrogen supplementation is obtained with the formulation of supplements that combine NPN with the true protein. It provides the amino acids required for Novo synthesis of the protein in the rumen and contributes to the enzymatic activity due to the protein nature of enzymes.

Table 2 shows the effect of three formulations: ANS-100; ANS-85 and ANS-70 in the representation of different morphological groups of rumen bacteria.

In order to know the effect of these ruminal activators on the microbial population of the rumen, specifically cellulolytic fungi and bacteria, as well as the activity of their enzymes, Galindo and Marrero (2005), Sosa *et al.* (2010), and Galindo *et al.* (2011) performed different studies. Table 3 summarizes some of the results.

Muñoz *et al.* (1979), studied the effect of an activator (SNA) on milk production in cows grazing pangola (*Digitaria decumbens*), with 21 and 28 d of regrowth in dry period, with hay supplementation or not. Milk productions between 7.7-8.9 L cow.d⁻¹ were reached. Mean liveweight of cows was

mayor degradabilidad ruminal de la materia seca, fibra detergente neutro y fibra detergente ácido.

En sentido general se ha demostrado que para ser eficaces, los suplementos manipuladores del rumen, deben proporcionar de forma continua los niveles adecuados de nitrógeno amoniacal para el crecimiento constante de los microorganismos. Al incluir altas concentraciones de sal-urea y melaza-urea, se suprime el consumo rápido de estos suplementos.

En este sentido, la mayor respuesta a la suplementación nitrogenada se obtiene cuando se formulan suplementos que combinan el NNP con la proteína verdadera. Ésta proporciona los aminoácidos que se requieren para la síntesis de Novo de la proteína en el rumen y contribuye a la actividad enzimática debido a la naturaleza proteica de las enzimas.

La tabla 2 muestra el efecto de tres formulaciones: SNA-100; SNA-85 y SNA-70 en la representación de diferentes grupos morfológicos de bacterias del rumen.

Para conocer el efecto de estos activadores ruminales en la población microbiana del rumen, específicamente bacterias y hongos celulolíticos, así como la actividad de sus enzimas, Galindo y Marrero (2005), Sosa *et al.* (2010) y Galindo *et al.* (2011) realizaron diferentes trabajos. En la tabla 3 se resumen algunos de los resultados obtenidos.

Muñoz *et al.* (1979), estudiaron el efecto de un activador (SNA) en la producción de leche en vacas

Table 2. Effect of three formulations of activating nitrogen supplement (ANS) on ruminal bacteria population (Galindo *et al.* 2004)

Treatment	Total viable bacteria, 10 ¹⁰ cfu/mL	Proteolytic bacteria, 10 ⁶ cfu/mL	Amylolytic bacteria, 10 ⁶ cfu/mL	Cellulolytic bacteria, 10 ⁶ cfu/mL
Sugar cane	1.97 ^b (7.17)	0.59 ^b (1.80)	1.55 (4.53)	0.42 ^d (1.52)
Sugar cane + ANS-100%	2.03 ^{ab} (7.61)	0.77 ^{ab} (2.16)	2.28 (9.77)	0.79 ^c (2.20)
Sugar cane + ANS-85%	2.08 ^a (8.00)	0.92 ^a (2.50)	2.22 (9.23)	1.28 ^b (3.59)
Sugar cane + ANS-70%	2.13 ^a (8.41)	1.15 ^a (3.16)	2.32 (10.17)	2.01 ^a (7.46)
SE ±	0.03 ^{**}	0.21 [*]	0.25	0.04 ^{**}

Table 3. Example of different formulations of ruminal activators in the population of cellulolytic bacteria of the rumen (10^5 cfu.mL⁻¹ of ruminal liquor)

Feeding, sugar cane forage	Cellulolytic bacteria*
Without supplementation	0.50
Ruminal activator ANS-77	1.56
Ruminal activator ANS -77 + hay	2.45
Ruminal activator ANS -77 + 2.5 % of green forage	18.50
Ruminal activator ANS -77 + 5 % of green forage	15.60
Ruminal activator ANS -100 % (NPN/LW= 100/0)	97.70
Ruminal activator ANS -85 % (NPN/LW = 85/15)	97.30
Ruminal activator ANS -70 % (NPN/LW = 70/30)	101.7

10⁶cfu/mL; colony forming units. mL⁻¹ of ruminal liquor

460 kg. The activator had a better productive effect in animals grazing pangola at 28 d of age with respect to 21 d. This demonstrates their potential in food of bad quality. Likewise, higher voluntary intake of the activator was found.

