

Elementos minerales. Su impacto en la fermentación ruminal*

Arelovich¹, H.M.

Departamento de Agronomía, Universidad Nacional del Sur
Comisión de Investigaciones Científicas, Provincia de Buenos Aires

Resumen

El objetivo es la revisión de los efectos de minerales esenciales sobre la fermentación ruminal. Los avances en microbiología ruminal y el potencial de manipulación de la misma son de interés para generar productos animales saludables, seguros y ambientalmente aceptables, contemplando simultáneamente la productividad y rentabilidad de la empresa. Numerosos métodos de manipulación de la fermentación han sido extensivamente evaluados y adoptados, otros se hallan aun en fase experimental. Entre ellos, puede mencionarse: introducción ruminal de microorganismos, antibióticos, bacteriocinas, ácidos orgánicos, compuestos secundarios vegetales, defaunación, prebióticos, enzimas y finalmente adición de minerales. Por su número y diversidad, las bacterias ruminales son las de mayor influencia en la fermentación. Su población es afectada por fluctuaciones en el pH, potencial redox y osmolaridad, modificando así el tipo y proporciones relativas de los productos finales de fermentación. La evidencia experimental indica que la adición de ciertos minerales al rumen influye sobre la actividad microbiana y el metabolismo ruminal. Esto puede ocurrir por diversos mecanismos, tales como la alteración de propiedades físico-químicas del medio y cambios enzimáticos, en absorción o cinética ruminal. Para modificar la fermentación ruminal empleando elementos minerales, y aprovechando su "inocuidad" como nutrientes, se enfatiza en las diferencias entre requerimientos y rangos de tolerancia para microorganismos ruminales y animal hospedante. Mediante ejemplos específicos de estudios *in vivo* e *in vitro* se describe el impacto de macro y micro elementos sobre variables ruminales tales como: balance de electrolitos y osmolaridad, cambios del pH, producción de ácidos grasos volátiles, metabolismo del N y digestión de la fibra. Se discuten mecanismos fisiológicos por los cuales los minerales promueven cambios en patrones de fermentación como inhibición-estimulación de la actividad enzimática, utilizando ejemplos de enzimas de relevancia en la síntesis de proteína bacteriana. Finalmente, se analiza brevemente algunas implicancias del uso de minerales como aditivos sobre el medioambiente, como su potencial rol en la disminución de la metanogénesis. Algunas técnicas de manipulación ruminal son controversiales porque no salen de la etapa experimental, resultan de difícil implementación práctica, generan una respuesta negativa del consumidor por posibles residuos ambientales o en los productos, y los resultados productivos pueden ser poco consistentes. En cambio, los minerales esenciales son promisorios como aditivos porque son de fácil disponibilidad, resultan económicos y de incorporación sencilla a la dieta; los consumidores pueden reconocerlos como nutrientes en lugar de aditivos, y en concentraciones moderadas resultarían de bajo impacto ambiental. Sin embargo, para aquellos elementos esenciales considerados relevantes como "aditivos", es necesaria mayor investigación para establecer cuales son las fuentes minerales y concentraciones más apropiadas, e identificar posibles interacciones con el tipo de dieta.

Palabras clave: minerales, rumen, fermentación.

* Texto ampliado y actualizado de la Conferencia presentada en el 30° Congreso Argentino de Producción Animal, Santiago del Estero, 3 al 5 de octubre de 2007.

1. Dpto. de Agronomía, Universidad Nacional del Sur. CIC, Buenos Aires. (8000) Bahía Blanca. hugoarel@criba.edu.ar

Summary

The objective was to review the effects of essential minerals on ruminal fermentation. Advances in rumen microbiology and the potential to manipulate rumen activity are of interest to produce healthy and safe animal products, friendly to the environment and useful to increase farm productivity and profitability. Thus, numerous methods to manipulate fermentation have been extensively evaluated and adopted, while others are still under experimentation. Among them: microorganism introduction into the rumen, antibiotics, bacteriocins, organic acids, plant secondary compounds, defaunation, probiotics, enzymes and finally mineral additions. Ruminal bacteria due to their abundance and diversity are a major influence in fermentation. Bacterial population is affected by pH fluctuation, redox potential and osmolarity; which in turn modify type and proportion of final fermentation products. Experimental evidence shows that some minerals added to rumen contents influences microbial activity and rumen metabolism. Various mechanisms can be involved in this process such as alteration of physic-chemical properties of the media, enzymatic changes, and changes in absorption or rumen kinetics. In order to influence ruminal fermentation by using minerals, taking advantage of their "harmlessness" as a nutrient, the differences between requirements and tolerance ranges are stressed out. Specific examples of *in vivo* and *in vitro* studies are used to describe the impact of macro and microelements upon ruminal variables such as: electrolyte and osmolarity, pH changes, volatile fatty acid yield N metabolism and fiber digestion. The physiological mechanisms by which minerals could promote changes in fermentation patterns are discussed. They include inhibition-stimulation of enzymatic activities and examples of relevant enzymes in bacterial protein synthesis are used. Finally, implicances of the effects mineral use as additives on environment such as potential reduction of methanogenesis is discussed. Some ruminal manipulation techniques are controversial because they remain in experimental stages, they are difficult to include in daily farm practice, cause a negative response from consumers because of potential residues in animal products or environment, and the consistency of production results. Essential minerals look promising as additives because they are easily available, economically affordable, can be recognized as nutrients for consumer perception, and used at moderate levels may result of low environmental impact. However, for those essential elements identified as relevant for additives more research is required to establish proper mineral sources and concentrations as well as interactions with type of diet. Some ruminal manipulation techniques are controversial because they remain in experimental stages, they are difficult to include in daily farm practice, causing negative response from consumers because of potential residues in animal products or environment, and production results could not be consistent. Conversely, essential minerals look promising as additives because they are easily available, economically affordable and simple to include in the diet; they can be recognized as nutrients rather than additives by consumers, and at moderate dietary concentrations would result of low environmental impact. However, for those essential elements relevant as additives more research is required to establish proper mineral sources and concentrations as well as potential interactions with type of diet.

Key words: minerals, rumen, fermentation.

Introducción

La población microbiana del rumen puede ser alterada mediante diferentes mecanismos. De esta manera es factible modificar la composición de productos finales de fermentación de utilidad para el animal (NH₃, AGV), la efi-

ciencia del proceso de conversión alimenticia (ECA), las emisiones ambientales (tales como CH₄) y la calidad del producto final (como por ejemplo el contenido de CLA en carne o leche).

El avance en el conocimiento en microbiología ruminal y el potencial de manipulación de

la misma resulta de trascendencia en la generación de productos sanos, seguros, ambientalmente aceptables y que simultáneamente contemplen la productividad y rentabilidad de los sistemas de producción de rumiantes. Obviamente, los agentes primarios en la modificación de la fermentación son la combinación de alimentos utilizados, su composición y proporción relativa en la dieta. Ejemplos clásicos del impacto de la dieta sobre los patrones de fermentación son los cambios químicos en el rumen en respuesta al suministro de diferentes tipos de carbohidratos y proteína.

Con respecto a los carbohidratos, el bajo suministro de almidones de maíz o avena a bovinos en forrajes frescos disminuyó la concentración de NH_3 ruminal e impactó favorablemente sobre la ECA y la productividad animal (Arelovich et al., 2003; Arelovich et al. 2004; Marinissen, 2007). Sin embargo, el elevado consumo de almidón favorece el rápido crecimiento de *Streptococcus bovis* y la consecuente producción de ácido láctico, a la vez que los microorganismos capaces de sintetizar propionato a partir de este ácido se multiplican a un ritmo inferior (Russell and Tsuneo, 1985). Consecuentemente el ácido se acumula y disminuye el pH ruminal. Además, *Streptococcus bovis* compite más eficientemente por el NH_3 disponible y esto favorece aun más su tasa de crecimiento (Al-jumaily and Caldwell, 1986) con una producción de lactato que continúa incrementándose en un efecto espiral. El aporte de azúcares solubles en agua disminuye la concentración de NH_3 ruminal por deprimir su producción, mientras que el suministro de almidón lo reduce por aumentar su incorporación a la síntesis de proteína bacteriana (Hristov et al., 2005).

En cuanto a la proteína, la degradabilidad diferencial de la misma, ya sea por característica natural o cambios inducidos en su estructura, modifica la disponibilidad de NH_3 ruminal. Así la magnitud de la respuesta animal dependerá entonces de la cantidad y características de proteína suministrada con la dieta (Arelovich et al, 2003; Zanton et al., 2007).

Además de los componentes de la dieta, otros agentes pueden afectar el proceso de

digestión en el retículo-rumen. Si bien este trabajo se refiere más específicamente al impacto de elementos minerales sobre la fermentación, en principio es importante poner este tópico en perspectiva respecto de otros métodos existentes. Diversos mecanismos para la manipulación de la fermentación han sido extensivamente estudiados, probados y adoptados. Sin embargo otros permanecen en fase experimental y algunos ni siquiera han sido identificados de esta manera.

