

Voluntary intake and ruminal pH as fermentation indicators in sheep fed a lactic probiotic

Consumo voluntario y pH ruminal, como indicador de la fermentación en corderos alimentados con un probiótico láctico

D. Gutiérrez González¹ and H. Borroto Torriente²

¹Instituto de Ciencia Animal, Apartado Postal 24, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba

²Universidad Agraria de la Habana

Email: delfin@ica.co.cu

D. Gutiérrez González: <https://orcid.org/0000-0002-7386-5035>

To evaluate the effect of a lactic probiotic on voluntary intake and pH performance in sheep, four Pelibuey animals were used, distributed in a Latin square design (4x4). With an average live weight of 20.75 ± 0.84 kg, they were housed in individual metabolism cages for four periods, 15 days each (10 for adaptation and 5 for sampling), for a total of 60 days. Treatments consisted of the increasing addition (15, 25 and 35 g day⁻¹) of a lactic probiotic to the supplement offered (5 g kg LW⁻¹) on a single occasion during the day (08:30 am), followed by the supply of forage at will. It was demonstrated that dry matter voluntary intake, both absolute (1.16 vs. 1.14 kg, P=0.0011) and relative to metabolic weight (120.37 vs. 118.40 g kg LW 0.75, P=0.0008), benefited the treatment with 15 g d⁻¹ of participation of the probiotic in the diet and control, respectively. Mean ruminal pH values were 6.49 ± 0.18 and showed fluctuations between 6 and 20 h after the initial food ingestion. It is concluded that the minimum level (15 g day⁻¹) of the lactic probiotic in the diet did not affect nutrient intake with respect to control, although superior levels decreased it. This minimum level maintained the ruminal pH, with variations during the frequency of feed administration.

Key words: *lactic acid bacteria, rumen, Pelibuey sheep*

To optimize feeding systems, regarding the use of medium and low quality tropical pastures and forages, and due to the need to increase voluntary intake, productivity and health status of animals, microbial additives are currently used, mostly composed of bacteria of bacillus genus (Musa *et al.* 2009).

According to FAO (2016), the use of microbial additives (probiotics and ruminal fermentation activating microorganisms) in animal production, contributes to improve the use of food and increase productive performance. Galina *et al.* (2007) refer that the increase of voluntary intake of animals is the product of the increase of nutrient availability and the stabilization of ruminal environment, as basic elements capable of stimulating the activity of ruminal microorganisms (Ortiz *et al.* 2002).

It is suggested that rumen pH constitutes an essential physical parameter in digestion and nutrition of ruminants (de Veth and Kolver 2001). This indicator can vary between 5.2 and 7.2, depending on the type of diet and food management (Owen and Goetsch 1989). However, there is no consensus among researchers

Para evaluar el efecto de un probiótico láctico en el consumo voluntario y el comportamiento del pH ruminal en corderos, se evaluaron cuatro animales de la raza Pelibuey, distribuidos en un diseño cuadrado latino (4x4). Con peso vivo promedio de 20.75 ± 0.84 kg, se alojaron en jaulas individuales de metabolismo, durante cuatro periodos, de 15 días cada uno (10 de adaptación y 5 de muestreo), para un total de 60 días. Los tratamientos consistieron en la adición creciente (15, 25 y 35 g día⁻¹) de un probiótico láctico al suplemento ofertado (5 g kg PV⁻¹) en una sola ocasión durante el día (08:30 am), seguido del suministro del forraje a libre voluntad. Se comprobó que el consumo voluntario de materia seca, tanto absoluto (1.16 vs 1.14 kg, P= 0.0011) como relativo al peso metabólico (120.37 vs 118.40 g kg PV 0.75, P= 0.0008), benefició el tratamiento con 15 g d⁻¹ de participación del probiótico en la dieta y el control, respectivamente. Los valores medios de pH ruminal fueron de 6.49 ± 0.18 y presentaron fluctuaciones entre las 6 y 20 h posteriores a la ingestión inicial del alimento. Se concluye que el nivel mínimo (15 g día⁻¹) del probiótico láctico en la dieta no afectó el consumo de nutrientes con respecto al control, aunque niveles superiores lo disminuyen. Este nivel mínimo mantuvo el pH ruminal, con variaciones durante la frecuencia de administración del alimento.

Palabras clave: *bacterias lácticas, rumen, ovino Pelibuey*

Para optimizar los sistemas de alimentación, en lo que respecta a la utilización de los pastos y forrajes tropicales de mediana y baja calidad, y ante la necesidad de aumentar el consumo voluntario, la productividad y el estado de salud de los animales, se utilizan en la actualidad aditivos microbianos, conformados mayormente por bacterias del género Bacillus (Musa *et al.* 2009).

Según la FAO (2016), la utilización de aditivos microbianos (probióticos y microorganismos activadores de la fermentación ruminal) en la producción animal, contribuye a mejorar el aprovechamiento de los alimentos e incrementar el rendimiento productivo. Galina *et al.* (2007) refieren que el aumento del consumo voluntario por los animales se debe al incremento en la disponibilidad de nutrientes y la estabilización del ambiente ruminal, como elementos básicos capaces de estimular la actividad de los microorganismos ruminales (Ortiz *et al.* 2002).

Se plantea que el pH del rumen constituye un indicador físico esencial en la digestión y la nutrición de los ruminantes (de Veth y Kolver 2001). Este indicador puede variar entre 5.2 y 7.2, en dependencia del tipo de dieta y el manejo alimentario (Owen y Goetsch 1989). Sin embargo,

when assigning a single pH value or range, in which ruminal performance is optimized (Calsamiglia *et al.* 2002).

Therefore, the objective of this study was to evaluate the effect of a lactic probiotic on voluntary intake and performance of ruminal pH in sheep.

Materials and Methods

Location. The experiment was carried out in the Ruminant Department, belonging to the Institute of Animal Science (ICA, initials in Spanish) of the Republic of Cuba. This facility is located at 22° 53' N and 82° 02' W, at 92 meters above sea level, in San José de las Lajas municipality, Mayabeque province.

Preparation and use of the probiotic. It is a ferment reproduced in Cuba, from SORBIAL line. It was made from live Lactobacillus strains (*L. farciminis* 3699 and *L. rhamnosus* 3698), obtained from the rumen of goats, selected by *in vitro* tests (isolation and purification), associated to metabolic products resulting from lactic fermentation, which gives the product a high nutritional value and microbiological stability (table 1).

no existe consenso alguno entre los investigadores al asignar un valor único o rango de pH, en el que se optimice el funcionamiento ruminal (Calsamiglia *et al.* 2002).