Other group of studies developed by Muñoz *et al.* (1984, 1985, 1986, 1991) demonstrated the effect of ruminal activators obtained from different NPN/LW relations on milk production of cows grazing different tropical grasses, as well as sugar cane, alone or supplemented with hay and grass silage.

Table 4 shows DM degradability of two ruminal activators, known as ANS-77 and ANS -100 in three seasons of the year

González *et al.* (1989, 1990) demonstrated the role of ruminal activators in the degradation kinetics of DM, NDF, ruminal turnover speed and retention time of rumen particles in cows with sugar cane diets supplemented or not with another fibrous source. It was demonstrated that animals are able to self-regulate voluntary intake of the activator during the day. This makes the rumen better able to degrade fibrous materials, while maintaining its characteristic of continuous fermentation system.

que pastaban pangola (*Digitaria decumbens*), de 21 y 28 d de rebrote en secano, con suplementación de heno o no. Se alcanzaron producciones de leche entre 7.7-8.9 L vaca.d⁻¹. El peso vivo promedio de las vacas fue de 460 kg. El activador tuvo mejor efecto productivo en los animales que pastaban pangola a los 28 d de edad con respecto a los 21 d. Esto demuestra su potencial en alimentos de peor calidad. Igualmente se encontraron mayores consumos voluntarios del activador.

En otro grupo de trabajos desarrollados por Muñoz *et al.* (1984, 1985, 1986, 1991) se demostró el efecto de los activadores ruminales obtenidos a partir de diferentes relaciones NNP/PV en la producción de leche de vacas alimentadas en pastoreo con diferentes pastos tropicales, así como con caña de azúcar, sola o suplementada con heno y ensilaje de gramíneas.

La tabla 4 muestra la degradabilidad de la MS de dos activadores ruminales, denominados SNA-77 y SNA-100 en tres épocas del año

González *et al.* (1989, 1990) demostraron la función de los activadores ruminales en la cinética de degradación de la MS, la FDN, velocidad de recambio ruminal y tiempo de retención de las partículas en el rumen de vacas en dietas de caña de azúcar con suplementación o no de otra fuente fibrosa. Se demostró que los animales son capaces

Tabla 4. Effect of ANS-100 and ANS-77 in DM degradability in three seasons of the year of cows grazing in Pangola (*D. decumbens*) (Muñoz *et al.* 1985)

Treatment	Spring	Summer	Dry
Pangola, control	61.4 ^a	41.2 ^a	56.7 ^a
Pangola + ANS - 100	66.9 ^b	53.8 ^b	61.4 ^b
Pangola + ANS - 77	66.8 ^b	51.7 ^b	60.3 ^b
SE ±	0.6**	3.3**	0.4**

ANS-100= 100 % of NPN as nitrogen source; ANS-77= 77 % NPN and 33 % LW

The ruminal activator denominated “Granulado Jordán” (Jordán 2001) also showed important advantages, when it was used in fattening cow systems in pastures with irrigation and fertilizers. Between 124 and 145 d of fattening, DMG of 0.982 and 1.029 kg/animal.d⁻¹ were obtained, with carcass yields of 52-57 % (figure 1). However, with this same technology in low-input systems with grazing of *Panicum maximum* and *Cynodon nlemfuensis* (50/50), gains were 0.900 and 1.12 kg/animal.d⁻¹ in fattening periods of 228 and 160 d, respectively. The activator intake was 1.32 and 1.46 kg/animal.d⁻¹. Intake of this product, compared to soy intake, doubled the population of ruminal cellulolytic fungi and bacteria. Cellulolytic activity and specific activity of cellulase enzyme complex were quintupled and, consequently, a higher concentration of reducing sugars was available in the ruminal liquor.

Multinutritional blocks (MNB) were studied by Mejías *et al.* (2000) in two research projects.

de autorregular el consumo voluntario del activador durante el día. Esto coloca al rumen en mejores condiciones de degradar los materiales fibrosos, manteniendo su propiedad de sistema de fermentación continuo.