1. Métodos de manipulación de la fermentación ruminal

Estos métodos en general incluyen la alteración de la composición, actividad o competencia de la población microbiana. A continuación se listan y se discuten brevemente algunos de los métodos mas relevantes.

1.1 Introducción de microorganismos.

Como método de alteración del proceso de fermentación se ha estudiado la introducción ruminal de microorganismos; tanto los que se encuentran naturalmente como microorganismos foráneos genéticamente modificados, o cepas microbianas también genéticamente modificadas, pero ya existentes en el ecosistema ruminal (Santra et al, 2003).

Los objetivos de esta práctica pueden ser múltiples. Un caso concreto es lograr la detoxificación de algún compuesto que interfiera en la digestión o metabolismo. Por ejemplo diversos estudios se enfocaron en mecanismos de detoxificación del oxalato, nitratos, micotoxinas, saponinas y mimosina. La transinoculación de microorganismos ruminales fue utilizada satisfactoriamente para anular efectos tóxicos de ciertos componentes de la dieta (Santra et al., 2003). Un ejemplo típico es la mimosina, un derivado de hidroxipiridinas presente en *Leucaena leucocephala*, un arbusto tropical utilizado en Australia que resulta tóxico para el ganado. La bacteria *Synergistes jonesii*, hallada en bovinos de Hawaii, tiene capacidad para degradar la mimosina (Allison et al., 1992). Dicha bacteria

fue entonces transferida a animales en Australia confiriéndoles protección.

La modificación genética de una bacteria ruminal para detoxificación de factores anti nutricionales se logró con éxito en el caso de fluoroacetato. Dicha bacteria expresa la fluoroacetato deshidrogenasa y es capaz de sobrevivir en el rumen otorgando protección contra la toxicidad por este compuesto (Annisson and Bryden, 1998).

1.2 Antibióticos

Los antibióticos ionóforos, habitualmente utilizados en programas de alimentación de rumiantes, son el caso más concreto de agentes químicos capaces de modificar la fermentación ruminal. Los ionóforos inhiben bacterias Gram + de la población ruminal que producen NH_3 o ácido láctico (Faixova and Faix, 2005). Dos antibióticos ionóforos, la monensina y el lasalocid, resultaron de utilidad para mejorar la productividad mediante el incremento del propionato, reducción en la degradación de proteína y emisión de CH_4 , con incremento en ECA. También promueven la disminución en nivel de grasa y proporción de ácidos grasos saturados en la leche (Teather and Forster, 1998).

1.3 Bacteriocinas

Las bacteriocinas son un grupo de compuestos antimicrobianos, tanto de origen endógeno como exógeno, que afectan la degradación de aminoácidos en el rumen (Faixova and Faix, 2005). Estas son generadas por bacterias ruminales modificadas por ingeniería genética y pueden contribuir a realizar una "colonización controlada", dado que la capacidad de colonización ruminal parece ser una limitante importante para la introducción de bacterias modificadas genéticamente (Teather and Forster, 1998).

1.4 Ácidos orgánicos.

Los ácidos dicarboxílicos como aspartato, fumarato y malato estimulan la utilización de lactato por bacterias como *Selenomonas ruminantium*. Esta estimulación es diferencial y así es que malato o malato en presencia de

Na, estimulan más la incorporación de lactato que aspartato o fumarato. Por otra parte, *Selenomonas ruminantium* crece más favorablemente en malato, promoviendo la incorporación de lactato para generar succinato y finalmente propionato.

Los ácidos dicarboxílicos y monensina parecen tener un efecto aditivo. La bacteria *Streptococcus bovis* es sensible a la monensina pero *Selenomonas ruminantium* no lo es. En consecuencia por un lado disminuye la concentración de lactato debido al impacto de la monensina sobre *Streptococcus bovis* y por otro se incrementa la utilización del mismo por *Selenomonas ruminantium* (Martin, 1998).

1.5 Compuestos secundarios y extractos vegetales.

Ciertos químicos inherentes a las plantas conocidos como compuestos secundarios y más recientemente aceites esenciales vegetales han sido estudiados como potenciales activadores-inhibidores del metabolismo ruminal. En cuanto a compuestos secundarios las saponinas parecen suprimir la actividad bacteriolítica de protozoarios ciliados, aumentando así el flujo de proteína microbiana desde el rumen; los taninos inactivan enzimas bacterianas por su acción bactericida y bacteriostática afectando la fermentación (Faixová and Faix, 2005).

Los aceites esenciales disminuyen la tasa de producción de NH_3 inhibiendo la actividad de bacterias que lo generan en gran cantidad. Diferentes dosis de extractos vegetales y metabolitos secundarios fueron incubados con líquido de rumen, mostrando que ciertas combinaciones de los productos ensayados permitieron una reducción substancial de la concentración de N-NH_3 (Busquet et al., 2006). Sin embargo, el efecto de los extractos de plantas sobre la degradación de proteína puede estar condicionado por la metodología experimental. Por ejemplo la acumulación de compuestos intermedios que interfieren en la interpretación de los resultados puede ocurrir con estudios *in vitro* como en cultivo continuo (Cardozo et al., 2004).

1.6 Agentes de defaunación

La eliminación de protozoarios (defaunación) en diversos estudios mostró reducción en la producción de CH₄ y aumento del flujo de proteína al intestino delgado resultando en una mejora en crecimiento y eficiencia de conversión alimenticia (Santra et al, 2003).

1.7 Prebióticos

Los prebióticos son compuestos de origen bacteriano y levaduras. Su utilización confiere mayor estabilidad a la fermentación ruminal, reducen la incidencia de diarrea y de esta manera mejoran la tasa de crecimiento y ECA (Santra et al., 2003)

1.8 Enzimas

Las enzimas fibrolíticas tienen potencial para mejorar la degradación de la fibra al menos hasta ser condicionadas por una reducción del pH (Yang et al., 2002). En numerosos estudios se han documentado efectos positivos sobre la fermentación ruminal de diversos inhibidores de CH₄, sacaridasas, proteasas y deaminasas (Teather and Forster, 1998; Santra et al., 2003).

1.9 Minerales esenciales

Finalmente, diversos macro y oligoelementos minerales definidos como esenciales desde el punto de vista nutricional, también influyen sobre la fermentación ruminal. Esto parece ocurrir, tanto dentro como fuera de los rangos determinados como requerimientos de los animales (Rodríguez, 1995; Arelovich, 1999). El objetivo de este trabajo es discutir el efecto de la adición a la dieta de diversos elementos minerales sobre la fermentación ruminal como si estos fueran aditivos más que nutrientes.

2. Manipulación de la fermentación ruminal mediante suministro de minerales

Los microorganismos del retículo-rumen incluyen bacterias, protozoarios y hongos, aunque también fueron hallados micoplasmas y bacteriófagos (Yokoyama and Johnson, 1993). Sin embargo, las bacterias son las de

mayor influencia en la fermentación; en principio por la multiplicidad de especies y número de individuos, pero también por su sensibilidad a cambios de diversa magnitud en las condiciones del medioambiente ruminal. Así, los niveles de pH, potencial redox y osmolaridad generados por cambios de disponibilidad y composición del sustrato modifican la población bacteriana, y en consecuencia la proporción y tipo de productos finales de fermentación.

La evidencia experimental muestra que bajo ciertas circunstancias la adición de micronutrientes al rumen influye sobre la actividad microbiana y el metabolismo ruminal. Esto puede ocurrir por diversos mecanismos, tales como la alteración de propiedades físico-químicas del medio, cambios enzimáticos (activación-desactivación), cambios en absorción o modificaciones de la cinética ruminal. Para considerar la inclusión de agentes de manipulación de la fermentación como los minerales, que simultáneamente son componentes esenciales de los microorganismos y del cuerpo animal, deben conocerse la variación de los rangos de concentración entre requerimientos y tolerancia máxima. En primer término estos valores no siempre se conocen, y cuando se conocen el grado de precisión puede verse afectado por las condiciones experimentales en que fueron establecidos. En segundo lugar la amplitud y valores absolutos de estos rangos varían para cada mineral en particular entre microorganismos y animal hospedante.

2.1. Requerimientos y tolerancia de microorganismos ruminales y animal hospedante

Habitualmente, diferenciamos entre macro y micro elementos en función de las concentraciones relativas necesarias desde el punto de vista de los requerimientos establecidos para el animal (NRC, 2000). De la misma manera utilizaremos esta clasificación para aplicarla a la influencia que los minerales puedan ejercer sobre la digestión ruminal.

Los microorganismos del rumen tienen requerimientos minerales propios (Suttle, 1987), que pueden o no ser coincidentes con los del animal hospedante. Lo mismo ocurre

con los niveles de tolerancia. En consecuencia, se describen a continuación algunas particularidades de macro y microelementos minerales en su relación con los requerimientos de los microorganismos ruminales.

