



**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**Programa de Posgrado**

**UTILIZACIÓN DE INULINA, ALFALFA Y PULPA DE CITRUS  
COMO ADITIVOS EN DIETAS PARA LECHONES: ASPECTOS  
NUTRICIONALES, FERMENTATIVOS, MICROBIOLÓGICOS Y  
MORFOMÉTRICOS DIGESTIVOS**

**LUIS SEBASTIÁN BRAMBILLASCA ALZA**

**TESIS DE MAESTRIA EN PRODUCCIÓN ANIMAL**

**URUGUAY  
2011**





**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**Programa de Posgrado**

UTILIZACIÓN DE INULINA, ALFALFA Y PULPA DE CITRUS  
COMO ADITIVOS EN DIETAS PARA LECHONES: ASPECTOS  
NUTRICIONALES, FERMENTATIVOS, MICROBIOLÓGICOS Y  
MORFOMÉTRICOS DIGESTIVOS

**LUIS SEBASTIÁN BRAMBILLASCA ALZA**

**María Cecilia Cajarville Sanz**  
(Directora de Tesis)

**Pablo Miguel Zunino Abirad**  
(Co-director de Tesis)

**2011**

## **INTEGRACIÓN DEL TRIBUNAL DE DEFENSA DE TESIS**

**Ing. Agr. MSc. María de Jesus Marichal**

Depto. Producción Animal y Pasturas,  
Facultad de Agronomía,  
Universidad de la República

**Dr. PhD. Ali Saadoun Banchotet**

Sección Fisiología y Nutrición,  
Facultad de Ciencias,  
Universidad de la República

**Ing. Agr. PhD. María Cristina Cabrera Bascardal**

Depto. Producción Animal y Pasturas,  
Facultad de Agronomía,  
Universidad de la República

# COPIA DEL ACTA DE DEFENSA DE TESIS



**FACULTAD DE VETERINARIA  
Programa de Posgrados**

**ACTA DE APROBACIÓN DE TESIS**

**DE MAESTRÍA EN PRODUCCIÓN ANIMAL**

**“UTILIZACIÓN DE INULINA, ALFALFA Y PULPA DE CITRUS  
COMO ADITIVOS EN DIETAS PARA LECHONES: ASPECTOS  
NUTRICIONALES, FERMENTATIVOS, MICROBIOLÓGICOS Y  
MORFOMÉTRICOS DIGESTIVOS”**

**Por: Dr. Luis Sebastián Brambillasca Alza  
Directora de Tesis: Dra. Cecilia Cajarville  
Codirector de Tesis: Dr. Pablo Zunino**

**Tribunal**

**Presidente: Ing. Agr. María de Jesús Marichal**

**Segundo Miembro: Dr. Ali Saadoun**

**Tercer Miembro: Dra. Cristina Cabrera**

**Fallo del Tribunal: Aprobada con mención**

**Montevideo, 25 de noviembre de 2011**

# INFORME DEL TRIBUNAL



## ACTA DE EXAMEN

**CURSO:** Defensa de Tesis de Maestría

**LUGAR Y FECHA DE LA DEFENSA:** 25 de noviembre de 2011

**TRIBUNAL:** Ing. Agr. María de Jesús Marichal (Presidente), Dr. Ali Saadoun, Dra. Cristina Cabrera

CI ESTUDIANTE	NOMBRE	CALIFICACIÓN	NOTA
3.071.537-4	BRAMBILLASCA ALZA, Luis Sebastián	S.S.S.	12

PRESENTADOS	NO PRESENTADOS	APROBADOS	APLAZADOS	INSCRIPTOS
1	0	1	0	1

**TRIBUNAL**

Ing. Agr. María de Jesús Marichal (Presidente)

Dr. Ali Saadoun

Dra. Cristina Cabrera

**FIRMA**

**NOTA:** La calificación mínima para aprobar el examen es B.B.B (6)

*“Las ciencias aplicadas no existen, sólo las aplicaciones de la ciencia”.*  
Louis Pasteur

## AGRADECIMIENTOS

Esta sección quiero recordar a todos los que me acompañaron en este trecho. Porque bien dicen que detrás de cada línea de llegada, siempre hay una nueva de partida.

A Neli y Ricardo (mis viejos), Fiorella (mi hermana) y Pancho (mi cuñado) por todo el apoyo moral, logístico y edilicio (¡sí, todavía me siguen aguantando en casa!, esperemos que por poco).

A Ana, por los momentos juntos, por los momentos de ausencia, y por bancarse hasta muestreos en Libertad. Una gran compañera.

A Cecilia y Joselo, porque este grupo humano que poco a poco se va consolidando se ha podido convertir en una realidad gracias a ustedes.

A Pablo, porque los docentes que apuestan a la formación de los más jóvenes son el capital más rico de las instituciones.