El activador ruminal denominated Granulado Jordán (Jordán 2001) también mostró ventajas importantes, cuando se utilizó en sistemas de ceba vacuna en pastos con riego y fertilizantes. Entre 124 y 145 d de ceba se obtuvieron GMD de 0,982 y 1.029 kg/animal.d⁻¹, con rendimientos en canal de 52-57 % (figura 1). Sin embargo, con esta misma tecnología en sistemas de bajos insumos con pastoreo de *Panicum maximum* y *Cynodon nlemfuensis* (50/50), las ganancias fueron de 0.900 y 1.12 kg/animal.d⁻¹ en períodos de ceba de 228 y 160 d, respectivamente. El consumo del activador fue 1.32 y 1.46 kg/animal.d⁻¹. El consumo de este producto, en comparación con el consumo de soya, duplicó la población de bacterias y hongos celulolíticos ruminales. La actividad celulolítica y la actividad específica del complejo de enzimas celulasas se quintuplicaron y, consecuentemente, se dispuso de mayor concentración de

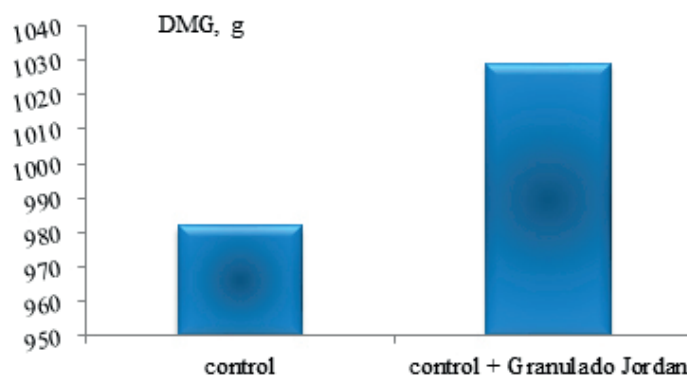


Figure 1. Effect of “Granulado Jordán” on daily mean gain (DMG) in grazing systems with irrigation and fertilization

These authors found increases in milk production, as well as improvements in the metabolic profile and reproductive response, due to the systematic contribution of minerals received by the animals that consume it.

BMNs provide ruminants with a balanced and synchronized supply of nutrients. In addition, block technology involves cheap ingredients, such as agroindustrial by-products, which are also easily implemented. These products are used in different ruminant species with good results, in terms of forage use and improvements of productive performance of animals (Mejías *et al.*, 2000).

INGREDIENTS THAT CAN BE USED FOR THE FORMULATION OF RUMINAL ACTIVATORS AND THEIR CHEMICAL COMPOSITION

Table 5 shows some of the ingredients that can be used for the formulation of ruminal activators. It is essential to emphasize the importance of including

azúcares reductores en el líquido ruminal.

Los bloques multinutricionales (BMN) fueron estudiados por Mejías *et al.* (2000) en dos proyectos de investigación. Estos autores encontraron incrementos en la producción de leche de vaca, así como mejoras en el perfil metabólico y respuesta reproductiva, debido al aporte sistemático de minerales que reciben los animales que lo consumen.

Los BMN permiten a los rumiantes un suministro balanceado y sincronizado de nutrientes. Además, la tecnología de los bloques implica ingredientes baratos, como los subproductos agroindustriales, que son además de fácil implementación. Estos productos se utilizan en diferentes especies de rumiantes con resultados satisfactorios, en cuanto al aprovechamiento de los forrajes y mejoras en el comportamiento productivo de los animales (Mejías *et al.* 2000).

INGREDIENTES QUE SE PUEDEN UTILIZAR PARA LA FORMULACIÓN DE LOS ACTIVADORES RUMINALES Y SU COMPOSICIÓN QUÍMICA

La tabla 5 muestra algunos de los ingredientes que

a product of low palatability into the mixture, which function is to regulate voluntary intake. In this case, sulfates or common salt may be used.

Table 6 shows the composition of the ruminal

se pueden utilizar para la formulación de los activadores ruminales. Es importante destacar la importancia de incorporar a la mezcla un producto de baja palatabilidad, cuya función es regular el consumo voluntario. En este

Table.5. Ingredients included in the formulation of ruminal activators

Source origin	Ingredient	Inclusion, %
Protein source, meals of:	fish, sunflower, soy, yeast, fungi, others	0-30
NPN	urea, ammonia sulfates, sodium, magnesium, poultry manure	1-10
Vitamins	A and B vitamin premix	1-1,5
Fiber sources	Filter cake mud, dry sugar cane, bagasse pith, tree foliage, others	10-50
Energy sources	Sugar cane molasses, glycerol, sugar cane juice	10-50
Cereal by-products	rice, wheat, others	10-20
Minerals	Complete mixture	1- 5

activators. Nitrogen/sulfur relation is very important, which is adequate to guarantee synthesis of sulfur amino acids by rumen microorganisms.

The technology of the ruminal activators of the Instituto de Ciencia Animal was successfully transferred to the Oriental Republic of Uruguay. In addition, in different Cuban companies, new formulations are implemented that fulfill the requirements they were designed for.

It can be concluded that the use of ruminal activators as a manipulating strategy for ruminal fermentation is adequate and contributes to the stable functioning of the rumen. Therefore, it is necessary to expect a better digestive utilization of foods consumed by animals and, consequently, higher productivity.

caso, se pueden usar sulfatos o sal común.