2.1.1 Macroelementos

En el caso del P, Suttle (1987) indicó que los requerimientos bacterianos equivalen al flujo salival, y solo en caso de carencia extrema se produciría una deficiencia bacteriana. Por otra parte, se estableció que para sostener máxima tasa crecimiento bacteriano en cultivo continuo fueron necesarios de 75 a 100 mg /l P (Komisarczuk et al., 1987). Sin embargo, al menos para P, parecen existir diferentes requerimientos para crecimiento y actividad bacteriana en diferentes sustratos. Mientras que fueron necesarios 4,3 g P por kg de MO fermentada para síntesis de proteína microbiana, este valor se incrementó a 6,9 g para la degradación de celulosa (Ramírez-Perez y Meschy, 2005).

Con respecto a Ca y Mg parece haber una gran variabilidad aun dentro de cada cepa por especie y también por tipo de sustrato (Cuadro 1; Morales Silva, 2005). A diferencia de los otros macro elementos para el Mg el principal sitio de absorción es el retículo-rumen (NRC, 2001). Para su absorción a través de la pared ruminal es trascendente la concentración de

Mg en solución, la cual depende de las características de la dieta, pH y energía disponible. Así, a bajas concentraciones se estimula el transporte activo y a altas tiene mayor trascendencia la absorción por difusión, aunque el transporte activo continúa operando (NRC, 2001). La mismas condiciones que afectan la absorción competirían con la disponibilidad como nutriente para los microorganismos.

Entre otras actividades en el rumen (Breytenbach, 1999), el S está vinculado al metabolismo ruminal del N. Es un elemento requerido por los microorganismos para la síntesis de aminoácidos azufrados como cisteína, cistina y metionina entre otros, además de las vitaminas tiamina y biotina, y enzimas. La microflora ruminal puede alterar la forma en que el S y N está presente en la dieta, vía hidrólisis y posterior proceso de síntesis.

Las bacterias pueden utilizar S en forma orgánica o inorgánica, y el suministro suplementario de S incrementa la síntesis de proteína, mejora el balance de aminoácidos ruminales y contribuye a la actividad de hongos celulolíticos (Morrison et al., 1990; Gutierrez et al., 1996). Así los requerimientos de los microorganismos ruminales parecen muy variables y estando asociados a los requerimientos de N, puede esperarse sean cubiertos con relaciones N:S de 20 (± 12):1 (Gutierrez et al., 1996).

Cuadro 1: Requerimientos de Ca y Mg (mM) para bacterias celulolíticas (adaptado de Morales Silva, 2005).

Table 1: Requirements of Ca and Mg (mM) for cellulolytic bacteria (adapted from Morales Silva, 2005).

Bacteria-cepa	Celobiasa ¹		Celulosa ²
	Ca ⁺²	Mg ⁺²	Ca ⁺²
<i>Fibrobacter succinógenes</i> A3c	ne	ne	>0,36
<i>Fibrobacter sucionógenes</i> S85	0,47	0,56	ne
<i>Ruminococcus albus</i> 7	>0,64	0,52	0,28
<i>Ruminococcus albus</i> 8	ne	0,51	ne
<i>Ruminococcus flavefaciens</i> B34b	ne	0,54	>0,64
<i>Ruminococcus flavefaciens</i> C94	ne	0,82	>0,64

¹ Sustrato utilizado para medir máxima tasa de crecimiento

² Sustrato utilizado para medir máxima tasa de degradación

ne No estimable

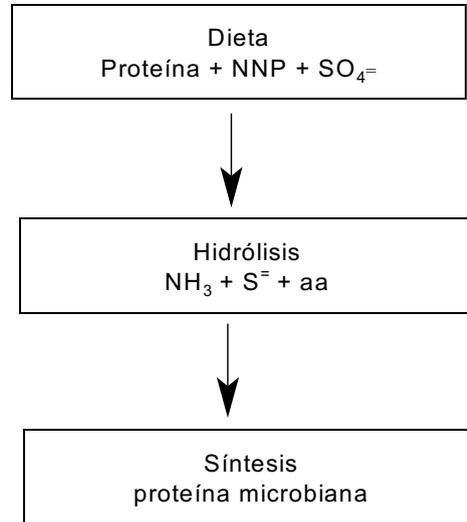


Figura 1: Esquema simplificado de incorporación de S elemental a la proteína microbiana.

Figure 1: Simplified scheme of elemental S uptake into microbial protein.

La determinación óptima de la relación N:S en la dieta para cubrir los requerimientos simultáneos de microorganismos y animal es compleja. La misma es afectada por la solubilidad de los compuestos nitrogenados y la disponibilidad de S del alimento. En ovinos la relación N:S en lana o queratina del pelo varía entre 4:1 y 6:1 mientras que para otros tejidos es en general 15:1 (Breytenbach, 1999). En consecuencia, podemos considerar que el aporte de la proteína microbiana es frecuentemente deficitario en S para el animal hospedante. Particularmente para ovinos el NRC (1985) sugiere mantener una relación 10:1, la cual puede ser más amplia para bovinos de carne.

Con respecto a la tolerancia de microorganismos ruminales a los elementos minerales en general y macroelementos en particular es muy escasa. Sin embargo, para el animal existe amplia información sobre los niveles de tolerancia (NRC, 1980). En el Cuadro 2 podemos observar que los valores de toxicidad en términos porcentuales de la dieta son variables entre elementos, y la amplitud del intervalo entre requerimientos y tolerancia máxima difiere para cada mineral en particular (NRC,

2000). En este sentido los intervalos de mayor amplitud se observan para Na y K.

2.1.2 Microelementos

El Co es un ejemplo característico de como la disponibilidad y concentración de un microelemento puede impactar en forma diferencial a microorganismos ruminales y animal hospedante. El Co es necesario para la síntesis de vitamina B₁₂ en el rumen, la cual es requerida tanto por el cuerpo como para cofactor de la metil-malonil-CoA mutasa, que cataliza la síntesis de propionato en el rumen (Nagaraja et al., 1997; Tiffany et al., 2006).

Cuando hay una carencia de Co, en las 48 h posteriores al suministro de la dieta deficiente se produce una gran acumulación de succinato en el rumen (Kennedy et al., 1996; Tiffany et al., 2006). De esta manera se observa un efecto inmediato del déficit de Co sobre los microorganismos, con alteración de la fermentación y potencial disminución en la síntesis de propionato. Sin embargo el animal puede mantener reservas de vitamina B₁₂ y durante meses no mostrar signos carenciales.

Cuadro 2: Niveles máximos de tolerancia animal para algunos macroelementos (adaptado de NRC, 1980).
Table 2: Maximum levels of animal tolerance for some macroelements (adapted from NRC, 1980).

Elemento	Bovinos	Ovinos
	‰ ¹	
Calcio	213490,4	2
Fósforo		0,6
Potasio		3
Cloruro de sodio (lactación)		9
Cloruro de sodio (no lactante)		-
Azufre		0,4

¹ Expresado como porcentaje de la MS de la dieta.

En el Cuadro 3 se contrastan los niveles óptimos y límites de toxicidad determinados *in vitro* para microorganismos (Martinez y Church, 1970) y bovinos de carne (NRC, 2000).

Es posible aprovechar de los elementos minerales su "inocuidad" como nutrientes para incorporarlos a la dieta con una función adicio-

nal: el potencial de modificación de patrones de fermentación ruminal. Nuevamente, para utilizar los minerales como aditivos es preciso enfatizar las diferencias entre niveles requeridos y tolerancia máxima tanto para microorganismos del rumen como para el animal hospedante.

Cuadro 3: Requerimientos de microelementos para microorganismos ruminales y animal hospedante.
Table 3: Microelement requirements for ruminal microorganisms and host animal.

Elemento, ppm	Microorganismos ruminales ¹		Animal hospedante ²	
	Optima	Tolerancia	Optima	Tolerancia
Boro	0-200	300	-	-
Cadmio	1-7	10	-	-
Cobalto	1-3	7	-	10
Cromo	1-3	10	10	1000
Cobre	0-0,1	1	-	50
Fluor	0-0,05	0,5	50	-
Hierro	2-5	100	0,5	1000
Iodo	20	>1000	20-40	50
Manganeso	5-30	100		1000
Molibdeno	10-200	>500		5
Níquel	0-0,1	0,5	-	50
Selenio	0-0,1	7	0,10	2
Zinc	3-10	20	30-40	500

¹ Concentración para máxima digestión de celulosa o toxicidad (Martinez and Church, 1970).

² NRC, 2000

2.2 Efectos de algunos minerales sobre la fisiología y el metabolismo ruminal

Underwood and Suttle (1999) listan al menos 24 elementos minerales considerados esenciales y en consecuencia requeridos por varios animales, pero el NRC (2000) solo reconoce 17 para bovinos. Existe un conocimiento detallado del rol metabólico de los diversos elementos en el cuerpo animal. Mucho menos es conocido acerca del impacto de excesos o deficiencias a nivel ruminal y las interacciones con aditivos o componentes de la dieta.