A todos los que venimos en el mismo carro: Ale, Analía, Martín, Carolina, Alvarito, Natalia, Alicia, Ale Mendoza, Sancho, Rodrigo, Jana, Nicolle, Mauro, Jacinta, Juan Pablo, gracias por la compañía. Y por generar un ambiente donde cada mañana uno siente ganas de arrancar pa'l laburo (lo que no es poco).

A Melina Hernández, Florencia Pieruccioni, Eduardo Menezes, Lucía Rivero, Raúl Zinola, Elena Reyes, Karina Cabrera, Gianina Bertoglio y Carolina Fros, porque sin su apoyo esto no hubiese sido posible.

A Carola Deluca y Lucía Reyes.

A Alejandro Bielli, Patricia Genovese y Nadia de histología.

A Mariana Carriquiry y Andrea González.

A Adrián Patetta, amigo, colega, pandense.

A Mendez, porque uno le tira un par de ideas y él le arma las tales jaulas metabólicas.

A Elena de Torres y personal del Campo de Libertad.

A Elsa Garófalo y personal del Programa de Posgrados de FVet.

A la Facultad de Veterinaria.

A la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (Sistema Nacional de Becas: BE\_POS\_2009\_544) por el apoyo económico (sí, ya voy!, ya termino, ya termino).



## LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

	<b>Página</b>
<b>Cuadro I.</b> Ingredientes y composición química de las dietas experimentales, alfalfa y pulpa de citrus frescas utilizadas.	<b>15</b>
<b>Cuadro II.</b> Efecto de la inclusión de los aditivos en la dieta sobre parámetros productivos en lechones.	<b>21</b>
<b>Cuadro III.</b> Efecto de la inclusión de los aditivos en la dieta sobre la digestibilidad aparente de los nutrientes en lechones.	<b>21</b>
<b>Cuadro IV.</b> Efecto de la inclusión de los aditivos en la dieta sobre las características fecales y de la digesta en lechones.	<b>22</b>
<b>Cuadro V.</b> Efecto de la inclusión de los aditivos sobre la ingestión, excreción y retención de N en lechones.	<b>23</b>
<b>Cuadro VI.</b> Efecto de la inclusión de los aditivos en la dieta sobre las poblaciones bacterianas colónicas en lechones.	<b>23</b>
<b>Cuadro VII.</b> Cinéticas de fermentación <i>in vitro</i> de alimento control (CON) pre-digerido utilizando como inóculo digesta colónica de lechones alimentados con dietas suplementadas o no con aditivos.	<b>24</b>
<b>Cuadro VIII.</b> Efecto de la inclusión de los aditivos en la dieta sobre el peso vacío y la longitud de los segmentos digestivos de lechones.	<b>25</b>
<b>Cuadro IX.</b> Efecto de la inclusión de los aditivos en la dieta sobre el peso y la longitud relativa (g o cm/kg PV) de los segmentos digestivos de lechones.	<b>26</b>
<b>Cuadro X.</b> Efecto de la inclusión de los aditivos en la dieta sobre la morfometría histológica del íleon.	<b>26</b>
<b>Figura 1.</b> Esquema del período experimental	<b>15</b>
<b>Figura 2.</b> Cinéticas de producción de gas <i>in vitro</i> y tasas de fermentación a través de 92 h de incubación de alimento control (CON) pre-digerido incubado digesta colónica de lechones alimentados con dietas suplementadas o no con aditivos. Las barras indican el error estándar en cada punto de medición.	<b>24</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