En la tabla 6 se presenta la composición de los activadores ruminales. Se destaca de gran importancia la relación nitrógeno/azufre, que es adecuada para garantizar la síntesis de aminoácidos azufrados por los microorganismos del rumen.

La tecnología de los activadores ruminales del Instituto de Ciencia Animal se transfirió de manera exitosa a la República Oriental del Uruguay. Además, en diferentes empresas cubanas se ejecutan nuevas formulaciones que cumplen con los principios para las que se diseñaron.

Se concluye que la utilización de los activadores ruminales, como estrategia manipuladora de la fermentación ruminal, es adecuada y contribuye al funcionamiento estable del rumen, por lo que se debe esperar mayor utilización digestiva de los alimentos que consumen los animales y consecuentemente, mayor productividad.

Table. 6. Composition of ruminal activators

Indicator	Quantity
Humidity	10-20%
CP	200-250 g/kg DM
ME	5.43 a 10.57 MJ/kg of DM
N:S	10:1 – 12:1
Urea	100-120 g/kg
Mineral salts	70-130 g/kg
CP-crude protein	
ME-metabolizable energy	
N-nitrogen	
S-sulfur	

REFERENCES

- Abdalla, A. L., Filho, J. C. da S., Godoi, A. R. de, Carmo, C. de A. & Eduardo, J. L. de P. 2008. "Utilização de subprodutos da indústria de biodiesel na alimentação de ruminantes". Revista Brasileira de Zootecnia, 37(SPE): 260-268, ISSN: 1516-3598, DOI: 10.1590/S1516-35982008001300030.
- Abdalla, A. L., Louvandini, H., Sallam, S. M. A. H., Bueno, I. C. da S., Tsai, S. M. & Figueira, A. V. de O. 2012. "In vitro