Ante esta condicionante, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de un probiótico láctico en el consumo voluntario y en el comportamiento del pH ruminal en corderos.

Materiales y Métodos

Localización. El experimento se realizó en el Departamento de Rumiantes, perteneciente al Instituto de Ciencia Animal (ICA) de la República de Cuba. Esta instalación se halla ubicada a 22° 53' de latitud norte y a 82° 02' de longitud oeste, a 92 m s.n.m, en el municipio San José de las Lajas, provincia Mayabeque.

Preparación y uso del probiótico. Se trata de un fermento reproducido en Cuba, de la línea SORBIAL. Se elaboró a partir de cepas vivas de Lactobacillus (*L. farciminis* 3699, *L. rhamnosus* 3698), obtenidas del rumen de cabras, seleccionadas mediante test *in vitro* (aislamiento, purificación), asociado a productos metabólicos resultantes de la fermentación láctica, lo que le confiere al producto alto valor nutritivo y estabilidad microbiológica (tabla 1).

Table 1. Chemical and microbiological composition of lactic probiotic

	%
Soy bean meal (without fat)	85.00
Milk powder	6.00
Sugar	4.00
Water	3.00
Urea	1.00
Strain	1.00
	100.00
Bromatological composition	
Humidity, %	12.00
Crude protein (CP), %	30.00
Ether extract, %	1.50
Ashes, %	9.70
Cellulose, %	4.00
pH	3.80-4.20
Strain	
<i>L. rhamnosus</i> 3698	10 ⁹ cfu g ⁻¹
<i>L. farciminis</i> 3699	10 ⁹ cfu g ⁻¹

Treatment and design. Four healthy Pelibuey lambs were used, with an initial live weight of 20.75 ± 0.84 kg (15.56 ± 0.63 kg LW^{0.75}) and twelve months old, housed in individual metabolism cages (60 x120 cm). For the analysis, a Latin square design (4x4) was used with periods of 15 days (10 for adaptation and 5 for data collection). The allocation of treatments to animals was carried out at random, according to the statistical design used.

Tratamiento y diseño. Se utilizaron cuatro corderos enteros, de la raza Pelibuey, aparentemente sanos, con peso vivo inicial de 20.75 ± 0.84 kg (15.56 ± 0.63 kg PV^{0.75}) y doce meses de edad, alojados en jaulas individuales de metabolismo (60 x120 cm). Para el análisis se utilizó diseño cuadrado latino (4x4) con períodos de 15 días (10 de adaptación, 5 recolección de datos). La asignación de los tratamientos a los animales se realizó al azar, según el diseño estadístico empleado.

The evaluated experimental treatments consisted of four increasing levels of the probiotic (0, 15, 25 and 35 g d⁻¹) with the concentrate (5 g kg LW⁻¹), which were offered on a single occasion (08:30 am), with access to water and mineral salts at will. The basal diet consisted of grass forages (*Megathyrsus maximus* and *Cynodon nlemfuensis*) at free will, so as it allowed a level of rejection higher than 10 % of the total offered. Food intake was determined by the difference between the amount of offered and rejected food. Forage and concentrate chemical composition are shown in table 2.

Los tratamientos experimentales evaluados consistieron en cuatro niveles crecientes del probiótico (0, 15, 25 y 35 g d⁻¹) con el concentrado (5 g kg PV⁻¹), los que se ofertaron en una sola ocasión (08:30 am), con acceso al agua y sales minerales a voluntad. La dieta basal estuvo compuesta por forrajes de gramíneas (*Megathyrsus maximus*, *Cynodon nlemfuensis*) a libre voluntad, de forma que permitiera un nivel de rechazo superior al 10 % del total ofertado. El consumo de alimento se determinó por diferencia entre la cantidad de alimento ofrecido y rechazado. La composición química del forraje y el concentrado se muestran en la tabla 2.

Table 2. Chemical composition of food offered in the diet

Contribution	Value
Forage	
DM, %	90.82
OM, %	91.61
CP, %	7.79
ME, MJ kg MS ⁻¹	7.95
NDF, %	80.08
Concentrate	
DM, %	92.30
OM, %	93.80
CP, %	16.00
ME, MJ kg MS ⁻¹	9.20
NDF, %	40.60

Estimation of metabolizable energy (ME) for forage according to Maff (1984) and Díaz *et al.* (1995)
DM-dry matter, OM- organic matter, ME- metabolizable energy, NDF- neutral detergent fiber

Sanitary management. Before starting the experimental stage, animals were dewormed with ivermectin (0.2 mg kg LW⁻¹).

Measurements. In each period, for five consecutive days, and by means of the difference between weighing of offered food and the rejected one, voluntary DM intake was registered. To determine DM percentage, samples of the different foods were dried in a forced air oven at 60 °C for 48 h until reaching constant weight. After dried, they were ground (1mm) and preserved for chemical analysis.

Using an esophageal probe and during fermentation dynamics (0, 6, 12 and 20 h), after offering the probiotic plus the concentrate, ruminal liquor was extracted to determine pH, using a portable pH meter (Model pH-207 V). The result was recorded according to food incubation time, treatment, animal, period, day and time.

Samples of offered and rejected foods were subjected to proximal chemical analysis according to AOAC (2005) and fiber fractioning, according to the

Manejo sanitario. Antes de iniciar la etapa experimental, los animales se desparasitaron con ivermectina (0.2 mg kg PV⁻¹).

Mediciones. En cada período, durante cinco días consecutivos, y mediante la diferencia entre el pesaje de alimento ofrecido y el rechazado, se registró el consumo voluntario de MS. Para determinar el por ciento de MS, las muestras de los diferentes alimentos se secaron en estufa de aire forzado, a 60 °C durante 48 h hasta alcanzar el peso constante. Luego de secadas, se molieron (1mm) y conservaron para su análisis químico.

Mediante sonda esofágica y durante la dinámica de fermentación (0, 6, 12 y 20 h), posterior a la oferta del probiótico más el concentrado, se extrajo líquido ruminal para determinar el pH mediante un pHmetro portátil (Modelo pH-207 V). El resultado se registró según el tiempo de incubación del alimento, tratamiento, animal, período, día y hora.

A las muestras de los alimentos ofrecidos y rechazados, se le realizó análisis químico proximal según AOAC (2005) y fraccionamiento de la fibra, de acuerdo

methodology of Goering and van Soest (1970). All the analyzes were carried out in the Central Laboratory Unit (UCELAB, initials in Spanish), belonging to the Institute of Animal Science. While the nutritional value and microbiological characterization of the probiotic was determined at the National Center for Sugar Cane Research (CNICA, initials in Spanish).