Como seres vivos los microorganismos del rumen requieren minerales esenciales para su desarrollo y supervivencia, pero también son susceptibles a altas concentraciones, aunque en ciertos casos pueden adaptarse. Por ejemplo en el caso de consumo de oxalatos se genera toxicidad, deficiencias minerales o urolitiasis. Sin embargo la población microbiana que degrada oxalatos crece paulatinamente y se vuelven más tolerantes. De esta manera los microorganismos ruminales pueden utilizar hasta el 50% del Ca en gramíneas tropicales que contienen niveles elevados de oxalato de Ca (Barry and Blaney, 1987).

El suministro de altas concentraciones de minerales genera cambios físico químicos apreciables en el retículo-rumen. Estos cambios metabólicos se manifiestan a través de alteraciones en la osmolaridad, pH, potencial redox, síntesis de productos finales de fermentación y tasa de degradación del sustrato.

2.2.1 Balance de electrolitos y osmolaridad

La presión osmótica de fluidos corporales permite la libre difusión de solutos a través de membranas permeables. Los cationes más importantes de los fluidos corporales son Na^+ y K^+ y los aniones principales Cl^- y HCO_3^- . El principal catión del fluido ruminal es el Na^+ su efecto en la osmolaridad influye sobre el consumo y la digestión.

La presión osmótica u osmolaridad en el retículo-rumen es crítica para algunas funciones fisiológicas. Durante el proceso de fermentación normal los valores de osmolaridad usualmente alcanzados son de 260–340

mOsm/L; pero la tonicidad se incrementa con la ingesta 350–400 mOsm/L postprandial (Owens and Goestch, 1993). La presencia de osmoreceptores en el rumen tiene un efecto de control del consumo voluntario (Carter and Grovum, 1990; Forbes et al., 1992). En especial el Na^+ como partícula osmótica incrementa rápidamente la osmolaridad ruminal (Carter and Grovum, 1990a; 1990b). Esta es la razón por la cual se han establecido sobre la base de la práctica una serie de reglas que permiten utilizar la sal común como un regulador del consumo (Lusby, 1992).

La respuesta fisiológica a la adición de niveles elevados de Na en la dieta incluye disminución de la población de protozoarios (Garg and Nangia, 1993); y adaptación diferencial de bacterias, por ejemplo *S. ruminantium* y *R. albus* soportan concentraciones de Na que superan los 300 mM (Mackie et al. 1984). También se estimula el consumo de agua, lo que incide sobre flujo de la fase líquida ruminal (Rundgren et al., 1990), como también la excreción urinaria (Godwin and Williams, 1986; Hamilton and Webster, 1987). La osmolaridad regula el consumo de agua y la liberación de arginina-vasopresina que altera la concentración y flujo de orina (Rundgren et al., 1990). Mayor producción de orina por incremento en la osmolaridad implica pérdida de otros minerales y metabolitos. Por ejemplo pérdida ósea e incremento en la excreción de Ca fue superior en ovinos con altos niveles de ClNa en la dieta, pero la glucosa y K en sangre no cambiaron, más aun la excreción de K se redujo aunque la de glucosa se incrementó sin variar los niveles en sangre (Godwin and Williams, 1986). Dado que el Na es transportado activamente por la enzima $\text{Na}^+ - \text{K}^+ \text{ATP-asa}$ desde el epitelio ruminal a la sangre (Carter and Grovum, 1990a), altos consumos de Na también incrementarían la demanda de ATP (Bertino, 1987).

2.2.2. Efectos sobre el pH ruminal

El pH es una de los parámetros que refleja más dramáticamente cambios metabólicos en el rumen y está asociado a modificaciones en productos los productos finales de fermentación. Tanto macro como microelementos

pueden influir sobre el pH. Simultáneamente cambios de pH alteran la dispersión ruminal de ciertos minerales como Ca, Mg y P (Emanuel and Staples, 1994).

El mayor efecto sobre el pH ruminal puede esperarse de dietas con altas concentraciones de almidón. Algunas sales minerales resultan efectivas para sostener el pH dentro de un rango funcional. El grado de efectividad parece depender de la sal y del mineral en particular. La magnitud del efecto de adición de distintas sales minerales a una dieta con 44% grano y 32% de ensilaje de sorgo es ilustrada en la Figura 2 (Le Ruyet and Tucker, 1992). Cuando el buffer contiene elementos que pueden resultar limitantes para la productividad animal como lo es el Mg en pasturas frescas, también incidiría favorablemente sobre la ganancia de peso vivo (Awadhesi and Prakash, 2001).

El elevado suministro de algunos minerales disminuye el pH ruminal. Tanto Ca como Mg y Zn en concentraciones 5 a 10 veces superiores a los requerimientos disminuyeron sensiblemente el pH (Gralak et al., 1996). Sin embargo, variaciones menores en pH se hallaron con la infusión ruminal de Cl_2Zn en bovinos consumiendo forrajes de baja calidad (Arelovich et al., 2000). Probablemente el impacto del mineral sobre el pH esté relacionado también con el tipo de dieta.

Cuando el pH ruminal es modificado se altera el flujo de minerales hacia el tracto inferior y las características del proceso de fermentación. La disminución del pH de 6,5 a 5,7 en cultivos *in vitro* de bacterias ruminales mostró una disminución en las tasas de producción de CH_4 , NH_3 y la relación acetato: propionato (Lana et al., 1998). Más raramente

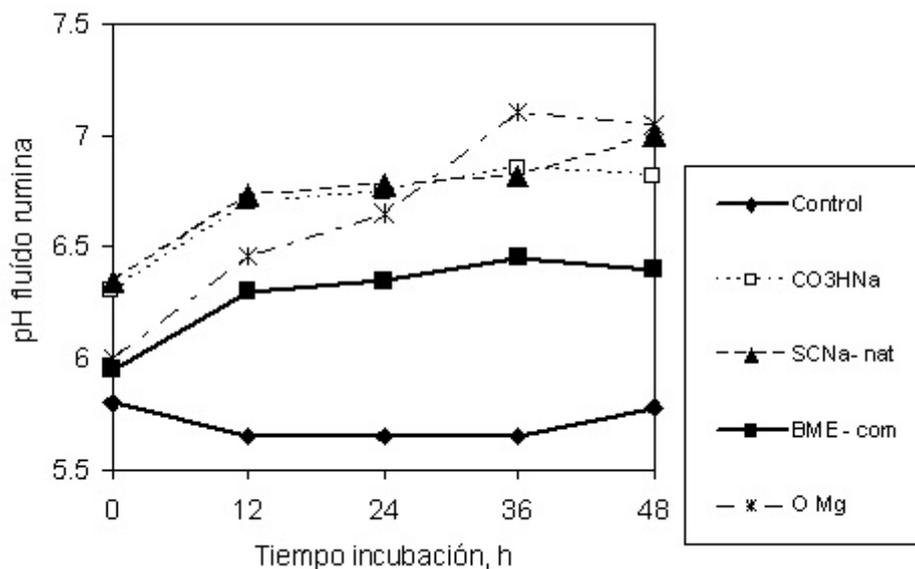


Figura 2: Valores de pH ruminal con diferentes soluciones buffer (adaptado de Le Ruyet and Tucker, 1992). Tratamientos: Control, CO_3HNa , sesquicarbonato de Na, OMg y buffer multielemental (BME comercial Pitman -Moore, Inc Mundelein, IL).

Figure 2: Values of ruminal pH with different buffer solutions (adapted from Le Ruyet and Tucker, 1992). Treatments: Control, $NaCO_3H$, Na sesquicarbonato, MgO and multielemental buffer (BME comercial Pitman -Moore, Inc Mundelein, IL).

altas concentraciones de minerales pueden incrementar el pH, como fue observado con la adición de K a dietas semipurificadas en ovinos (Khorasani and Armstrong, 1990).

2.2.3 Concentración de ácidos grasos volátiles

El Zn a altas concentraciones, pero por debajo del nivel de toxicidad, impacta sobre las proporciones relativas de AGV, aunque esto parece depender de la dieta. En bovinos que recibieron un forraje de baja calidad suplementado con urea, con el suministro de 250 y 470 ppm de Zn (Cl_2Zn) se incrementó la concentración de propionato (Figura 3; Arelovich et al., 2000). En dicho experimento 250 ppm de Zn resultaron suficientes para generar este efecto, y concentraciones mayores de Zn disminuyeron la degradación de la fibra. En una dieta de alfalfa y grano de maíz, la adición de 500 ppm Zn (SO_4Zn) Zn también incrementó la concentración ruminal de propionato (Bateman II et al., 2004). Sin embargo con el agregado de 430 ppm Zn (Cl_2Zn) en una dieta

propionato no resultó significativo.

Elevado consumo de Na reduce la concentración y modificó las proporciones molares de AGV (Godwin and Williams, 1986; Garg and Nangia, 1993). En búfalos se observó que una dosis diaria de 200 g de CINa incrementó la glucosa sanguínea debida probablemente a una mayor tasa de dilución y disminución en el número de protozoarios. Esto parece sugerir un cambio en el sitio de digestión del almidón hacia el intestino delgado (Garg and Nangia, 1993), lo que afectaría la producción de AGV.