- evaluation, in vivo quantification, and microbial diversity studies of nutritional strategies for reducing enteric methane production". *Tropical Animal Health and Production*, 44(5): 953–964, ISSN: 0049-4747, 1573-7438, DOI: 10.1007/s11250-011-9992-0.
- Abecia, L., Toral, P. G., Martín-García, A. I., Martínez, G., Tomkins, N. W., Molina-Alcaide, E., Newbold, C. J. & Yáñez-Ruiz, D. R. 2012. "Effect of bromochloromethane on methane emission, rumen fermentation pattern, milk yield, and fatty acid profile in lactating dairy goats". *Journal of Dairy Science*, 95(4): 2027–2036, ISSN: 0022-0302, DOI: 10.3168/jds.2011-4831.
- Belzecki, G. & Michalowski, T. 2002. "The role of the ciliate *Eudiplodinium maggii* in starch digestion in the rumen". *Reproduction Nutrition Development*, 42(1): 78–78, ISSN: 1297-9708, 0003-388X.
- Béra-Maillet, C., Devillard, E., Cezette, M., Jouany, J.-P. & Forano, E. 2005. "Xylanases and carboxymethylcellulases of the rumen protozoa *Polyplastron multivesiculatum*, *Eudiplodinium maggii* and *Entodinium sp.*". *FEMS Microbiology Letters*, 244(1): 149–156, ISSN: 0378-1097, DOI: 10.1016/j.femsle.2005.01.035.
- Carro, M. D. & Ranilla, M. J. 2002. "Los aditivos antibióticos promotores del crecimiento de los animales: situación actual y posibles alternativas". *Exopol: circular*, 90(7), Available: <<http://ecaths1.s3.amazonaws.com/zootecniageneral2/1641923393.Los%20Aditivos%20Antibi%C3%B3ticos%20y%20PromotoresR.doc>>, [Consulted: May 13, 2017].
- Chen, Y.-C., Tsai, S.-D., Cheng, H.-L., Chien, C.-Y., Hu, C.-Y. & Cheng, T.-Y. 2007. "*Caecomyces sympodialis sp. nov.*, a new rumen fungus isolated from *Bos indicus*". *Mycologia*, 99(1): 125–130, ISSN: 0027-5514.
- Cheng, Y. F., Mao, S. Y., Liu, J. X. & Zhu, W. Y. 2009. "Molecular diversity analysis of rumen methanogenic Archaea from goat in eastern China by DGGE methods using different primer pairs". *Letters in Applied Microbiology*, 48(5): 585–592, ISSN: 1472-765X, DOI: 10.1111/j.1472-765X.2009.02583.x.
- Dehority, B. A. & Tirabasso, P. A. 2000. "Antibiosis between Ruminant Bacteria and Ruminant Fungi". *Applied and Environmental Microbiology*, 66(7): 2921–2927, ISSN: 0099-2240, 1098-5336, DOI: 10.1128/AEM.66.7.2921-2927.2000.
- Di Lorenzo, N., Rostoll, L., Ardanaz, S., Guevara-Ballesteros, R., García-Ascolani, M. & Ruiz-Moreno, M. 2015. "Manipulación de la fermentación ruminal para mejorar la productividad en ganado bovino". In: XVII Congreso Bienal AMENA, Marianna, FL, USA: University of Florida - North Florida Research and Education Center, Available: <<http://www.engormix.com/MA-avicultura/eventos/xvii-congreso-bienal-amena-t2288-conferencias.htm>>, [Consulted: May 13, 2017].
- Díaz, A., Castillo, E., Martín, P. C. & Hernández, J. L. 2005. "Comportamiento productivo de añejos Cebú en pastoreo de asociación de glycine (*Neonotonia wightii*) y pasto natural, suplementados con un activador de la fermentación ruminal". *Cuban Journal of Agricultural Science*, 39(3), ISSN: 2079-3480, Available: <<http://repositoriodigital.academica.mx/jspui/handle/987654321/386841>>, [Consulted: May 13, 2017].
- Díaz, A., Castillo, E., Martín, P. C. & Hernández, J. L. 2009. "Ceba de toros mestizos lecheros, en silvopastoreo con leucaena, acceso a banco de biomasa y suplemento activador del rumen". *Cuban Journal of Agricultural Science*, 43(3): 235–238, ISSN: 2079-3480.