**A:** producción de gas asintótica (mL/g MO) en el fermentador *in vitro*.

**AGV:** ácidos grasos volátiles.

**ALF:** dieta conteniendo 95,5% CON+4,5% de alfalfa fresca.

**B:** característica de conmutación de la curva de producción de gas.

**C:** tiempo en el que se alcanza la mitad de la asíntota ( $T_{1/2}$ ) de producción de gas.

**CIT:** dieta conteniendo 95,5% CON+4,5% de pulpa de citrus fresca.

**cm:** centímetros.

**CON:** 100% de una dieta control basada en harina de soja y maíz.

**CRA:** capacidad de retención de agua.

**d:** tiempo en días.

**DMO:** desaparición de la materia orgánica.

**EE:** extracto Etéreo.

**FAD:** fibra detergente ácida.

**FDN:** fibra detergente neutra.

**FEDNA:** Federación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal.

**FOS:** fructo-oligosacáridos.

**FVet:** Facultad de Veterinaria.

**g:** gramos.

**G:** total de gas producido (mL/g MO) en el fermentador *in vitro*.

**h:** tiempo en horas.

**Hemic.:** Hemicelulosas.

**IIBCE:** Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable.

**INU:** dieta conteniendo 97% CON+3% de inulina.

**kg:** kilogramos.

**L:** litros.

**m:** metros.

**ml:** mililitros.

**MO:** materia orgánica.

**MOS:** manano-oligosacáridos.

**MRS:** agar de Mann, Rogosa y Sharpe.

**MS:** materia seca.

**NRC:** National Research Council.

**PB:** proteína bruta.

**PBS:** solución tampón salina fosfatada.

**PV:** peso vivo.

**Psi:** libras por pulgada al cuadrado.

**R<sub>max</sub>:** tasa máxima de fermentación en el fermentador *in vitro*.

**t:** tiempo medido en horas.

**TGI:** tracto gastro-intestinal.

**T<sub>max</sub>:** tiempo en el que se produce la : tasa máxima de fermentación en el fermentador *in vitro*.

**TSA:** agar soja tripticasa.

**UFC:** unidades formadoras de colonias.

# ÍNDICE

	<b>Página</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	<b>i</b>
<b>LISTA DE CUADROS Y FIGURAS</b>	<b>ii</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	<b>iii</b>
<b>1. RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>2. SUMMARY</b>	<b>2</b>
<b>3. INTRODUCCIÓN</b>	<b>3</b>
<b>4. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS</b>	<b>4</b>
4.1. Probióticos	<b>5</b>
4.2. Prebióticos	<b>5</b>
4.3. Carbohidratos fermentables	<b>6</b>
4.4. La importancia de estimular la fermentación en el intestino grueso	<b>6</b>
4.5. Efectos indeseables de la inclusión de prebióticos y carbohidratos fermentables en la dieta	<b>8</b>
4.6. Los subproductos y las pasturas de buena calidad como potenciales prebióticos	<b>9</b>
<b>5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	<b>12</b>
<b>6. HIPÓTESIS</b>	<b>13</b>
<b>7. OBJETIVOS</b>	<b>13</b>
7.1. Objetivo general	<b>13</b>
7.2. Objetivos específicos	<b>13</b>
<b>8. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>14</b>
<b>8.1. MEDICIONES Y CÁLCULOS</b>	<b>16</b>
8.1.1. Consumo, parámetros productivos y digestibilidad	<b>16</b>
8.1.2. Balance de nitrógeno	<b>16</b>
8.1.3. Parámetros fecales	<b>16</b>
8.1.4. Actividad fermentativa de la microbiota del colon	<b>17</b>
8.1.5. Microbiología intestinal	<b>18</b>
8.1.6. Morfometría del TGI	<b>18</b>
8.1.7. Análisis químicos	<b>19</b>
8.1.8. Análisis estadístico	<b>19</b>
<b>9. RESULTADOS</b>	<b>21</b>
9.1. Rendimiento productivo y digestibilidad aparente	<b>21</b>
9.2. Parámetros fecales	<b>22</b>

9.3. Balance de nitrógeno	22
9.4. Microbiología intestinal	23
9.5. Actividad fermentativa de la microbiota del colon	23
9.6. Morfometría del TGI	25
<b>10. DISCUSIÓN</b>	<b>27</b>
<b>11. CONCLUSIONES</b>	<b>32</b>
<b>12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>33</b>
<b>13. ANEXO</b>	<b>44</b>

## 1. RESUMEN

Se evaluó el efecto de la inclusión de inulina, alfalfa fresca y pulpa de citrus fresca en dietas para lechones sobre parámetros productivos, nutricionales, fecales, recuentos bacterianos y actividad fermentativa en el colon, y morfometría gastrointestinal. Se utilizaron 24 lechones de raza híbrida (PV inicial:  $9,75 \pm 1,63$  kg; PV final:  $18,77 \pm 2,68$ ) en un diseño de bloques al azar, alojados en jaulas metabólicas y asignados a uno de 4 tratamientos: 100% de una dieta control basada en harina de soja y maíz (CON), 97% CON+3% de inulina (INU), 95,5% CON+4,5% de alfalfa fresca y 95,5% CON+4,5% de pulpa de citrus fresca (CIT). El experimento consistió en un período de adaptación de 12 días seguido por 11 días de toma de muestras. Durante los últimos dos días del experimento todos los animales fueron sacrificados, el tracto digestivo de cada animal fue removido y se tomaron muestras individuales de la digesta del íleon y colon. Se evaluó el consumo de alimento, parámetros productivos, digestibilidad de los nutrientes, utilización del N, características fecales, recuentos bacterianos en colon, la actividad fermentativa de la microbiota del colon mediante la producción de gas *in vitro*, el tamaño en peso y longitud de los órganos del tracto gastrointestinal y la histología cuantitativa del íleon. Los datos fueron analizados por un procedimiento mixto (PROC MIXED) considerando el efecto del tratamiento y las medias fueran separadas por contrastes ortogonales. Los datos de microbiología fueron analizados por un método no paramétrico. La inclusión de aditivos no modificó los parámetros productivos (consumo, ganancia o conversión), las poblaciones bacterianas medidas en colon, el desarrollo de los órganos digestivos, ni la histología cuantitativa del íleon. Con la inclusión de los aditivos se observó una menor digestibilidad de la proteína bruta, menor retención de N y heces más blandas y húmedas. El pH del colon fue menor en los animales que recibieron CIT ( $P=0,02$ ). Los inóculos colónicos provenientes de los lechones alimentados con dietas que contuvieron aditivos tendieron a producir más gas que los que provinieron de los que recibieron CON ( $P=0,07$ ), mientras que los que recibieron INU fermentaron el sustrato más rápido que los demás tratamientos (mayor tasa máxima de producción de gas y menor tiempo para alcanzarla). La inclusión de los aditivos (inulina, alfalfa o pulpa de citrus) a los niveles utilizados no afectó los parámetros productivos, ni tuvo efectos benéficos sobre la excreción de N. A pesar de que no se observaron modificaciones en la microbiota del colon, la inclusión de los aditivos provocó modificaciones en la actividad fermentativa del intestino grueso de los animales.