El consumo de K con o sin la adición de Na afecta la fermentación y síntesis microbiana. El agregado de K en ovinos alimentados con dietas semipurificadas aumentó los AGV totales sin afectar las proporciones molares de los ácidos individuales ni tampoco el nivel de NH_3 . La suplementación con Na produjo un incremento lineal de la cantidad de MS y N microbiano que ingresó al intestino delgado (Khorasani and Armstrong, 1990).

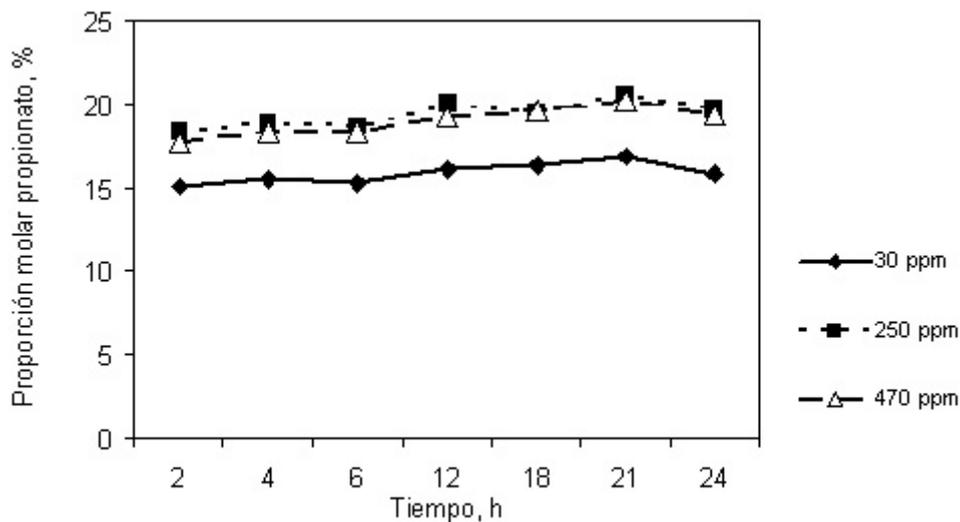


Figura 3: Adición de Zn y proporción de ácidos grasos volátiles en una dieta de baja calidad (Arelovich et al., 2000).

Figure 3: Zn addition and volatile fatty acid proportion for a low quality diet (Arelovich et al., 2000).

2.2.4. Metabolismo ruminal del N

La influencia de algunos minerales sobre la degradación de N no proteico (NNP) en el rumen resulta un aspecto de relevancia, tanto en cuanto a los requerimientos específicos de los microorganismos como a los efectos de inhibición. De esta manera, la ureasa ruminal requiere de Ni para optimizar su actividad (Spears et al., 1977), pero con la adición *in vitro* de de Cu, Zn, Cd, Sr, Ca, Co, Mn, Ba y Mg decrece la producción de NH_3 (Spears and Hatfield, 1978). Esto puede deberse a una disminución en la tasa de ureolisis ruminal o bien a un incremento en la utilización microbiana del NH_3 . Efectos depresores de la acti-

vidad ureásica ruminal *in vitro* (Figura 4) fueron observados con la combinación de concentraciones elevadas de Zn o Zn+Mn (Rodríguez, 1995; Rodríguez et al., 1996).

La asociación de urea con Ca además de reducir la tasa de degradación de urea (Figura 5, Huntington et al., 2006), también disminuyó el flujo neto de glucosa y L-lactato a través del tejido esplénico (Huntington et al., 2006). Este incremento en la liberación de glucosa y lactato es un efecto subsecuente de la rápida degradación de NNP y absorción de NH_3 . Es posible que cualquier otro agente capaz de disminuir la ureolisis ruminal produzca un efecto similar en el metabolismo del animal.

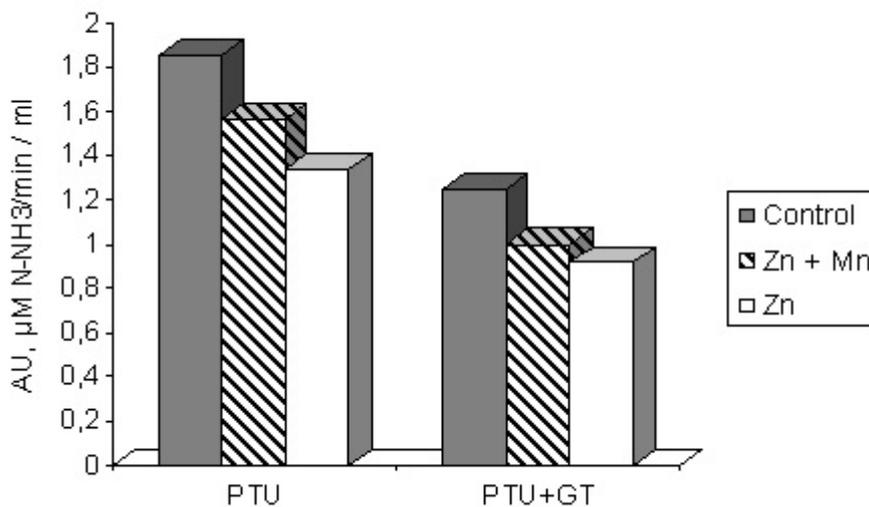


Figura 4: Actividad ureásica después de la adición de Zn y Mn al líquido de rumen extraído de ovinos (adaptado de Rodríguez et al., 1995).

Dietas: PTU= paja de trigo más urea; PTU +GT= paja de trigo más urea más grano de trigo. Control vs Zn o Zn+Mn ($p < 0,05$); Zn vs Zn +Mn (NS)

Figure 4: Ureasic activity after addition of Zn and Mn to rumen liquid from sheep (adapted from Rodríguez et al., 1995).

Diets: PTU= wheat straw plus urea; PTU +GT= wheat straw plus urea plus wheat grain. Control vs Zn or Zn+Mn ($p < 0,05$); Zn vs Zn +Mn (NS)

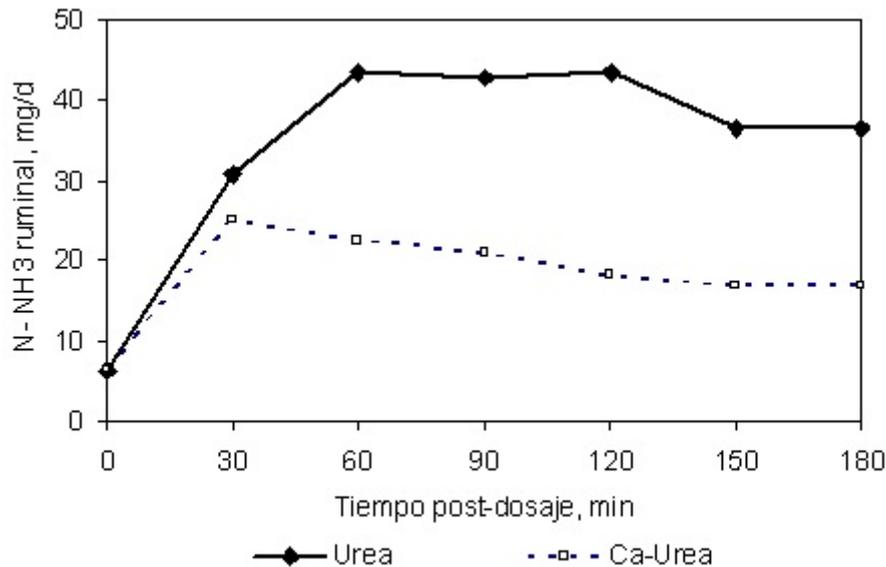


Figura 5: Concentración de N-NH₃ posterior al suministro de urea o urea asociada a Ca (adaptado de Huntington et al., 2006).

Figure 5: Concentration of NH₃-N after feeding urea or urea associated to Ca (adapted from Huntington et al., 2006).

Históricamente la urea ha sido una fuente económica para mejorar la disponibilidad de N en el rumen. El principal problema asociado a su utilización es precisamente su rápida degradabilidad ruminal y posterior riesgo de intoxicación. En estudios *in vivo* (Arelovich et al., 2000), concentraciones de Zn por debajo de los niveles de riesgo, pero superiores a los requerimientos, atenuaron el pico de NH₃ ruminal. Además, la concentración NH₃ permaneció sobre niveles críticos para un óptimo crecimiento bacteriano por un período de tiempo más prolongado (Figura 6).