- Díaz, A., Castillo, E., Martín, P. & Hernández, J. L. 2011. "Preceba de machos bovinos mestizos lecheros en pastoreo con leguminosas herbáceas, banco de biomasa y suplemento activador del rumen". *Cuban Journal of Agricultural Science*, 45(1): 25–28, ISSN: 2079-3480.
- Edwards, J. E., Huws, S. A., Kim, E. J., Lee, M. R. F., Kingston-Smith, A. H. & Scollan, N. D. 2008. "Advances in microbial ecosystem concepts and their consequences for ruminant agriculture". *Animal: An International Journal of Animal Bioscience*, 2(5): 653–660, ISSN: 1751-7311, DOI: 10.1017/S1751731108002164.
- Edwards, J. E., McEwan, N. R., Travis, A. J. & Wallace, R. J. 2004. "16S rDNA library-based analysis of ruminal bacterial diversity". *Antonie van Leeuwenhoek*, 86(3): 263–281, ISSN: 0003-6072, 1572-9699, DOI: 10.1023/B:AN TO.0000047942.69033.24.
- Eliás, A. 2000. "Efectos de las fuentes de energía en algunos de los productos finales de la fermentación ruminal". *Cuban Journal of Agricultural Science*, 34(4): 321, ISSN: 2079-3480.
- Galindo, J., González, N., Sosa, A., Ruiz, T., Torres, V., Aldana, A., Díaz, H., Moreira, O., Sarduy, L. & Noda, A. 2011. "Efecto de *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) Gray (Botón de oro) en la población de protozoos y metanógenos ruminales en condiciones *in vitro*". *Cuban Journal of Agricultural Science*, 45(1): 33–37, ISSN: 2079-3480.
- Galindo, J. & Marrero, Y. 2005. "Manipulación de la fermentación microbiana ruminal". *Cuban Journal of Agricultural Science*, 39(Suppl. 1): 439–450, ISSN: 2079-3480.
- Galindo, J., Marrero, Y., González, N. & Aldama, A. I. 2004. "Caracterización de la actividad celulolítica en el líquido de rumen filtrado". *Cuban Journal of Agricultural Science*, 38(3): 259, ISSN: 2079-3480.
- Galindo, J., Marrero, Y., Ruiz, T. E., González, N., Díaz, A., Aldama, A. I., Moreira, O., Hernández, J. L., Torres, V. & Sarduy, L. 2009. "Efecto de una mezcla múltiple de leguminosas herbáceas y *Leucaena leucocephala* en la población microbiana y productos fermentativos del rumen de añejos mestizos de Cebú". *Cuban Journal of Agricultural Science*, 43(3), ISSN: 2079-3480, Available: <<http://repositoriodigital.academica.mx/jspui/handle/987654321/386592>>, [Consulted: May 13, 2017].
- González, N., Galindo, J., Aldana, A. I., Moreira, O. & Sarduy, L. 2011. "Effect of four mulberry (*Morus alba* Linn.) varieties on microbial population and fermentative products with rumen liquid from river buffaloes (*Bubalus bubalis*) under *in vitro* conditions". *Cuban Journal of Agricultural Science*, 45(4), ISSN: 2079-3480, Available: <<http://cjas.science.com/index.php/CJAS/article/view/99>>, [Consulted: May 13, 2017].
- González, R., Muñoz, E., Alfonso, F., González, R. M. & Enrique, A. V. 1989. "Caña de azúcar como forraje para la producción de leche. I. Efecto de la inclusión de forraje de pasto estrella (*Cynodon nlemfuensis*) en el consumo y digestibilidad del alimento". *Cuban Journal of Agricultural Science*, 23(2): 131–136, ISSN: 2079-3480.
- González, R., Muñoz, E., Ruiz, R., Cairo, J. G. & González, M. R. 1990. "Caña de azúcar como forraje para la producción de leche. II. Efecto de la inclusión de heno de pasto estrella (*Cynodon nlemfuensis*) en el consumo de alimentos". *Cuban*