Statistical analysis. All data for absolute variables, like total dry matter intake (tDMI), crude protein intake (CPI), metabolizable energy intake (MEI) and neutral detergent fiber intake (NDFI), followed a normal distribution according to Shapiro-Wilks (1972) test. Analysis of variance (ANOVA) was performed to results, and, in the necessary cases, Duncan (1955) test was applied to determine differences among means. Similarly, linear regression analyzes were performed among the different variables (DMI: CPI, DMI: ME) and statistical adjustment criteria (R², SE, SEP, CMEM, p) were proposed. All data was processed using INFOSTAT statistical package (Di Rienzo *et al.* 2012).

Results and Discussion

Table 3 shows that absolute DM intake (kg d⁻¹), as relative to live weight (g kg LW^{0.75}), was affected by the treatment, in which the minimum level (15 g d⁻¹) of addition of the probiotic in the experimental groups reached the highest intake value (1.16 kg d⁻¹), although with statistical similarity with respect to control.

Gutiérrez *et al.* (2020) observed a similar increase

con la metodología de Goering y van Soest (1970). La totalidad de los análisis se realizaron en la Unidad Central de Laboratorios (UCELAB), perteneciente al Instituto de Ciencia Animal. Mientras que el valor nutritivo y la caracterización microbiológica del probiótico, se determinó en el Centro Nacional de Investigaciones de la Caña de Azúcar (CNICA).

Análisis estadístico. La totalidad de los datos de las variables absolutas: consumo de materia seca total (CMSt), consumo de proteína bruta (CPB), consumo de energía metabolizable (CEM) y consumo de fibra detergente neutro (CFDN) siguieron una distribución normal según prueba de Shapiro-Wilks (1972). A los resultados se realizó análisis de varianza (ANOVA), y en caso necesario se aplicó test de Duncan (1955) para determinar diferencias entre las medias. De igual modo, se realizaron análisis de regresiones lineales entre las diferentes variables (CMS: CPB, CMS: EM) y se plantearon criterios estadísticos de ajuste (R², EE, EEP, CMEM, p). La totalidad de los datos se procesó mediante el paquete estadístico INFOSTAT (Di Rienzo *et al.* 2012).

Resultados y Discusión

En la tabla 3 se muestra que el consumo de MS, absoluto (kg d⁻¹) como relativo al peso vivo (g kg PV^{0.75}), se afectó por el tratamiento, y donde el nivel mínimo (15 g d⁻¹) de adición del probiótico en los grupos experimentales alcanzó el valor de consumo más elevado (1.16 kg d⁻¹), aunque con similitud estadística con respecto al control.

Table 3. Effect of probiotic on voluntary intake

Indicators	Probiotic level, g d ⁻¹				±SE	p
	0	15	25	35		
DMI, kg d ⁻¹	1.14 ^b	1.16 ^b	0.92 ^a	0.93 ^a	0.05	0.0011
DMI, g kgLW ^{0.75}	118.40 ^b	120.37 ^b	94.73 ^a	98.09 ^a	5.25	0.0008
DMI, %LW	5.57 ^b	5.60 ^b	4.44 ^a	4.60 ^a	0.24	0.0007
OMI, g kgLW ^{0.75}	108.50 ^c	110.05 ^c	86.88 ^a	89.91 ^b	3.85	<0.0001
CPI, g d ⁻¹	93.84 ^b	94.61 ^b	74.32 ^a	76.72 ^a	3.89	0.0002
CPI, g kg LW ⁻¹	4.58 ^b	4.62 ^b	3.60 ^a	3.72 ^a	0.19	0.0002
MEI, MJ d ⁻¹	9.24 ^b	9.33 ^b	7.41 ^a	7.65 ^a	0.09	0.0007
NDFI, % LW	4.27 ^b	4.38 ^b	3.41 ^a	3.54 ^a	0.20	0.0012
NDFI: TN, g d ⁻¹	59.88	61.04	60.02	60.30	0.95	0.8306
CPI Req. CP ⁻¹ , %	117.10 ^b	100.34 ^a	86.43 ^a	97.38 ^a	5.21	0.0014
MEI Req. ME ⁻¹ , %	155.37 ^b	156.90 ^b	124.62 ^a	128.79 ^a	6.67	0.0007

^{abc} Different letters differ for Duncan P<0.05; ± standard error of the mean

DMI: dry matter intake, OMI: organic matter intake, CPI: crude protein intake, MEI: metabolizable energy intake, NDFI: neutral detergent fiber intake, TN: total nitrogen

in DMI, in correspondence with the participation of the microbial additive in the diet, when they used *L. pentosus* LB-31 strain, as an additive for feeding Pelibuey lambs. Similarly, Gutiérrez (2012) reported similar results in goats, when different levels of the microbial biological product VITAFERT (yeast, *Lactobacillus sp.*) were used in a basically fibrous

Gutiérrez *et al.* (2020) observaron un incremento similar del CMS, en correspondencia con la participación del aditivo microbiano en la dieta, cuando utilizaron la cepa de *L. pentosus* LB-31, como aditivo en la alimentación de corderos de la raza Pelibuey. De igual modo, Gutiérrez (2012) informó resultados semejantes en cabras, cuando utilizó diferentes niveles del producto biológico

diet, in which the level of 6 mL kg LW⁻¹ also improved voluntary intake. Marrero (2005) also found an increase of total viable bacteria and, specifically, cellulolytic bacteria, which improves ration degradation and, consequently, DMI.

In this way, it can be considered that the stimulatory activity of the probiotic must have been associated, from the beginning, to the presence of active living cells in the ruminal liquor, as well as the contribution of peptides, amino acids and carbon chains from the probiotic, which could be used by ruminal microorganisms as an energy source for growth (Chen *et al.* 2007).

It is evident that this study could show a great variability of responses of the probiotic with respect to DMI. However, an analysis of statistical inferences among variables shows that DMI was related to protein intake (Y_{DMI} , kg = 0.20658 (±0.04) + 0.00987 (±0.05) X_{CPI} g d⁻¹, R²=84.80%, ±SEE=0.11, CMEM=4.88, p < 0.0001) and energy (Y_{DMI} , kg = -0.01553 (±0.02) + 0.12623 (±0.002) X_{MEI} , MJ, R²=97.61%, ±SEE = 0.05, CMEM = 5.62, p < 0.0001). According to the results of the equation, the effect of metabolizable energy intake was greater than protein intake.