Menor cantidad de información hay disponible acerca de la influencia de algunos minerales sobre la degradación de la proteína verdadera ingerida. Además algunos resultados parecen contradictorios. Bateman II et al. (2004) reportó que 500 mg de Zn (SO₄Zn) disminuyeron sensiblemente la degradación de la lisina en el rumen en una dieta basada en alfalfa, maíz y harina de soja. Por otra parte, con una dieta similar en bovinos (alfalfa,

cebada y harina de girasol), el suministro de 430 ppm de Zn (Cl₂Zn) no afectó significativamente la degradabilidad de la PB (Arelovich et al., 2008). Esto indicaría que algunos aminoácidos serían más susceptibles a la degradación que otros. En consecuencia, la composición aminoácídica de la dieta, su solubilidad ruminal y la fuente del mineral influirían sobre la magnitud de la respuesta a la adición de un mineral en particular.

Diferentes autores (Spears and Hatfield, 1978; Wallace and Mc Cain, 1996; Faixová and Faix, 2002; 2005) sugieren que el efecto de ciertos minerales sobre el metabolismo ruminal puede atribuirse a la inhibición o estimulación de la actividad enzimática. Como ya fue mencionado el Ni estimula la ureasa ruminal (Spears and Hatfield, 1977); mientras que el Cu, Cd y Zn pueden unirse a grupos SH⁻ interfiriendo con la actividad enzimática (Faixová and Faix, 2005). Elevadas concentraciones de Cu en líquido de rumen, hallado en áreas de pastoreo con contaminación

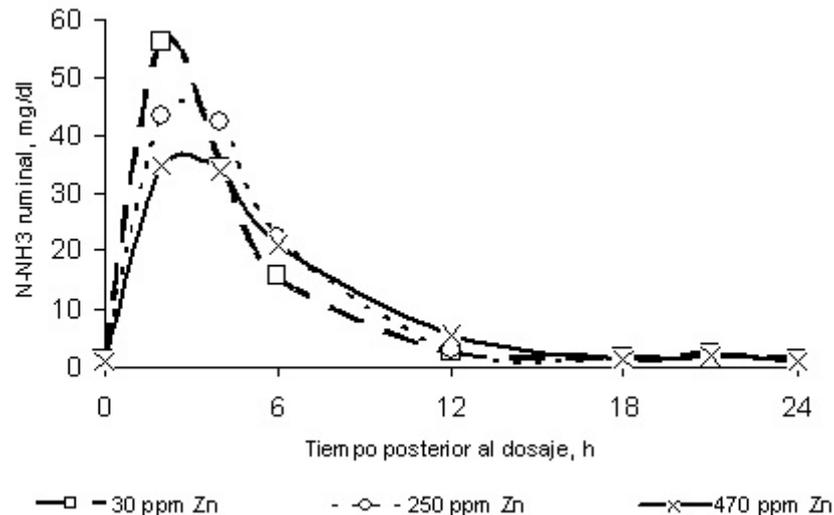


Figura 6: Efecto postprandial del Zn sobre el amoníaco ruminal en una dieta de baja calidad (Arelovich et al., 2000).

Figure 6: Post-prandial effect of Zn upon ruminal ammonia in a low quality diet (Arelovich et al., 2000).

industrial, inhibieron las actividades de ureasa y glutamato dehidrogenasa en el rumen de ovinos. Sin embargo, el Cu a bajas concentraciones (0,383 ppm) estimuló alanina aminotransferasa, aspartato amino transferasa, glutamato dehidrogenasa y γ -glutamyl transferasa (Faixová and Faix, 2005). Estas enzimas están presentes en el rumen, y poseen elevada actividad de síntesis de aminoácidos a partir de N-NH₃ o funcionan como transaminasas. Algunas enzimas hidrolíticas pueden ser también inhibidas. Tal es el caso de una dipeptidasa de *Prevotella ruminicola* afectada por Cu y Cr, sin embargo la actividad de esta misma enzima es estimulada por Co, Mn y Zn (Wallace and McCain, 1996).

En un estudio reciente, se indicó que la adición de cloruros de Ca, Mg, Zn, Cu, y Cd afectaron diferencialmente la actividad de las cuatro enzimas ruminales mencionadas más arriba. Los efectos estimulación-inhibición dependieron de la concentración relativa y del tipo específico de enzima estudiada (Faixova et al., 2006).

2.2.5. Degradación de la fibra

La digestión de los componentes de la pared celular es un aspecto central en la fermentación ruminal. Existe una multiplicidad de interacciones entre microorganismos, fundamentalmente bacterias y hongos para degradar la fracción fibrosa de las plantas. La acción bacteriana ocurre mediante la acción de exoenzimas. Una diversidad de estudios muestran la manipulación genética y ecológica de la fermentación ruminal para incrementar la actividad fibrolítica (Krause et al., 2003).

Fibrobacter succinógenes, *Ruminococcus albus* y *Ruminococcus flavofaciens* son los organismos fibrolíticos más trascendentes. La mayoría de las enzimas involucradas en la hidrólisis ruminal de celulosa ocurre mediante la acción sinérgica de una familia de enzimas que por su actividad se las clasifica como glucosil-hidrolasas (Krause et al., 2003). Una forma de manipulación de estas enzimas se lograría mediante interferencia o estimulación de su actividad (tal como ocurre con enzimas proteolíticas) o bien por la concentración de

los microorganismos que la generan.

De esta manera, altas concentraciones de minerales como agentes de manipulación de la fermentación pueden promover tanto efectos benéficos como indeseables. Tal es el caso del Zn, que en forrajes de baja calidad puede disminuir la degradabilidad de la urea e incrementar la proporción de propionato y simultáneamente disminuir la degradación de la fibra (Arelovich et al., 2000). Este impacto del Zn sobre la fibra fue también reportado por Martínez y Church (1970) y más recientemente por Eryavuz and Dehority (2009). En este último trabajo, niveles elevados de 100 y 150 g/ml de Zn redujeron tanto la tasa como la magnitud de la digestión de la celulosa después de 72 h de incubación *in vitro*. Los autores sugieren que este efecto del Zn puede ser atribuido más a la inhibición de las enzimas celulolíticas que a las bacterias que producen dichas enzimas.

3. Implicancias medioambientales

3.1. Emisión de metano

La metanogénesis mediante la captación de protones permite al ecosistema ruminal controlar el alto poder reductor que se genera como consecuencia de fermentación anaeróbica. Sin embargo, dicho proceso implica también una gran ineficiencia energética para el animal por la pérdida de carbonos. El CH₄ mediante eructación es expulsado al medio ambiente y así se suma a otros gases con "efecto invernadero" que contribuirían al calentamiento global. Aunque la magnitud global del aporte del CH₄ proveniente de rumiantes varía según las estimaciones de diferentes autores, se lo considera de trascendencia en el impacto ambiental. Varias agencias de países o internacionales promueven programas que financian la investigación sobre como disminuir su incidencia.

La metanogénesis puede ser reducida mediante cambios en la dieta o manipulación de la fermentación a través del uso de aditivos. En este sentido, el impacto sobre las proporciones de ácidos grasos volátiles tendientes a

favorecer el incremento de propionato reducirían también emisiones de CH₄. Por ejemplo, un compuesto orgánico, la 9,10-antraquinona mostró un importante potencial para reducir la producción de CH₄ y también SH₂ durante la fermentación ruminal (Kung et al., 1998). Una apropiada combinación de nitrato con β,1-4 galacto-oligosacaridos o nisina pueden ser manipuladores efectivos de la metanogénesis sin intoxicación por nitratos (Sar et al., 2004)

Sin embargo, en el caso de la CEE existe preocupación por el uso de diversas sustancias complejas que inhiben la metanogénesis ruminal (Jentsch et al., 2007). Los minerales esenciales pueden jugar un rol en este aspecto. En algunos estudios se observó un impacto favorable de minerales esenciales sobre la composición de AGV o metanogénesis. Así, la provisión de Zn a dietas basadas en forrajes de baja calidad suplementadas con urea, incrementó la producción de propiónico en una proporción similar lo observado con monensina (Arelovich et al., 2000; Figura 3), por lo cual sería esperable una reducción de la misma magnitud en la emisión de de CH₄ que con monensina. En un estudio *in vitro* se comparó el efecto de la adición de dolomita, OMg y CO₃Ca sobre productos finales de fermentación a partir de sustratos diferentes. La dolomita modificó más que los otros la fermentación, aunque su efecto inhibitorio sobre el CH₄ dependió del tipo de sustrato (Baran et al., 2001).

3.2. Contaminación por suministro de minerales esenciales

El uso inapropiado de minerales esenciales como aditivos puede resultar en la contaminación del suelo y agua. La magnitud de la contaminación dependerá de la frecuencia y dosis utilizadas, de la retención en el producto animal y de la concentración de animales por unidad de superficie.

A la inversa en ciertas áreas contaminadas puede existir hacia el rumiante una transferencia por generación industrial de residuos minerales. Estos residuos hallados en el suelo y material vegetal implican un elevado

suministro de algunos minerales (Faixová and Faix, 2002) que pueden resultar tóxicos o impactar favorablemente sobre la fermentación ruminal, dependiendo del mineral y de su concentración.