- Journal of Agricultural Science, 24(2): 151–155, ISSN: 2079-3480.
- Henry, D. D., Ruiz-Moreno, M., Ciriaco, F. M., Kohmann, M., Mercadante, V. R. G., Lamb, G. C. & DiLorenzo, N. 2015. "Effects of chitosan on nutrient digestibility, methane emissions, and *in vitro* fermentation in beef cattle". Journal of Animal Science, 93(7): 3539–3550, ISSN: 1525-3163, DOI: 10.2527/jas.2014-8844.
- James, T. Y., Letcher, P. M., Longcore, J. E., Mozley-Standridge, S. E., Porter, D., Powell, M. J., Griffith, G. W. & Vilgalys, R. 2006. "Chytridiomycota: 14 clades of flagellated fungi". Mycologia, 98(6): 860–871, ISSN: 0027-5514.
- Jordán, H. 2001. Suplemento Granulado como activador ruminal. no. CU 22660 A1. A23K 1/18, ONPI.
- Jouany J. P 1996. "Effect of rumen protozoa on nitrogen utilization by ruminants". The Journal of nutrition, 126(Suppl. 4): 1335S–46S, ISSN: 0022-3166.
- Kamra, D. N. 2005. "Rumen microbial ecosystem". Current Science, 89(1): 124–135, ISSN: 0011-3891.
- Koenig, K. M., Newbold, C. J., McIntosh, F. M. & Rode, L. M. 2000. "Effects of protozoa on bacterial nitrogen recycling in the rumen". Journal of Animal Science, 78(9): 2431–2445, ISSN: 0021-8812.
- Koike, S. & Kobayashi, Y. 2001. "Development and use of competitive PCR assays for the rumen cellulolytic bacteria: *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* and *Ruminococcus flavefaciens*". FEMS Microbiology Letters, 204(2): 361–366, ISSN: 0378-1097, DOI: 10.1111/j.1574-6968.2001.tb10911.x.
- Kung, L., Treacher, R. J., Nauman, G. A., Smagala, A. M., Endres, K. M. & Cohen, M. A. 2000. "The Effect of Treating Forages with Fibrolytic Enzymes on its Nutritive Value and Lactation Performance of Dairy Cows¹". Journal of Dairy Science, 83(1): 115–122, ISSN: 0022-0302, DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(00)74862-4.
- Lee, S. S., Ha, J. K. & Cheng, K.-J. 2000. "Relative Contributions of Bacteria, Protozoa, and Fungi to *In vitro* Degradation of Orchard Grass Cell Walls and Their Interactions". Applied and Environmental Microbiology, 66(9): 3807–3813, ISSN: 0099-2240, 1098-5336, DOI: 10.1128/AEM.66.9.3807-3813.2000.
- Mackie, R. L., Mc Sweeney, C. S. & Klieve, A. V. 2002. "Microbial ecology of ovine rumen". In: Freer, M. & Dove, H. (eds.), Sheep nutrition, Wallingford, Oxon, UK; New York, NY, USA: CABI Publishing - CSIRO Publishing, ISBN: 978-0-85199-877-0, Available: <<http://dx.doi.org/10.1079/9780851995953.0000>>, [Consulted: May 13, 2017].
- Martínez-Anaya, C., Balcázar-López, E., Dantán-González, E. & Folch-Mallol, J. L. 2008. "Celulasas fúngicas: Aspectos biológicos y aplicaciones en la industria energética". Revista Latinoamericana de Microbiología, 50(3–4): 119–131, ISSN: 0187-4640.
- Marty, R. J. 1972. "Manipulación de la fermentación ruminal". Cuban Journal of Agricultural Science, 6(2): 163–176, ISSN: 2079-3480.
- Masai, E., Katayama, Y. & Fukuda, M. 2007. "Genetic and Biochemical Investigations on Bacterial Catabolic Pathways for Lignin-Derived Aromatic Compounds". Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 71(1): 1–15, ISSN: 0916-8451, 1347-6947, DOI: 10.1271/bbb.60437.
- Mejías, R., García-López, R. & Rodríguez, J. 2000. "Nivel de urea en bloques multi nutricionales (BMN) en el consumo de heno por carneros estabulados". Cuban Journal of Agricultural Science, 34(1): 27–30, ISSN: 2079-3480.
- Mercadante, V. R. G., Waters, K. M., Marquezini, G. H. L., Henry, D. D., Ciriaco, F. M., Arthington, J. D., DiLorenzo, N. & Lamb, G. C. 2015. "Effects of anti-phospholipase A antibody supplementation on dry matter intake feed efficiency, acute phase response, and blood differentials of steers fed forage- and grain-based diets". Journal of Animal Science, 93(2): 776–785, ISSN: 1525-3163, DOI: 10.2527/jas.2014-7958.
- Michalowski, T., Rybicka, K. & Kasperowicz, A. 2001. "Ability of the rumen ciliate *Epidinium ecaudatum* to digest and use crystalline cellulose and xylan for *in vitro* growth". Acta Protozoologica, 40(3): 203–210, ISSN: 0065-1583.
- Muñoz, E., Elías, A. & Suárez, J. 1979. "Suplementos nitrogenados y heno para vacas lecheras en pastoreo de pangola durante la época de lluvias". Cuban Journal of Agricultural Science, 13(3): 253–261, ISSN: 2079-3480.
- Muñoz, E., Elías, A. & Suárez, J. 1985. "Utilización de suplementos con alto contenido de NNP para raciones forrajeras. 3. Efecto en la digestibilidad *in situ* del pasto pangola (*Digitaria decumbens* Stent)". Cuban Journal of Agricultural Science, 19(2): 145–152, ISSN: 2079-3480.
- Muñoz, E., Elías, A. & Suárez, J. D. 1984. "Utilización de suplementos con alto contenido de NNP en raciones forrajeras. 1. Efecto en la digestibilidad *in situ* del forraje de pasto estrella (*Cynodon nlemfuensis*)". Cuban Journal of Agricultural Science, 18(1): 27–32, ISSN: 2079-3480.
- Muñoz, E., Elías, A. & Suárez, J. D. 1986. "Utilización de suplementos con alto contenido de NNP para raciones forrajeras. 4. Efecto en la digestión *in situ* de la materia seca y orgánica del ensilado de pastos". Cuban Journal of Agricultural Science, 20(2): 137–141, ISSN: 2079-3480.
- Muñoz, E., Elías, A. & Suárez, J. D. 1991. "Utilización de suplementos con alto contenido de NNP para raciones forrajeras. 5. Efecto de la proteína natural en el comportamiento productivo de las vacas lecheras en pasto de secano". Cuban Journal of Agricultural Science, 25(1): 19–25, ISSN: 2079-3480.
- Nhan, N. T. H., Van Hon, N., Ngu, N. T., Von, N. T., Preston, T. R. & Leng, R. A. 2001. "Practical Application of Defaunation of Cattle on Farms in Vietnam: Response of Young Cattle Fed Rice Straw and Grass to a Single Drench of Groundnut Oil". Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, 14(4): 485–490, ISSN: 1011-2367, DOI: 2001.14.4.485.
- Pierre, G., Benjamin, H. & Makkar, H. P. S. 2013. Mitigación de las emisiones de gases de efecto invernadero en la producción ganadera. Una revisión de las opciones técnicas para la reducción de las emisiones de gases diferentes al CO₂. (ser. FAO Producción y Sanidad Animal, no. ser. 117), Roma, Italy: FAO, 251 p., Available: <<http://www.fao.org/docrep/019/i3288s/i3288s.pdf>>, [Consulted: May 13, 2017].
- Pinos-Rodríguez, J. M., González, S., Mendoza, G., García, J. C., Miranda, L., de la Cruz, G. A. & de Lerma, V. 2005. "Efecto