Palabras clave: fibra, balance de nitrógeno, tracto gastrointestinal, microbiota, fermentación, suinos.

## 2. SUMMARY

The inclusion of inulin, fresh alfalfa and fresh citrus pulp in diets for piglets on growth performance, nutritional and faecal parameters, bacterial counts and fermentative activity in the colon and gastrointestinal tract (GIT) morphometry was evaluated. Twenty-four cross-breed piglets (initial BW:  $9.75 \pm 1.63$  kg; final BW:  $18.77 \pm 2.68$ ) in a randomized complete block design were housed in metabolic cages and assigned to one of 4 treatments: 100% corn and soybean meal control diet (CON), 97% CON+3% inulin (INU), 95.5% CON+4.5% fresh alfalfa (ALF) and 95.5% CON+4.5% fresh citrus pulp (CIT). The experiment consisted of a 12 d adaptation period followed by 11 d for samples collection. During the last 2 days of the experiment all animals were euthanized, the digestive tract of each animal was removed and individual samples of ileal and colonic digesta were collected. Measurements included feed intake, growth performance, digestibility of nutrients, N utilization, faecal characteristics, colonic bacterial counts, the fermentative activity of colonic microbiota using the *in vitro* gas production technique, the size in weight and length of GIT organs and quantitative histology of ileum. Data was analyzed by a mixed procedure (PROC MIXED) considering treatment effect and means were separated by orthogonal contrasts. Microbiology data was analyzed by a non-parametric procedure. Inclusion of additives had effect neither on growth performance (intake, daily gain of feed conversion), colonic bacterial counts, development of GIT organs, nor quantitative histology. Additive inclusion led to lower crude protein digestibility, lower N retention and softer and moister feces. Colonic pH was lower in animals fed CIT ( $P=0.02$ ). Colonic inocula from animals fed diets supplemented with additives tended to produce more gas than animals fed CON ( $P=0.07$ ), and those from INU group fermented the substrate faster than the other treatments (higher maximal rate of gas production and lower time to reach this rate). The inclusion of additives (inulin, alfalfa or citrus pulp) in the levels utilized did not affect growth performance parameters. No beneficial effects were detected on N excretion. Despite differences were not detected on colonic microbiota, the inclusion of additives modified the fermentative activity in the hindgut of animals.

Key-words: fiber, nitrogen balance, gastrointestinal tract, microbiota, fermentation, swine.

### 3. INTRODUCCIÓN

En los últimos años ha habido un desarrollo y un interés creciente por parte de la industria alimentaria humana y animal en la inclusión de alimentos, componentes alimenticios o aditivos que promuevan la fermentación intestinal saludable. La búsqueda de alternativas a la utilización de antibióticos como promotores del crecimiento para prevenir la aparición de cepas microbianas resistentes, junto con la prohibición en países europeos del uso de este tipo de aditivos en alimentación animal ha llevado a que actualmente exista intensa investigación en la materia. La utilización de componentes dietéticos específicos puede modificar positivamente la actividad de la microbiota intestinal. Dentro de estos componentes, los carbohidratos fermentables parecen ser los más promisorios en términos de promoción de la proliferación de especies bacterianas benéficas, de la producción de ácidos grasos volátiles (AGV), así como en la reducción de sustancias perjudiciales - ej.  $\text{NH}_3$ , aminas - (Bauer et al., 2006). Además, la producción de ácidos orgánicos modula la composición de la microbiota, el crecimiento de células epiteliales intestinales, y el crecimiento de la masa microbiana apoyado por la mayor fermentación induce un cambio en la excreción de N de la orina a las heces (Bindelle et al., 2008).

En contraposición, las propiedades físicas de los carbohidratos fibrosos (capacidad de repleción, capacidad de retención de agua, viscosidad o solubilidad) pueden generar efectos indeseables en relación a disminuciones en el consumo y digestibilidad de los alimentos o mayor excreción de heces (Bindelle et al., 2008). A pesar de que existen datos que ratifican el efecto benéfico de prebióticos y fibras fermentables sobre la salud del consumidor, en la bibliografía consultada en ocasiones los resultados son inconsistentes, proponiéndose que la investigación debe ser profundizada. Por otra parte, existen pocas publicaciones que hagan referencia a la utilización de pasturas de alta calidad y de subproductos fibrosos como moduladores de la fermentación intestinal en lechones de post-destete.