Regression response indicates the degree of need for both nutrients (protein and energy), to guarantee basal development and enzymatic activity of the ruminal microorganisms and with it, the better use of ration (Malafaia *et al.* 2003 and Salgado 2006). These effects corroborate the statements of Di Marcos (2006), when they refer that protein and energy metabolism are closely related in ruminants, and the deficiency of one lead to affectations in the other.

Mean dry matter intake per unit of metabolic weight in control (107.91 ± 32.78 g kg LW^{0.75}) and in the other treatments (104.40 ± 30.40 g kg LW^{0.75}) was superior to the maximum potential value reported by García-Trujillo and Cáceres (1984) for adult sheep, fed grasses and forages (71 g kg LW^{0.75}). Likewise, it was higher than that recorded by Ruiz (2004) (80 g kg LW^{0.75}), who included 65% of Saccharina in substitution of corn or wheat.

Similarly, it exceeded the achievements (78 g kg LW^{0.75}) of Reyes-Sánchez *et al.* (2006), with a basal diet of *P. maximum* forage and 0.750 kg DM of moringa (*Moringa oleifera*) forage. This registered intake was also better than that achieved by Gutiérrez *et al.* (2014) (70.25 g kg LW^{0.75}) during the fattening of Pelibuey sheep, fed an integral mixture of sugar cane: *Cenchrus purpureus* cv. Cuba CT-169 and poultry manure (5 g kg LW⁻¹). Likewise, it was above that obtained by Rodríguez (2018) (91.19 g kg LW^{0.75}), in studies in which 16 and 33.5 % of moringa were included in integral diets for Pelibuey sheep, under conditions similar to those of the current study.

The results derived from the present study, with

microbiano VITAFERT (levaduras, *Lactobacillus sp*) en una dieta básicamente fibrosa, en la que el nivel de 6 mL kg PV⁻¹ mejoró, además, el consumo voluntario. También Marrero (2005) encontró aumento de las bacterias viables totales y, en particular, las celulolíticas, lo que mejora la degradación de la ración y, por tanto, el CMS.

De esta forma, se puede considerar que la actividad estimuladora del probiótico debió estar asociada, desde el inicio, a la presencia de células vivas activas en el fluido ruminal, así como a la contribución de péptidos, aminoácidos y cadenas carbonadas procedentes del probiótico, que pudieron ser utilizadas por los microorganismos ruminales como fuente de energía para el crecimiento (Chen *et al.* 2007).

Es evidente que este estudio pudiera mostrar una gran variabilidad de respuestas del probiótico con respecto al CMS. Sin embargo, un análisis de inferencias estadísticas entre variables, demuestra que el CMS tuvo relación con la ingestión de proteína (Y_{CMS} , kg = 0.20658 (±0.04) + 0.00987 (±0.05) X_{CPB} g d⁻¹, R²= 84.80%, ±EEE= 0.11, C_{MEM}=4.88, p < 0.0001) como de energía (Y_{CMS} , kg = -0.01553 (±0.02) + 0.12623 (±0.002) X_{CEM} , MJ, R²= 97.61%, ±EEE= 0.05, CMEM=5.62, p < 0.0001). Según los resultados de la ecuación, el efecto del consumo de energía metabolizable fue mayor con respecto al consumo de proteína.

La respuesta de la regresión indica el grado de necesidad de ambos nutrientes (proteína, energía) para garantizar el desarrollo basal y la actividad enzimática de los microorganismos ruminales y con ello, el aprovechamiento de la ración (Malafaia *et al.* 2003 y Salgado 2006). Estos efectos corroboran lo enunciado por Di Marcos (2006), cuando refieren que en los rumiantes el metabolismo proteico y energético se relaciona estrechamente, y la deficiencia de uno conlleva a afectaciones en el otro.

El consumo medio de materia seca por unidad de peso metabólico en el tratamiento control (107.91 ± 32.78 g kg PV^{0.75}) y los experimentales (104.40 ± 30.40 g kg PV^{0.75}) fue superior al valor máximo potencial informado por García-Trujillo y Cáceres (1984) para ovinos adultos, alimentados con pastos y forrajes (71 g kg PV^{0.75}). Asimismo, fue mayor al que registró Ruiz (2004) (80 g kg PV^{0.75}), quien incluyó 65 % de Saccharina en sustitución de maíz o trigo.

De igual modo, superó lo alcanzado (78 g kg PV^{0.75}) por Reyes-Sánchez *et al.* (2006) con dieta basal de forraje de *P. maximum* y 0.750 kg MS de forraje de moringa (*Moringa oleifera*). También este consumo registrado fue mejor al que lograron Gutiérrez *et al.* (2014) (70.25 g kg PV^{0.75}) durante el engorde de corderos Pelibuey, alimentados con mezcla integral de caña de azúcar: *Cenchrus purpureus* vc. Cuba CT-169 y gallinaza (5 g kg PV⁻¹). Igualmente, estuvo por encima de lo obtenido por Rodríguez (2018) (91.19 g kg PV^{0.75}), en trabajos donde incluyó 16 y 33.5 % de moringa en dietas integrales para corderos de la raza Pelibuey, en condiciones similares a las de este estudio.

Los resultados derivados del presente estudio,

15 g of probiotic in the diet, are similar (120 g kg LW^{0.75}) to those obtained by Galina *et al.* (2008) in lambs fed a probiotic prepared with lactic bacteria (*Lactobacillus sp.*) and corn silage, as basic ration. Results should have been determined by the functional fibrolytic effect of probiotic bacteria, a product of the improvement of the ruminal environment, in terms of nutrient production (amino acids, peptides and vitamins) and growth factors, which stimulated the promotion of ruminal microorganisms (Chaucheyras-Durand *et al.* 2008 and Gutiérrez 2012).

Variability of DMI could be attributed to OMI per unit of metabolic weight (g kg PV^{0.75}), in which once again the lowest level (15g) of probiotic in the diet, together with control treatment, presented higher values and differed from the rest (P < 0.0001). In this regard, Ketelaars and Tolkamp (1992) stated that OM availability of per unit of metabolic weight is directly related to OM digestibility, a variable that was not determined in this study, but that could influence on intake results.

CPI, in function of live weight (g kg LW⁻¹), did not show differences between the treatment with 15 g of probiotic in diet and control, and was superior to the remaining treatments (P < 0.0002). Similarly, despite the differences found in DMI and CPI, treatments with inclusion of probiotic did not practically cover the protein requirements. This effect must have been determined by the compensation between both variables, as a result of the increase of ration digestibility and of conversion efficiency with the inclusion of the probiotic (Ferreira *et al.* 2019). On the contrary, MEI was higher than the demand.