Conclusión

La manipulación de la fermentación ruminal con efectos benéficos para la producción animal ha sido experimentalmente abordada desde la genética, la química y la nutrición. Muchas de las técnicas mencionadas para la manipulación ruminal son controversiales porque aun no salen claramente de la etapa experimental, son de difícil implementación práctica, pueden generar una respuesta negativa en el consumidor, pueden dejar residuos en los productos o el medioambiente o los resultados productivos han sido poco consistentes.

En cambio los minerales esenciales utilizados como aditivos son relativamente económicos, fáciles de obtener e incorporar a la dieta. En general se utilizan cantidades pequeñas, pero aun a concentraciones moderadas, sobre todo en ganadería extensiva, resultarían de bajo impacto ambiental. Adicionalmente, desde el punto de vista de la percepción pública los consumidores pueden identificarlos como nutrientes más que como aditivos.

Ciertas limitaciones pueden afectar el uso de los minerales como aditivos. Una de ellas es su permanencia en el líquido ruminal en concentraciones tales que permitan lograr el efecto buscado. En este sentido, para situaciones en que no se suministraron adicionalmente a la dieta, se ha reportado una amplia fluctuación en la concentración de minerales traza en el fluido ruminal. Tampoco parece haber un patrón definido para distintos intervalos de tiempo y alimentos de diferentes calidades (Sharma and Sing, 2007). Otro aspecto es la fuente del mineral suministrado y su biodisponibilidad en el rumen. Un estudio indica que la suplementación con metionina-Zn resultó una fuente de mucho mayor solubilidad de Zn a nivel ruminal que glicina-Zn o SO_4Zn (Spears et al., 2004).

En consecuencia, para aquellos elementos esenciales considerados relevantes como "aditivos", es necesaria mayor investigación para establecer cuales son las fuentes minerales y concentraciones más apropiadas, y también identificar potenciales interacciones con el tipo de dieta.

Bibliografía

- Al-jumaily, W.T. and Caldwell, D.R. 1986. Some effects of glucose and ammonia on protein synthesis by rumen bacteria. *World J. Microbiology and Biotech.*, 2: 389-398.
- Allison, M.J., Mayberry, W.R., McSweeney, C.S. and Stahl, D.A. 1992. *Synergistes jonesii* gen. nov., sp. nov.: a rumen bacterium that degrades toxic pyridinediols. *Syst. Appl. Microbiol.*, 15: 522-529.
- Annison, E.F. and Bryden, W.L. 1998. Perspectives on ruminant nutrition and metabolism I. Metabolism in the Rumen. *Nutr. Res. Rev.*, 11:173-198.
- Arelovich H.M. 1998. Effects of zinc and manganese on digestion, ruminal and blood parameters of cattle fed prairie hay. PhD Dissertation. Oklahoma State University Stillwater, OK, USA, 141 pp.
- Arelovich, H.M., Owens, F.N., Horn, G.W. and Vizcarra, J.A. 2000. Effects of supplemental zinc and manganese on ruminal fermentation, forage intake and digestion by cattle fed prairie hay and urea. *J. Anim. Sci.* 78:2972-2979.
- Arelovich, H.M., Arzadún, M.J., Laborde, H.E. and Vasquez, M.G. 2003. Performance of beef cattle grazing oats supplemented with energy, escape protein or high quality hay. *Animal Feed Sci. and Tech.*, 105: 29-42.
- Arelovich, H.M., Laborde H.E., Arzadún, M.J. and Vasquez, M.G. 2004. Influence of hay quality and pasture location on performance of beef cattle grazing oats. *Spanish J. Agric. Res.*, 2: 53-61.
- Arelovich, H.M., Laborde, H.E., Amela, M.I., Torrea, M.B. and Martínez, M.F. 2008. Effects of dietary addition of zinc and(or) monensin on performance, rumen fermentation and digesta kinetics in beef cattle. *Span J. Agric Res* 6(3), 362-372.
- Awadhesh, K. and Prakash, C. 2001. Effect of manipulation of rumen fermentation using buffers on the gain patterns of different phenotypic traits in

- crossbred calves. *Bioved*, 12: 21-26.
- Baran, M., Varadyova, Z. and Zawadzki, W. 2001. Comparative study on the effect of some mineral additives (dolomite, magnesium oxide, chalk) on rumen fermentation *in vitro*. In: Schubert, R., Flachowsky, G., Jahreis, G. and Bitsch, R. (Eds), Vitamine und Zusatzstoffe in der Ernährung von Mensch und Tier 8 Symposium, 26 und 27 September, 2001, Jena/Thuringen, Germany, p. 435-438.
- Barry, T.N. and Blaney, B.J. 1987. Secondary compounds of forages. In: Hacker, J.B. and Ternouth, J.H. (Eds). The Nutrition of Herbivores. Academic Press, Australia, p. 91-119.
- Bateman, H.G. II, Williams, C.C., Gantt, D.T., Chung, Y.H., Beem, A.E., Stanley, C.C., Goodier, G.E., Hoyt, P.G., Ward, J.D. and Bunting, L.D. 2004. Effects of zinc and sodium monensin on ruminal degradation of Lysine-HCl and liquid 2-hydroxy-4-methylthiobutanoic acid. *J. Dairy Sci.* 87: 2571-2577.
- Bertino, M., Schiffman, S., Hill, D. and Michel, A.R. 1987. Salt appetite. Intake and preference for salt in man and animals. *Annals of the N.Y. Academy of Sci.*, 510:137.
- Breytenbach S. 1999. Sulphur in Ruminant Nutrition. Stephan, Kynoch Feeds, Randburg; AFMAMatrix. http://www.engormix.com/e_articles_view.asp?art=77
- Busquet, M., Calsamiglia, S., Ferret, A. and Kamel, C. 2006. Plant extracts affect *in vitro* rumen microbial fermentation. *J. Dairy Sci.*, 89: 761-771.
- Cardozo, P.W., Calsamiglia, S., Ferret, A. and Kamel, C. 2004. Effects of natural plant extracts on ruminal protein degradation and fermentation profiles in continuous culture. *J. Anim. Sci.*, 82: 3230-3236.
- Carter, R.R. and Grovum, W.L. 1990a. A review on the physiological significance of hypertonic body fluids on feed intake a ruminal function: salivation, motility and microbes. *J. Anim. Sci.*, 68: 2811-2832.
- Carter, R.R. and Grovum, W.L. 1990b. Factors affecting the voluntary intake of food by sheep. 5. The inhibitory effect of hypertonicity in the rumen. *British J. Nut.*, 64: 285-299.
- Emanuele, S.M. and Staples, C.R. 1990. Ruminal release of minerals from six forage species. *J. Anim. Sci.*, 68:2052-2060.
- Eryavuz, A. and Dehority, B.A. 2009. Effects of supplemental zinc concentration on cellulose digestion and cellulolytic and total bacterial numbers *in vitro*. *Anim. Feed Sci. Technol. En prensa*: doi:10.1016/j.anifeedsci.2009.01.008.
- Faixová, Z. and Faix, S. 2002. Influence of metal ions on ruminal enzymes activities. *Acta Vet. BRNO*, 71: 451-455.
- Faixová, Z. and Faix, S. 2005. Manipulation of rumen nitrogen metabolism (a review). *Folia Veterinaria*, 49: 215-219.
- Faixová, Z., Faix, S., Makova, Z., Vaczi, P. and Prosbova, M. 2006. Effect of divalent ions on ruminal enzyme activities in sheep. *Acta Veterinaria Beograd.*, 56: 17-23.
- Forbes, J.M., Mbanya, J.N. and Anil, M.H. 1992. Effects of intraruminal infusions of sodium acetate and sodium chloride on silage intake by lactating cows. *Appetite*, 19: 293-301.
- Garg S.L. and Nangia O.P. 1993. Dietary effect of inclusion of sodium chloride on dilution rate and rumen fermentation in buffaloes. *Indian J. Anim. Sci.* 63: 309-317.
- Godwin, I.R. and Williams, V.J. 1986. Effects of intraruminal sodium chloride infusion on rumen and renal nitrogen and electrolyte dynamics in sheep. *Br. J. Nut.* 56: 379-394.
- Gralak, M.A., Leontowicz, H., Leonctowicz, M., Lesniewska, V. and Kulasek, G.W. 1996. The effects of calcium and sodium loading on organic matter digestibility and mineral absorption in sheep. 3. Changes in the Ca, Mg, Zn and Cu concentrations in rumen fluid. *J. Anim. Feed Sci.* 5:365-378.
- Gutierrez, C.L., Contreras, L.D., Ramirez, C.J.T., Sanchez, F. and Gonzalez, C.H. 1996. Sulphur supplementation improves rumen activity. *Feed Mix*, 4:18-19.
- Hamilton, J.A. and Webster, M.E.D. 1987. Food intake, water intake, urine output, growth rate and wool growth of lambs accustomed to high or low intake of sodium chloride. *Aust. J. Agric. Res.* 38:187-194.
- Hristov, A.N., Ropp, J.K., Grandeem, K.L., Abedi, S., Etter, R.P., Melgar, A. and Foley, A.E. 2005. Effect of carbohydrate source on ammonia utilization in lactating dairy cows. *J. Anim. Sci.*, 83: 408-421.
- Huntington, G.B., Harmon, D.L., Kristensen, N.B., Hanson, K.C. and Spears, J.W. 2006. Effects of a slow-release urea source on absorption of ammonia and endogenous production of urea by cattle. *Anim. Feed Sci. Tech.*, 130: 225-241.
- Jentsch, W., Schweigel, M., Weissbach, F., Scholze, H. and Pitroff, W. 2007. Methane production in cattle calculated by the nutrient composition of the diet. *Arch. Anim. Nut.*, 61:10-19.