Uruguay posee condiciones óptimas para la producción de pasturas de alta calidad y además es productor de un interesante volumen de subproductos fibrosos (por ej. subproductos de la industria citrícola) que pueden ser utilizados en la dieta de animales de producción. Por lo anteriormente expuesto, es de interés conocer el potencial efecto benéfico sobre la actividad fermentativa y el ambiente intestinal de una pastura templada como la alfalfa, y un subproducto rico en carbohidratos fermentables como la pulpa de citrus, y compararlos con un prebiótico de propiedades conocidas como la inulina.



#### 4. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

El alto rendimiento que se logra en los modernos sistemas intensivos de producción porcina, lleva implícito la obtención de altas ganancias de peso, altas eficiencias de transformación alimenticia y un consumo estable y sostenido de alimentos. Para alcanzar este objetivo es necesario minimizar la incidencia de patologías infecciosas. Es por esta razón, que la utilización de antibióticos como aditivos en la alimentación animal ha sido hasta hace poco tiempo una práctica habitual en los sistemas de producción intensiva de casi todo el mundo. Mediante el uso sistemático de antibióticos como promotores de crecimiento en las dietas se logra impedir la proliferación de los agentes infecciosos más habituales, además de mejorar los índices de conversión e incrementar las ganancias de peso (Weber et al., 2001). No obstante, el uso prolongado de antibióticos puede ejercer un efecto de selección para la supervivencia de especies y cepas bacterianas resistentes (Bach Knudsen, 2001; Bywater et al., 2005), genes que codifiquen para esta resistencia (Montagne et al., 2003), así como favorecer la aparición de residuos químicos en los productos de origen animal para consumo humano (Barton, 2000). Esto ha llevado a que algunos países hayan emprendido acciones para regular o limitar el uso de antibióticos en alimentos para animales. En este sentido, la Unión Europea ya ha establecido la prohibición total para la utilización de antibióticos como promotores del crecimiento en la alimentación de rumiantes, cerdos y aves (Montagne et al., 2003; Hedemann et al., 2006).

Ante esta situación, la utilización de aditivos alternativos para evitar la aparición de cepas microbianas resistentes y para lograr mantener la inocuidad alimentaria ha sido objeto de intensa investigación en los últimos años. El uso de **probióticos** y **prebióticos** como aditivos alimentarios alternativos en dietas para animales de producción constituye una opción al uso de antibióticos, y puede ser una estrategia para disminuir la incidencia de enfermedades transmisibles por alimentos (Krehbiel et al., 2003; Callaway et al., 2003; Liu et al., 2008). Además de los aditivos antes mencionados, otros grupos de aditivos han sido estudiados como potenciales alternativas al uso de antibióticos entre los que se encuentran **carbohidratos fermentables**, enzimas, moduladores de la respuesta inmune (inmunoglobulinas), ácidos orgánicos o extractos herbales (Awati, 2005).

En los sistemas de producción de cerdos es común la aparición de patologías digestivas y respiratorias y las categorías más jóvenes son las más susceptibles (Pérez y Nofrarías, 2008), más aún cuando se practica destete precoz. Factores de manejo como destete, cambios abruptos en la alimentación, alojamiento con lechones provenientes de diferentes camadas y agentes infecciosos (*Escherichia coli*, *Salmonella* spp., Rotavirus, *Haemophilus parasuis*, *Pasteurella multocida*), provocan condiciones de estrés que afectan negativamente el funcionamiento del sistema inmune (Melin y Wallgren, 2002). La etapa posterior al destete, se caracteriza además por la interrupción de la transferencia de IgA protectora secretada en la leche materna (Butler et al., 1981) y por modificaciones en las poblaciones bacterianas intestinales (Katouli et al. 1999) debido a los cambios en la dieta y el medioambiente (Conway, 1994; Jensen, 1998). Todas estas condiciones llevan a que el control de inflamaciones intestinales tempranas sea de suma importancia en el manejo de afecciones digestivas post-destete en lechones.

#### 4.1. Probióticos

Los probióticos han sido definidos como una preparación o producto que contiene microorganismos específicos viables, en número suficiente para modificar la microbiota en un compartimiento del hospedero, produciendo efectos benéficos en la salud (Schrezenmeir y de Vrese, 2001). En el caso de los animales monogástricos, los probióticos deben sobrevivir a las enzimas gástricas e intestinales para alcanzar intactos el intestino grueso, lugar donde ejercerán su acción. El uso de probióticos ha sido estudiado durante los últimos años tanto para animales como para humanos (Cross, 2002). Los mecanismos de acción propuestos para los probióticos son varios, e incluyen la modulación de la población microbiana alterada, el mejoramiento de la barrera inmunológica intestinal, particularmente a través de la respuesta de IgA secretoria, y la disminución de las respuestas inflamatorias intestinales (Isolauri et al. 2001; Corthési et al. 2007). Se atribuyen propiedades probióticas a muchas especies microbianas, siendo comúnmente utilizadas cepas de *Lactobacillus spp.*, *Bifidobacterium spp.*, *Streptococcus spp.*, *Bacteroides spp.*, *Propionibacterium spp.* y *Enterococcus spp.* Es así que la suplementación de la dieta de perros con *Enterococcus faecium* produce un incremento en la función inmune y en las concentraciones plasmáticas y fecales de IgA (Benyacoub, et al. 2003). Casey et al. (2007) reportaron que el suministro de una mezcla conteniendo cepas de *Lactobacillus murinus*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus pentosus* y *Pediococcus pentosaceus* a lechones destetados produjo menor incidencia, severidad y duración de diarreas cuando fueron desafiados oralmente a una cepa de *Salmonella typhimurium*. Por su parte, Taras et al. (2006) observaron que la administración de una cepa de *E. faecium* a cerdas gestantes produjo una disminución en la mortalidad pre-destete, en la pérdida de lechones en los primeros 3 días de vida y en la incidencia de diarreas infecciosas en lechones. Además, existen datos que indican que la administración de *E. faecium* a cerdos puede producir una disminución en las infecciones por clamidias (Pollmann et al., 2005).