In correspondence with the above, Fraga *et al.* (2014) report that probiotics increase microbial protein synthesis and energy production, factors that favorably influence on ruminal environment. Ushakova *et al.* (2015) stated that these microbial additives take advantage of available nitrogenous fractions.

La Manna *et al.* (2011) and Tieri *et al.* (2010) referred that, from the maintenance stage, protein level in the diet is necessary to guarantee animal development, especially considering that protein catabolism is an essential part of energy metabolism, mainly when diet energy concentration is low. It is also known that, in the amino acid structures, present carbohydrates provide the carbon (Ørskov 1997).

NDF intake, relative to live weight (% LW), as an indicator used to express diet quality and intake (Freitas *et al.* 2000), was different (p=0.0012), with higher values in the treatments with 15g of probiotic in the diet and control. These figures exceeded the range (0.80⁻¹.20% LW), stated by van Soest (1994) for the ovine species. NDF intake represented 83.19 ± 7.63 % (range 69.86-93.43 %) of total ingested OM, in which 16.81 ± 7.63 % were soluble cellular constituents. This demonstrates the importance of considering

con 15 g del probiótico en la dieta, son análogos (120 g kg PV^{0.75}) a lo obtenidos por Galina *et al.* (2008) en corderos alimentados con un probiótico elaborado a partir de bacterias lácticas (*Lactobacillus sp.*) y ensilaje de maíz, como ración básica. Lo alcanzado debió estar determinado por el efecto fibrolítico funcional de las bacterias probióticas, producto del mejoramiento del ambiente ruminal, en cuanto a la producción de nutrientes (aminoácidos, péptidos, vitaminas) y factores de crecimiento, que estimularon el fomento de los microorganismos ruminales (Chaucheyras-Durand *et al.* 2008 y Gutiérrez 2012).

La variabilidad encontrada en el CMS se podría atribuir al CMO por unidad de peso metabólico (g kg PV^{0.75}), donde una vez más el menor nivel (15g) del probiótico en la dieta, unido al tratamiento control, presentaron valores superiores y difirieron del resto (P < 0.0001). Al respecto, Ketelaars y Tolkamp (1992) plantearon que la disponibilidad de MO por unidad de peso metabólico se relaciona directamente con la digestibilidad de la MO, variable que no se determinó en este estudio, pero que pudo influir en los resultados del consumo.

El CPB en función del peso vivo (g kg PV⁻¹) no dejó ver diferencias entre el tratamiento con 15 g del probiótico en la dieta y el control, y fue superior a los tratamientos restantes (P < 0.0002). De igual manera, a pesar de las diferencias encontradas en el CMS y el CPB, los tratamientos con la inclusión del probiótico no cubrieron prácticamente los requerimientos de proteína. Este efecto debió estar determinado por la compensación entre ambas variables, como resultado del aumento de la digestibilidad de la ración y el incremento en la eficiencia de conversión con la inclusión del probiótico (Ferreira *et al.* 2019). Por el contrario, el CEM fue superior a la demanda.

En correspondencia con lo anterior, Fraga *et al.* (2014) refieren que los probióticos incrementan la síntesis de proteína microbiana y la producción de energía, factores que influyen favorablemente en el ambiente ruminal. Ushakova *et al.* (2015) plantearon que estos aditivos microbianos aprovechan las fracciones nitrogenadas disponibles.

La Manna *et al.* (2011) y Tieri *et al.* (2010) afirman que desde la etapa de mantenimiento el nivel de proteína en la dieta es necesario para garantizar el desarrollo del animal, más si se tiene en cuenta que el catabolismo proteico es parte esencial del metabolismo energético, especialmente cuando la concentración energética de la dieta es baja. Se sabe además, que en las estructuras de los aminoácidos los carbohidratos presentes aportan el carbono (Ørskov 1997).

El consumo de FDN relativo al peso vivo (%PV), como indicador utilizado para expresar el consumo y calidad de la dieta (Freitas *et al.* 2000), resultó diferente (p=0.0012), con valores superiores en los tratamientos con 15 g del probiótico en la dieta y el control. Estas cifras superaron el rango (0.80⁻¹.20 % PV) planteado por van Soest (1994) para la especie ovina. El consumo de FDN representó 83.19 ± 7.63 % (rango 69.86-93.43 %) del total de la MO ingerida, donde 16.81 ± 7.63 % fueron constituyentes celulares

the concentration of cell solubles in fibrous diets, as available energy source during digestion process (Barahona and Sánchez 2005).

The high relationship between NDF intake and TN in all treatments, demonstrates that DMI was determined, above all, by forage ingestion and the capacity for fiber degradation by cellulolytic microorganisms (Hillal *et al.* 2011).

Table 4 shows that ruminal pH values did not differ during the ruminal fermentation time, and reached the mean value of 6.49 ± 0.18 , with marked fluctuation between 6 and 20 hours after the initial food ingestion, which must have been associated with variations of intake during the day. This suggests that substrate concentration in the rumen, such as the active growth of ruminal microbiota and fermentability, varied during the day. As observed by Cajarville *et al.* (2006), the time of access to food has an important influence on values and dynamics of ruminal pH. In this way, it is confirmed that food intake raises ruminal pH value (Khalid *et al.* 2011 and Rodríguez *et al.* 2014).

In the present study, the found pH range (6.21-

solubles. Esto demuestra la importancia de considerar la concentración de los solubles celulares en dietas fibrosas, como fuente de energía disponible durante el proceso de digestión (Barahona y Sánchez 2005).

La alta relación que se produjo entre el consumo de FDN:NT en todos los tratamientos consolida que el CMS estuvo determinado, sobre todo, por la ingestión de forraje y la capacidad de degradación de la fibra por los microorganismos celulolíticos (Hillal *et al.* 2011).