- de enzimas fibrolíticas exógenas en la degradación *in vitro* de ingredientes alimenticios, y en la producción de leche de vacas Holstein”. *Interciencia*, 30(12): 752–757, ISSN: 0378-844.
- Rezaeian, M., Beakes, G. W. & Chaudhry, A. S. 2005. “Relative fibrolytic activities of anaerobic rumen fungi on untreated and sodium hydroxide treated barley straw in *in vitro* culture”. *Anaerobe*, 11(3): 163–175, ISSN: 1075-9964, DOI: 10.1016/j.anaerobe.2004.10.008.
- Santra, A. & Karim, S. A. 2002. “Influence of ciliate protozoa on biochemical changes and hydrolytic enzyme profile in the rumen ecosystem”. *Journal of Applied Microbiology*, 92(5): 801–811, ISSN: 1365-2672, DOI: 10.1046/j.1365-2672.2002.01583.x.
- Sawanon, S. & Kobayashi, Y. 2006. “Synergistic fibrolysis in the rumen by cellulolytic *Ruminococcus flavefaciens* and non-cellulolytic *Selenomonas ruminantium*: Evidence in defined cultures”. *Animal Science Journal*, 77(2): 208–214, ISSN: 1740-0929, DOI: 10.1111/j.1740-0929.2006.00339.x.
- Sosa, A., Galindo, J. & Bocourt, R. 2007. “Metanogénesis ruminal: aspectos generales y manipulación para su control”. *Cuban Journal of Agricultural Science*, 41(2): 105–114, ISSN: 2079-3480.
- Sosa, A., Galindo, J., Bocourt, R., Rodríguez, R., Albelo, N. & Oramas, A. 2010. “Efecto de *Aspergillus oryzae* en la fermentación ruminal de *Pennisetum purpureum* vs. Cuba CT-115 mediante la técnica de producción de gas *in vitro*”. *Cuban Journal of Agricultural Science*, 44(2): 151–155, ISSN: 2079-3480.
- Srinivasan, K., Murakami, M., Nakashimada, Y. & Nishio, N. 2001. “Efficient production of cellulolytic and xylanolytic enzymes by the rumen anaerobic fungus, *Neocallimastix frontalis*, in a repeated batch culture”. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 91(2): 153–158, ISSN: 1389-1723, DOI: 10.1016/S1389-1723(01)80058-X.
- Stevenson, D. M. & Weimer, P. J. 2007. “Dominance of *Prevotella* and low abundance of classical ruminal bacterial species in the bovine rumen revealed by relative quantification real-time PCR”. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 75(1): 165–174, ISSN: 0175-7598, 1432-0614, DOI: 10.1007/s00253-006-0802-y.
- Sun, Y. Z., Mao, S. Y., Yao, W. & Zhu, W. Y. 2008. “DGGE and 16Ss rDNA analysis reveals a highly diverse and rapidly colonizing bacterial community on different substrates in the rumen of goats”. *Animal*, 2(3): 391–398, ISSN: 1751-7311, 1751-732X, DOI: 10.1017/S1751731107001231.
- Tokura, M., Ushida, K., Miyazaki, K. & Kojima, Y. 1997. “Methanogens associated with rumen ciliates”. *FEMS Microbiology Ecology*, 22(2): 137–143, ISSN: 0168-6496, DOI: 10.1111/j.1574-6941.1997.tb00365.x.
- Welkie, D. G., Stevenson, D. M. & Weimer, P. J. 2010. “ARISA analysis of ruminal bacterial community dynamics in lactating dairy cows during the feeding cycle”. *Anaerobe*, 16(2): 94–100, ISSN: 1075-9964, DOI: 10.1016/j.anaerobe.2009.07.002.
- Whitford, M. F., Teather, R. M. & Forster, R. J. 2001. “Phylogenetic analysis of methanogens from the bovine rumen”. *BMC Microbiology*, 1(1): 5, ISSN: 1471-2180, DOI: 10.1186/1471-2180-1-5.
- Williams, A. G. & Coleman, G. S. 1992. *The Rumen Protozoa*. New York, USA: Springer, ISBN: 978-1-4612-7664-7.
- Yang, W. Z., Benchaar, C., Ametaj, B. N. & Beauchemin, K. A. 2010. “Dose response to eugenol supplementation in growing beef cattle: Ruminal fermentation and intestinal digestion”. *Animal Feed Science and Technology*, 158(1–2): 57–64, ISSN: 0377-8401, DOI: 10.1016/j.anifeeds.2010.03.019.
- Zebeli, Q., Mansmann, D., Steingass, H. & Ametaj, B. N. 2010. “Balancing diets for physically effective fibre and ruminally degradable starch: A key to lower the risk of sub-acute rumen acidosis and improve productivity of dairy cattle”. *Livestock Science*, 127(1): 1–10, ISSN: 1871-1413, DOI: 10.1016/j.livsci.2009.09.003.

Received: February 2, 2016