- Kennedy, D.W., Craig, W.M. and Southern, L.L. 1994. Ruminal distribution of Zn in steers fed a polysaccharide-zinc complex or zinc oxide. *J. Anim. Sci.* 71:1281-1287.
- Khorasani, G.R. and Armstrong, D.G. 1990. Effect of sodium and potassium on overall digestibility of a semi-purified diet and microbial protein production in the rumen of sheep. *Livestock Prod. Sci.*, 24:347-357.
- Komisarczuk, S., Merry, R.J. and McAllan, A.B. 1987. Effect of different levels of phosphorus on rumen microbial fermentation and synthesis determined using a continuous culture technique. *Brit. J. Nut.* 57:279-290.
- Krause, D.O., Denman, S.E., Mackie, R.I., Morrison, M., Rae, A.L., Attwood, G.T. and McSweeney, C.S. 2003. Opportunities to improve fiber degradation in the rumen: microbiology, ecology, and genomics [Review]. *FEMS Microbiology Rev.*, 27: 663-693.
- Lusby, K.S. 1992. Feeding the cow herd. *In: Lusby, K.S. and Selk, G.E. (Eds). Oklahoma Beef Cattle Manual (Third Edition), Coop. Ext. Service Oklahoma State University, Stillwater, OK, E-913 p. 1-18.*
- Kung, L. Jr., Hession, A.O. and Bracht, J.P. 1998. Inhibition of sulfate reduction to sulfide by 9,10-anthraquinone in *in vitro* ruminal fermentations. *J. Dairy Sci.*, 81: 2251-2256.
- Lana, R.P., Russell, J.B. and Van Amburgh, M.E. 1998. The role of pH in regulating ruminal methane and ammonia production. *J. Anim. Sci.*, 76:2190-2196.
- Le Ruyet, P. and Tucker, B. 1992. Ruminal buffers: temporal effects on buffering capacity and pH of ruminal fluid from cows fed high concentrate diet. *J. Dairy Sci.*, 75: 1069-1077.
- Mackie, R.I., Bahrs, P.G. and Therion, J.J. 1984. Adaptation of rumen bacteria to sodium and monensin. *Can. J. Anim. Sci.* 64 (Suppl.): 351.
- Marinissen, J. 2007. Suplementación con grano de avena de terneros a pastoreo sobre un verdeo invernal. Parámetros productivos y calidad de carne. Tesis de Magister. Dto. Agronomía, Universidad nacional del Sur, 90 pp.
- Martin, S.A. 1998. Manipulation of ruminal fermentation with organic acids: a review. *J. Anim. Sci.*, 76: 3123-3132.
- Martinez, A. and Church, D.C. 1970. Effect of various mineral elements on *in vitro* rumen cellulose digestion. *J. Anim. Sci.*, 31: 982-990.
- Morales Silva, M.S. 2005. Role of ionized calcium and magnesium in cellulose degradation by ruminal bacteria. PhD Dissertation. Ohio State University, OH, USA. 180 pp.
- Morrison, M., Murray, R.M. and Boniface, A.N. 1990. Nutrient metabolism and rumen microorganisms in sheep fed a poor quality tropical grass hay supplemented with sulphate. *J. Agri. Sci. Camb.*, 115: 269-275.
- Nagaraja, T.G., Newbold, C.J., Van Nevel, C.J. and Demeyer, D.I. 1997. Manipulation of Ruminal Fermentation. *In: The Rumen Microbial Ecosystem, Hobson, P.N. and Stewart, C.S. (Eds.). Blackie Academic & Professional, London, p. 588-593.*
- NRC. 1985. Nutrient Requirements of Sheep. (6th Ed. Revised). National Research Council. National Academy Press, Washington, D.C. 99pp.
- NRC. 1980. Mineral tolerance of domestic animals National Research Council. National Academy Press, Washington, D.C. 577 pp.
- NRC. 2000. Nutrient Requirements of Beef Cattle. (7th Ed. Update). National Research Council. National Academy Press, Washington D.C. 242 pp.
- NRC. 2001 Nutrient Requirements of Dairy Cattle. (7th Ed. Revised). National Research Council. National Academy Press, Washington D.C. 381 pp.
- Owens, F.N. and Goetsch, A.L. 1993. Ruminal Fermentation. *In: Church, D.C. (Ed), The Ruminant Animal. Digestive Physiology and Nutrition. Waveland Press, Inc., Prospect Heights, IL., p. 145-171.*
- Ramirez Perez, A.H. y Meschy, F. 2005. Requerimiento de fosforo de los microorganismos ruminales: una revisión. *Interciencia*, 30: 664-670.
- Rodríguez, B.T. 1995. Factores de la dieta que afectan la actividad ureásica ruminal en ovinos alimentados con forrajes de baja calidad". Tesis de Magister. Dto. Agronomía, Universidad Nacional del Sur, 83 pp.
- Rodríguez, B.T. Arelovich, H.M., Villalba, J.J. and Laborde, H.E. 1995. Dietary supplementation with zinc and manganese improves the efficiency of nitrogen utilization by lambs. *J. Anim. Sci.*, 37(Sup1): 1233.
- Rundgren, M., Jonasson, H. and Hjelmqvist, H. 1990. Water intake and changes in plasma and CSF composition in response to acute administration of hypertonic NaCl and water deprivation in sheep. *Acta Physiol. Scand.*, 138: 85-92.

- Russell, J.B. and Tsuneto, H. 1985. Regulation of lactate production in *Streptococcus bovis*: a spiraling effect that contributes to rumen acidosis. *J. Dairy Sci.*, 68: 1712-1721.
- Santra, A. and Karim, S.A. 2003. Rumen manipulation to improve animal productivity. *Asian Australasian J. Anim. Sci.*, 16: 748-763.
- Sar, C., Santoso, B., Mwenya, B., Gamo, Y., Kobayashi, T., Morikawa, R., Kimura, K., Mizukoshi, H. and Takahashi, J. 2004. Manipulation of rumen methanogenesis by the combination of nitrate with beta 1-4 galacto-oligosaccharides or nisin in sheep. *Anim. Feed Sci. Tech.*, 115: 129-142.
- Spears J.W., Smith C.J. and Hatfield, E.E. 1977. Rumen bacterial urease requirement for nickel. *J. Dairy Sci.* 60: 1073-1076.
- Spears, J.W. and Hatfield, E.E. 1978. Nickel for ruminants. Influence of dietary nickel on rumen urease activity. *J. Anim Sci.* 47: 1345-1350.
- Suttle, N.F. 1987. The absorption, retention and function of minor nutrients. *In*: Hacker, J.B. and Ternouth, J.H. (Eds). *The Nutrition of Herbivores*. Academic Press Australia, p. 333-362.
- Teather, R.M. and Forster, R.J. 1998. Manipulating the rumen microflora with bacteriocins to improve ruminant production. *Can. J. Anim. Sci.*, 78 (Sup): 57-69.
- Tiffany, M.E., Fellner, V. and Spears, J.W. 2006. Influence of cobalt concentration on vitamin B12 production and fermentation of mixed ruminal microorganisms grown in continuous culture flow-through fermentors. *J. Anim. Sci.* 84: 635-640.
- Underwood, E.J. and Suttle, N.F. 1999. *The mineral nutrition of livestock (3rd Edition)* CABI Publishing, UK 614 pp.
- Wallace, R.J. and McKain, N. 1996. Influence of 1,10 phenanthroline and its analogues, other chelators and transition metal ions on dipeptidase activity of the rumen bacterium, *Prevotella ruminicola*. *J. Appl. Bact.*, 81: 42-47.
- Yang, W.Z., Beauchemin, K.A. and Vedres, D.D. 2002. Effects of pH and fibrolytic enzymes on digestibility, bacterial protein synthesis, and fermentation in continuous culture. *Anim. Feed Sci. Tech.*, 102: 137-150.
- Yokoyama, M.T. and Johnson, K.A. 1993. Microbiology of the rumen and the intestine. *In*: Church, D.C. (Ed), *The Ruminant Animal. Digestive Physiology and Nutrition*. Waveland Press, Inc., Prospect Heights, IL. p. 125-161.
- Zanton, G.I., Gabler, M.T. and Heinrichs, A.J. 2007. Manipulation of soluble and rumen-undegradable protein in diets fed to postpubertal dairy heifers. *Journal of Dairy-Science*, 90: 978-986.