La tabla 4 muestra que los valores de pH ruminal no difirieron durante el tiempo de fermentación ruminal, y alcanzaron el valor medio de 6.49 ± 0.18 , con marcada fluctuación entre las 6 y 20 horas posteriores a la ingestión inicial del alimento, la que debió estar asociada a variaciones en el consumo durante el día. Lo anterior hace suponer que la concentración de sustrato en el rumen, como el crecimiento activo de la microbiota ruminal y la fermentabilidad, variaron durante el día. Según observaron Cajarville *et al.* (2006), el tiempo de acceso al alimento tiene una influencia importante en los valores y en la dinámica de pH ruminal. De esta manera se corrobora que el consumo de alimento eleva el valor del pH ruminal

Table 4. Effects of probiotic intake and fermentation time on ruminal pH

Time, h	Probiotic level, g d ⁻¹				±SE	p
	0	15	25	35		
0	6.32	6.22	6.21	6.22	0.31	0.6256
6	6.41	6.45	6.50	6.53	0.11	0.8989
12	6.62	6.49	6.44	6.59	0.14	0.8068
20	6.65	6.65	6.78	6.74	0.06	0.3872

p < 0.05 (Duncan 1955); ± Standard Error

6.78) is the one indicated by Krause and Oestzel (2006) (5.5 -7.0) as values that do not affect growth of cellulolytic and hemicellulolytic microorganisms, their enzymatic activity and with this, the increase of metabolism products (Marrero 2005 and Gutiérrez 2012). Although according to López *et al.* (2017), when probiotics were used in the diet, the ruminal environment tended to reduce oxygen traces, lactate presence and the use of lactic acid, maintaining a slightly acid pH (6.5). This promotes the growth of cellulolytic microorganisms and improves degradability of structural carbohydrates, as referred above.

Other authors refer that intake of probiotics maintains the stability of ruminal pH, as a result of bacterial increase and the production of volatile fatty acid, as well as the lower permanence of food in the rumen and the increase of use efficiency and food intake (Ortiz-Rubio *et al.* 2009 and Solaiman and Owen 2010). In addition, the basically fibrous rations, as the one used in this study, were able to increase rumination, chewing, saliva segregation and buffer capacity (carbonates and phosphates).

In control treatment, from the first incubation stage

(Khalid *et al.* 2011 and Rodríguez *et al.* 2014).

En el presente estudio, el rango de pH encontrado (6.21-6.78) se halla en el que señalaron Krause y Oestzel (2006) (5.5 -7.0) como valores que no afectan el crecimiento de los microorganismos celulolíticos y hemicelulolíticos, su actividad enzimática y con ello, el incremento de los productos del metabolismo (Marrero 2005 y Gutiérrez 2012). Aunque según López *et al.* (2017), cuando utilizaron probióticos en la dieta, el ambiente ruminal tendió a reducir las trazas de oxígeno, la presencia de lactato y la utilización de ácido láctico, manteniendo el pH ligeramente ácido (6.5). Esto promueve el crecimiento de microorganismo celulolíticos y mejora la degradabilidad de los carbohidratos estructurales, como se ha referido anteriormente.

Otros autores refieren que el consumo de probióticos mantiene la estabilidad del pH ruminal, como resultado del incremento bacteriano y de la producción de ácido graso volátil, así como la menor permanecía del alimento en rumen y el incremento de la eficiencia en la utilización y consumo de los alimentos (Ortiz-Rubio *et al.* 2009 y Solaiman and Owen 2010). A lo anterior se suma que las raciones básicamente fibrosas, como la utilizada en este estudio, pudieron aumentar la rumia, la masticación, la

(6h), pH values indicated low availability of simple carbon chains to be used by cellulolytic bacteria, an element that should have influenced on fermentation capacity of structural carbohydrates during the rest of the fermentation stages. In this regard, NRC (2000) points out that, in basic forage diets, as the one used in this treatment, available protein rapidly degrades, while energy (NDF components) is slow. These factors affect digestion, pH values and food permanence in the rumen.

Hillal *et al.* (2011) stated that ruminal pH variations are determined by the frequency of food provision, ration fermentability and buffer addition during the fermentation time. These effects should have occurred in this study, as well as the possible interaction with bacteria that use lactic acid.

Conclusions

The minimum level (15 g d⁻¹) of lactic probiotic in the diet did not affect nutrient intake with respect to control, although higher levels decreased it, and maintained ruminal pH with variations during the frequency of food provision.

segregación de saliva y la capacidad tampón (carbonatos y fosfatos).

En el tratamiento control, desde la primera etapa de incubación (6h), los valores de pH indican baja disponibilidad de cadenas carbonadas simples para ser utilizadas por las bacterias celulolíticas, elemento que debió influir en la capacidad fermentativa de los carbohidratos estructurales durante el resto de las etapas fermentativas. Al respecto, el NRC (2000) señala que, en dietas básicas de forraje, como la utilizada en este tratamiento, la proteína disponible se degrada rápidamente, mientras que la energía (componentes de la FDN) lo hace de manera más lenta. Estos factores repercuten en la digestión, los valores del pH y la permanencia del alimento en el rumen.

Hillal *et al.* (2011) plantearon que las variaciones del pH ruminal están determinadas por la frecuencia de administración del alimento, fermentabilidad de la ración y adición de sustancias tampón durante el tiempo de fermentación. Estos efectos debieron ocurrir en este estudio, así como la posible interacción con las bacterias que utilizan el ácido láctico.

Conclusiones

El nivel mínimo (15 g d⁻¹) del probiótico láctico en la dieta no afectó el consumo de nutrientes con respecto al control, aunque niveles superiores lo disminuyen, y mantienen el pH ruminal con variaciones durante la frecuencia de administración del alimento.