#### 4.2. Prebióticos

Los prebióticos pueden definirse como compuestos orgánicos no digeribles pero fermentables, que pueden ser utilizados por determinados grupos de la biota bacteriana provocando un efecto benéfico sobre el hospedero. Los prebióticos estimulan la actividad de bacterias benéficas presentes en el intestino grueso del animal, principalmente lactobacilos y bifidobacterias. Se intenta de esta forma, incrementar tanto la cantidad como el ritmo de generación de los productos finales de fermentación de estos microorganismos y promover la estabilidad y diversidad de la microbiota benéfica comensal en el tracto gastrointestinal (Gibson et al., 2004). Los prebióticos incluyen carbohidratos de cadena corta que no son digestibles por las enzimas digestivas del hospedero pero que pueden ser metabolizadas por microorganismos del colon produciendo ácidos orgánicos (Pié et al., 2007). Los prebióticos son fermentados por microorganismos benéficos, como *Lactobacillus spp.* y *Bifidobacterium spp.*, estimulando su crecimiento y de esta forma desplazando la población microbiana hacia este tipo de microorganismos por competición con otras especies patógenas (McDonald et al., 2006). Algunos prebióticos como los fructanos, han mostrado otras capacidades como la de disminuir los componentes de la materia fecal que producen olor, de reducir el colesterol sanguíneo, promover la síntesis de algunas vitaminas, incrementar la absorción de minerales, estimular el

sistema inmunitario e incluso de prevenir algunos tipos de cáncer (Jenkins et al., 1999).

De acuerdo con Roberfroid, (2007), algunos criterios deberían ser cumplidos para que un compuesto sea considerado un verdadero prebiótico. En primer lugar debe ser resistente a la acidez gástrica, a la hidrólisis por las enzimas digestivas y no debe ser absorbido a nivel intestinal. Además debe ser fermentable por la microbiota intestinal y deben estimular en forma selectiva el crecimiento y/o la actividad de la microbiota que contribuye a la salud del hospedero. Según este autor, considerando en forma estricta estos criterios, sólo dos compuestos poseen en el momento actividad prebiótica demostrada: la inulina y la oligofructosa. La inulina está compuesta por un mezcla de oligómeros y polímeros, con un grado de polimerización que varía desde 2 hasta 60 unidades, unidos por enlaces  $\beta(1-2)$ . Es un oligosacárido indigestible que como caracterización nutricional, forma parte de la fibra dietética (Gibson et al., 2004). Además de la inulina, existen otros oligosacáridos que poseen actividad promisorio como prebiótico como los galacto-oligosacáridos, la lactulosa, los isomalto-oligosacáridos y los xilo-oligosacáridos.

#### **4.3. Carbohidratos fermentables**

Existen también carbohidratos indigestibles, como los almidones resistentes, las hemicelulosas, las pectinas y las gomas, que si bien fermentan a nivel del intestino grueso no ingresan en la categoría de prebiótico según los criterios anteriores, principalmente por no poseer selectividad en el estímulo de grupos definidos de microorganismos benéficos (Gibson y Roberfroid, 1995). Sin embargo, éstos pueden ser considerados componentes alimenticios saludables para el colon, dado que estimulan la fermentación a este nivel, con efectos benéficos sobre el animal.

Estos carbohidratos forman parte de la fibra dietética, fracción que está compuesta por la suma de polisacáridos y lignina que escapan a la digestión enzimática del animal (Metzler y Mosenthin, 2008). La fibra dietética puede ser clasificada de acuerdo a su solubilidad en agua, a pesar de que su clasificación de acuerdo a su viscosidad, su capacidad de gelificar o su tasa de fermentación por parte de la microbiota intestinal puedan ser criterios fisiológicamente más relevantes (Weickert y Pfeiffer, 2008). La fracción soluble de la fibra dietética incluye a las pectinas, gomas, mucílago, inulina, fructo y manano-oligosacáridos (FOS y MOS), almidón resistente y hemicelulosas hidrosolubles, mientras que la fracción de fibra insoluble incluye hemicelulosas no hidrosolubles, celulosa y lignina (Escudero-Álvarez y González-Sánchez, 2006). A pesar de que la mayoría de la fibra dietética es fermentada en algún grado, las tasas de fermentación varían ampliamente. De esta forma, las fibras solubles, los almidones resistentes y oligosacáridos son más rápidamente fermentables que la fibra dietética insoluble, como celulosa y hemicelulosas (Vos et al., 2007).