References

- AOAC (Association of Official Analytical Chemists). 2005. 18th Ed. Ed. AOAC International, Gaithersburg, Maryland., USA, pp. 14-27, ISBN: 0-935584-77-3.
- Barahona, R. & S. Sánchez. 2005. "Limitaciones físicas y químicas de la digestibilidad de pastos tropicales y estrategias para aumentarla". *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 6(1): 69-82, ISSN: 122-8706.
- Cajarville, C., Aguerre, M. & Repetto, J.L. 2006. "Rumen pH, NH₃-N concentration and forage degradation kinetics of cows grazing temperate pastures and supplemented with different sources of grain". *Animal Research*, 55(6): 511-520, ISSN: 1627-3591, DOI: <https://doi.org/10.1051/animres:2006036>.
- Calsamiglia, S., Ferret, A. & Devant, M. 2002. "Effects of pH and pH fluctuations on microbial fermentation and nutrient flow from a dual-flow continuous culture system". *Journal of Dairy Science*, 85(3): 574-579, ISSN: 1525-3198, DOI: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(02\)74111-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(02)74111-8).
- Chaucheyras-Durand, F., Walker, N.D. & Bach, A. 2008. "Effects of active dry yeasts on the rumen microbial ecosystem: Past, present and future". *Animal Feed Science and Technology*, 145(1-4): 5-26, ISSN: 0377-8401, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2007.04.019>.
- Chen, Y.S., Srionnual, S., Onda, T. & Yanagida, F. 2007. "Effects of prebiotic oligosaccharides and trehalose on growth and production of bacteriocins by lactic acid bacteria". *Letters in Applied Microbiology*, 45(2): 190-193, ISSN: 1472-765X, DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2007.02167.x>.
- De Veth, M.J. & Volver, E.S. 2001. "Digestion of ryegrass pasture in response to change in pH in continuous culture". *Journal of Dairy Science*, 84(6): 1449-1457, ISSN: 1525-3198, DOI: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(01\)70178-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(01)70178-6).
- Di Marcos, O.N. 2006. "Eficiencia de utilización del alimento en vacuno". *Revista Visión Rural*, 13(61): 19-22, ISSN: 0326-7009.
- Di Rienzo, J.A., Casanoves, F., Balzarini, M.G., González, L., Tablada, M. & Robledo, C.W. 2012. *InfoStat*. Version 2012 [Windows]. Grupo InfoStat, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina, Available: <http://www.infostat.com.ar>.
- Díaz, Y., Escobar, A. & Viera, J. 1995. "Efecto de la substitución parcial del suplemento convencional por follaje de pacheco (*Pachecoa venezuelensis*) o gliricidia (*Gliricidia sepium*) en la alimentación de corderos postdestete". *Livestock Research for Rural Development*, 7(1), ISSN: 0121-3784, Available: <http://www.fao.org/AG/AGa/AGAP/FRG/lrrd/lrrd7/1/2.htm>.
- Duncan, D.B. 1955. "Multiple Range and Multiple F Tests". *Biometrics*, 11(1): 1-42, ISSN: 0006-341X, DOI: <https://doi.org/10.2307/3001478>.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2016. *Probiotics in Animal Nutrition-Production, impact and regulation*. Yadav S. Bajagai, Athol V. Klieve, Peter J. Dart and Wayne L. Bryden. Harinder Makkar, P.S. (ed). FAO Animal Production and Health Paper No. 179. Rome, Italy, ISBN: 978-92-5-109333-7.
- Ferreira, S., Viano, S., Gonzalez, L., Mendez, D., Depetris, G., Riffel, S., Elizalde, J., Montiel, D. & Ceconi, I. 2019. "Manejo

- de la oferta de alimento y su impacto sobre la performance de novillos terminados a corral". *Revista Argentina de Producción Animal*, 39(1): 27-67, ISSN: 2314-324X.
- Fraga, M., Perelmuter, M.J., Valencia, M., Martínez, A., Abin-Carriquiry, C. & Zunino, P. 2014. "Evaluation of native potential probiotic bacteria using an *in vitro* ruminal fermentation system". *Annals of Microbiology*, 64(3):1149-1156, ISSN: 1869-2044, DOI: <https://doi.org/10.1007/s13213-013-0753-3>.
- Freitas, T.S., Prates, E.R. & Barcellos, J.O.J. 2000. Relacao entre consumo por ovinos de gramíneas e leguminosas com o conteudo de FDN In: Reuniao da Sociedade Brasileira de Zootecnia, Vol.27, Vicoso, Minas Gerais, Brasil.
- Galina, M.A., Ortiz-Rubio, M.A. & Guerrero, M. 2007. Desarrollo de cabras con o sin suplementación, con un probiótico de bacterias lácticas. *Memorias V Congreso de Especialistas en Pequeños Rumiantes y Camélidos Sudamericanos*, Mendoza, Argentina.
- Galina, M.A., Ortiz-Rubio, M.A., Guerrero, M., Mondragón, D.F., Franco, N.J. & Elías, A. 2008. "Efecto de un ensilado de maíz solo o inoculado con un probiótico láctico y adicionado con un suplemento nitrogenado de lento consumo en ovinos". *Avances en Investigación Agropecuaria*, 12(2): 23-34, ISSN: 2683-1716.
- García-Trujillo, R. & Cáceres, O. 1984. Nuevos sistemas para expresar el valor nutritivo de los alimentos y el requerimiento y racionamiento de los rumiantes (Folleto No.161). Estación Experimental de Pastos y Forrajes Indio Hatuey, Matanzas, Cuba.
- Goering, H.K. & Van Soest, P.J. 1970. Forage fiber analysis. In: *Agricultural Handbook No. 379*. Ed. U.S.D.A. Agricultural Research Service, Department of Agriculture, Washington D.C., USA, pp.1-20.
- Gutiérrez, D.G. 2012. Efecto del aditivo biológico VITAFERT en dietas de forraje de baja calidad para la alimentación de cabras lecheras. PhD Thesis. Departamento de Rumiantes, Instituto de Ciencia Animal, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba.
- Gutiérrez, D., García, Y. & Sosa, D. 2020. "El efecto de *Lactobacillus pentosus* LB-31 como aditivo microbiano en la alimentación de corderos". *Livestock Research for Rural Development*, 32(3), Article #43, ISSN: 0121-3784, Available: <http://www.lrrd.org/lrrd32/3/yanei32043.html>.
- Gutiérrez, D., Gutiérrez, G.Y., Ángel, G.P., Elías, A., García, R., Stuart, J. & Sarduy, L. 2014. "Utilización de la caña de azúcar en mezclas integrales frescas para la alimentación de corderos". *Revista Centro Azúcar*, 41(3): 64-77, ISSN: 2223-4861.
- Hillal, H., El-Sayaad, G. & Abdella, M. 2011. "Effect of growth promoters (probiotic) supplementation on performance, rumen activity and some blood constituents in growing lambs". *Archiv für Tierzucht*, 54(6): 607-617, ISSN: 0003-9438.
- Ketelaars, J.J.M.H. & Tolkamp, B.J. 1992. "Toward a new theory of feed intake regulation in ruminants 1. Cause of differences in voluntary feed intake: critique of current views". *Livestock Production Science*, 30: 269-296, ISSN: 0301-6226, DOI: [https://doi.org/10.1016/0301-6226\(92\)90039-7](https://doi.org/10.1016/0301-6226(92)90039-7).
- Khalid, M.F., Shahzad, A., Sarwar, M., Rehman, A.U., Sharif, M. & Mukhtar, N. 2011. "Probiotic and lamb performance: A review". *African Journal of Agricultural Research*, 6(23): 5198-5203, ISSN: 1991-637X, DOI: <https://doi.org/10.5897/AJAR11.1134>.
- Krause, K.M. & Oetzel, G.R. 2006. "Understanding and preventing subacute ruminal acidosis in dairy herds. A review". *Animal Feed Science and Technology*, 126(3-4): 215-236, ISSN: 0377-8401, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2005.08.004>.
- Kruskal, W.H. & Wallis, W.A. 1952. "Use of ranks in one-criterion variance analysis". *Journal of the American Statistical Association*, 47(260): 583-621, ISSN: 1537-274X, DOI: <https://doi.org/10.1080/01621459.1952.10483441>.
- La Manna, A., Tieri, M.P., Banchemo, G., Mieres, J., Fernández, E. & Pérez, E. 2011. "El nivel de proteína y su posible sustitución por urea en terneros. ¿Tiene efecto en la performance inmediata y/o posterior de los animales en su recría?" *Revista INIA*, (25): 13-15, ISSN: 1510-9011.
- López R., Pinto-Santini L., Perozo, D., Pineda, J., Oliveros, I. & Chacón, T., *et al.* 2012. "Thermal comfort and growth of West African lambs grazing with and without access to artificial shade". *Archivos de Zootecnia*, 64(246): 139-146, ISSN: 0004-0592.
- MAFF (Ministry of Agriculture, Fisheries and Food). 1984. Energy allowances and feeding systems for ruminants. Reference Book No. 433. HMSO. London, England.
- Malafai, P., Silva C.L., Mendoca, R.A., Magnoli, C.R. & Brandao, C.A. 2003. "Protein energy supplementation for cattle raised on tropical pasture. Theoretical aspects and main results published in Brazil". *Livestock Research for Rural Development*, 15(12), Article #92, ISSN: 0121-3784, Available: <http://www.lrrd.org/lrrd15/12/mala1512.htm>.
- Marrero, Y.R. 2005. Las levaduras como mejoradoras de la fermentación ruminal de dietas con alto contenido de fibra. PhD Thesis. Departamento de Fisiología y Bioquímica, Instituto de Ciencia Animal, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba.
- Musa, H.H.M., Wu, C.H., Zhu, H.I., Seri, S.L. & Zhu, G.Q. 2009. "The potencial benefits of probiotics in animal production and health". *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 8(2): 313-321, ISSN: 1680-5593.
- NRC (National Research Council). 2000. Nutrient requirements of beef cattle. Ed. National Academy Press. Washinton, D.C., USA, p. 234.
- Ørskov, E.R. 1997. "Recent advances in protein and energy nutrition in ruminants and its practical implications". *Revista Argentina de Producción Animal*, 17(3): 191-195, ISSN: 2314-324X.
- Ortiz-Rubio, R., Galina, M.A. & Carmona, M.M.A. 2002. "Effect of slow non-protein nitrogen ruminal supplementation on improvement of *Cynodon nlemfuensis* or *Brachiaria brizanta* utilization by Zebu steers". *Livestock Production Science*, 78(2): 125-131, ISSN: 0301-6226, DOI: [https://doi.org/10.1016/S0301-6226\(02\)00089-1](https://doi.org/10.1016/S0301-6226(02)00089-1).
- Ortiz-Rubio, R., Galina, M.A. & Pineda, L.J. 2009. "Effect of slow nitrogen intake supplementation with or without lactic probiotic on Pelibuey lamb growth". *Options Mediterraneens, Serie A. Sèminaires*, (85): 309-314, ISSN: 1016-121X.
- Owen, F.N. & Goetsch, L. 1989. Ruminant fermentation. In: *The Ruminant Animal. Digestive Physiology and Nutrition*. Church, D.C. (ed). Ed. Waveland Press Inc. Illinois, USA, pp. 145-171, ISBN: 978-0-88133-740-2.
- Reyes-Sanchez, N., Ledin, S. & Ledin, I. 2006. "Biomass production and chemical composition of *Moringa oleifera* under

- different management regimes in Nicaragua". *Agroforestry Systems*, 66(3): 231-242, ISSN: 1572-9680, DOI: <https://doi.org/10.1007/s10457-005-8847-y>.
- Rodríguez, A.A., Martínez, E.M., Solórzano, L.C. & Randel, P.F. 2014. "Consumo y digestibilidad de una dieta para corderos basada en heno de gramíneas tropicales y de *Hyparrhenia rufa* con un probiótico aportador de *Bacillus subtilis* y *Bacillus licheniformis*". *Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico*, 98(2): 147-168, ISSN: 0041-994X.
- Rodríguez, L.A. 2018. Uso de mezclas integrales con diferentes proporciones de Moringa oleífera, *Cenchrus purpureus* cv Cuba OM-22 y caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) en la alimentación de corderos. Master Thesis. Departamento de Rumiantes, Instituto de Ciencia Animal, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba.
- Ruiz, C.J. 2004. Engorda intensiva de ovinos con raciones integrales basadas en sacharina. PhD Thesis. Universidad de Colima, Colima, México.
- Salgado, V.V. 2006. Metabolismo del nitrógeno y funciones ruminales en vacas cruzadas *Bos taurus* x *Bos indicus* en un sistema silvopastoril con *Leucaena leucocephala*. PhD Thesis. Universidad Autónoma de Yucatán, Yucatán, México.
- Shapiro, S.S. & Francia, R.S. 1972. "An approximate analysis of variance test for normality.. *Journal of the American Statistical Association*, 67(337): 215-216, ISSN: 1537-274X, DOI: <https://doi.org/10.1080/01621459.1972.10481232>.
- Solaiman, S.G. & Owens, F.N. 2010. Digestive Physiology and Nutrient Metabolism. In: *Goat Science and Production*. Ed. Wiley & Blackwell Publishing. Ames, Iowa, USA, pp. 157-178, ISBN: 978-0-8138-0936-6.
- Tieri, M.P., La Manna, A., Fernández, E., Mieres, J., Schroer, F., Pérez, E., Baldi, F. & Banchemo, G. 2010. Efecto de diferentes niveles de proteína y sustitución de proteína verdadera por nitrógeno no proteico (urea) en la performance y desarrollo de terneros cruza Hereford x Angus y su impacto posterior en la recría. (Documento Online No. 137). Jornada de Invernada Intensiva: Producción de carne desde una invernada de precisión, INIA La Estanzuela, Colonia, Uruguay, pp. 23-26, Available: <http://www.ainfo.inia.uy/digital/bitstream/item/11871/1/SAD-609P23-26.pdf> [Consulted: February 3th, 2019].
- Ushakova, N.A., Nekrasov, R.V., Pravdin, I.V., Sverchkova, N.V., Kolomiyets, E.I. & Pavlov, D.S. 2015. "Mechanisms of the effects of probiotics on symbiotic digestion". *Biology Bulletin*, 42(5): 394-400, ISSN: 1608-3059, DOI: <https://doi.org/10.1134/S1062359015050131>.
- Van Soest, P.J. 1994. Nutritional ecology of the ruminant. 2nd Ed. Ed. Cornell University Press. Ithaca, New York, USA, p. 476, ISBN: 978-0801427725.

Received: September 8, 2020

Accepted: November 23, 2020