#### **4.4. La importancia de estimular la fermentación en el intestino grueso**

Los productos finales de la fermentación, como ácido láctico y los ácidos grasos volátiles (AGV) - principalmente los ácidos acético, propiónico y butírico - provocan una disminución del pH intestinal, inhibiendo por este mecanismo el crecimiento de bacterias patógenas (McDonald et al., 2006; Seifert y Watzl, 2007). Por otra parte,

con el aumento de los AGV, se produce un aumento del butirato, el ácido graso que constituye la principal fuente energética para los colonocitos. Hay autores que proponen que este aumento es la base de los efectos positivos sobre el funcionamiento y la salud intestinal (Roberfroid, 2007). En este sentido, Loh et al. (2006) observaron un mayor recuento de bifidobacterias y una mayor proporción de ácido butírico en lechones que recibieron dietas suplementadas con inulina.

Según algunos autores, la adición de prebióticos y de fibra fermentable puede tener efectos directos sobre la morfología intestinal. Existe un efecto trófico del butirato sobre la mucosa del colon, y la hipertrofia de la mucosa se produce si la tasa de proliferación epitelial es mayor que la de pérdida celular (Pluske et al., 1998). Además, la adición de chito-oligosacáridos a la dieta de lechones produce un aumento en la altura de vellosidades y en la relación vellosidades/criptas en íleon y yeyuno (Liu et al., 2008). Similares resultados fueron reportados por Spencer et al. (1997) al suplementar dietas para lechones con fructanos. La relación vellosidades/criptas es un indicador útil para estimar la digestión de nutrientes y la capacidad de absorción del intestino delgado (Montagne et al., 2007) y la mayor capacidad de digestión y absorción ocurre cuando esta relación aumenta (Pluske et al., 1996).

Se ha reportado que dietas ricas en carbohidratos fermentescibles producen hipertrofia del intestino grueso de cerdos (Pond y Varel, 1989; Topping et al., 1997; Len et al., 2009). Se ha sugerido que cuando fibras que aumenten la viscosidad, el aumento en el trabajo necesario para propulsar la digesta a través del intestino grueso puede llevar a la hipertrofia de la musculatura lisa del intestino, aumentando entonces el peso del órgano (Wyatt et al., 1988). Además, estos autores han sugerido que las fibras viscosas pueden causar hipertrofia de las células de la mucosa a través de la supresión de absorción intestinal de agua debido al secuestro de agua por parte de los polisacáridos viscosos.

Adicionalmente a los cambios en la producción de ácidos grasos, otros autores reportan efectos benéficos de determinado tipo de fermentación a nivel de colon sobre el estatus inmunitario a nivel local. En este sentido, Swanson et al. (2002), trabajando con dietas para perros que incluían manano-oligosacáridos y fructo-oligosacáridos, observaron un aumento en el recuento de *Lactobacillus spp.* y en los niveles de IgA, conjuntamente con una mayor proporción de linfocitos dentro del total de células sanguíneas de la línea blanca. El mismo equipo de trabajo también comunicó un aumento en la concentración de bifidobacterias, lactobacilos y bacterias aerobias totales en materia fecal, y una tendencia al aumento en el número total de células sanguíneas de la línea blanca al suplementar dietas para perros con arabinogalactano (Grieshop et al., 2002). Además, la utilización de probióticos y prebióticos puede resultar una herramienta útil para modular la producción local de citoquinas inflamatorias que se producen durante las etapas productivas más susceptibles a las infecciones, como es el destete en el caso de los lechones (Pié et al., 2004). La suplementación de la dieta de lechones destetados con carbohidratos fermentescibles (inulina, lactulosa, pulpa de remolacha y almidón de trigo) produce una modulación en las respuestas de citoquinas pro-inflamatorias (Pié et al., 2007), indicando que la utilización de estos sustratos puede ser eficaz para el tratamiento de inflamación intestinal durante el post-destete.

Como beneficio adicional, algunos prebióticos parecen tener efectos directos inhibiendo la proliferación de microorganismos patógenos. Los galactooligosacáridos, la inulina y la lactulosa, han demostrado ser efectivos para disminuir la capacidad de adherencia de microorganismos patógenos como *E. coli* (Shoaf et al., 2006). Con el agregado de prebióticos en la dieta se produce una alteración de la función fermentadora del ecosistema gastrointestinal, mediante interacciones entre los microorganismos, el hospedero y metabolitos bacterianos (Propst et al., 2003; Van Loo, 2004). Se considera que los metabolitos microbianos serían los principales responsables (o efectores) de las acciones benéficas de los prebióticos (Van Loo, 2004).

Por otra parte, la inclusión de ingredientes fibrosos fermentables en la dieta de cerdos estimula la síntesis de proteína microbiana en el intestino grueso, y consecuentemente se reduce la emisión de amoníaco al medio (Outor-Monteiro et al., 2010). Los carbohidratos fermentables producen un cambio en la eliminación de N desde la orina a la heces (Schulze et al., 1995; Cahn et al., 1997), dado que aumenta la captación de NH<sub>3</sub> por las bacterias del intestino grueso (Mosenthin et al., 1992), el N es retenido por el aumento en la síntesis de proteína microbiana y como consecuencia la transferencia de N a la sangre y finalmente excretada en orina disminuye (Bindelle et al., 2008).

#### **4.5. Efectos indeseables de la inclusión de prebióticos y carbohidratos fermentables en la dieta**

La inclusión de prebióticos o de carbohidratos fermentables en la dieta también puede ocasionar efectos indeseados. En primer lugar, debe considerarse que, con este tipo de compuesto se está incluyendo un componente que, en general es fibroso y no digestible. Por esta razón, y siempre dependiendo de la dosis, el consumo y la digestibilidad de los nutrientes pueden verse afectados. En este sentido, es conocido que el aumento en los niveles de fibra de la dieta se asocia con una reducción en el contenidos de energía del alimento (Noblet et al., 2001). Además, el consumo puede disminuir debido a la sensación de saciedad que se genera por la capacidad de repleción de la fibra dietética (Kyriazakis & Emmans, 1995). Bindelle et al. (2009) observaron una disminución lineal en el consumo de MS en dietas de cerdos en crecimiento con la inclusión de la dieta de niveles crecientes (0, 10, 20, 30%) de pulpa de remolacha. Como consecuencia a la depresión en el consumo de alimentos durante el post-destete de lechones, Hedemann et al. (2006) observaron, contrariamente a lo que cabría esperar, una menor altura de vellosidades y profundidad de las criptas en intestino de lechones que consumieron dietas conteniendo pectinas, lo que estaría explicado por el menor consumo de alimento que presentaron los animales. No obstante, otros autores plantean que esta reducción en la concentración energética también puede ser un estímulo para aumentar el consumo de alimento del animal de forma de mantener constante su consumo de energía (Lee et al., 2002).

De todas formas, diferentes fuentes de fibra pueden incluirse en bajos niveles a la dieta de lechones sin alterar el consumo de alimentos y la ganancia de peso. Es así que estas variables no fueron afectadas con la inclusión de 7,5% de pulpa de citrus (Weber et al., 2008), 4% de pulpa de remolacha (Bikker et al., 2006) o 3% de inulina (Loh et al., 2006) en la dieta. Estos resultados indican que la inclusión de alimentos

ricos en fibra en niveles de hasta un 10% en la dieta de lechones pueden no afectar el consumo y el rendimiento productivo de los animales (Weber et al., 2008).

Debido a sus características químicas, la fibra de la dieta puede tener diferentes efectos sobre la absorción de nutrientes. Las fibras solubles se relacionan con un aumento en la viscosidad luminal (Rodríguez-Palenzuela et al., 1998) y en la capacidad de retención de agua de la digesta (Canibe y Bach Knudsen, 2001). Owusu-Asiedu et al. (2006) reportaron una menor digestibilidad aparente de la energía y de la proteína bruta junto con un aumento de la viscosidad de la digesta y una disminución en la tasa de pasaje gastrointestinal al suplementar cerdos con goma guar y celulosa. Este aumento en la viscosidad de la digesta se ha relacionado también con disminuciones en la absorción de la glucosa a nivel intestinal (Serena et al., 2009). Adicionalmente, el aumento de la viscosidad del contenido digestivo puede tener como efecto el enlentecimiento del tránsito, llevando a disminuciones en el consumo de alimentos (Rodríguez-Palenzuela et al., 1998). Otros autores han reportado disminuciones en la digestibilidad aparente de la PB con la inclusión de harinas de forrajes (alfalfa, trébol blanco y rojo y ryegrass) en la dieta de cachorros, lo que es atribuido a un aumento en la tasa de pasaje a través del TGI, un aumento en la excreción de nutrientes a la fracción fibrosa de la digesta y a mayores pérdidas de N asociado al aumento de la masa microbiana que es excretada por heces (Anderson y Lindberg, 1997 a,b)

#### **4.6. Los subproductos y las pasturas de buena calidad como potenciales prebióticos**

Los prebióticos son productos que tienen un valor comercial creciente como aditivos alimenticios. Es así que algunos de ellos, producidos por extracción o síntesis, se encuentran disponibles en el mercado para ser adicionados a alimentos humanos o animales. Sin embargo, es de hacer notar que algunos alimentos naturales como las pasturas, o subproductos de la industrialización de alimentos como las pulpas, pueden ser efectivos como promotores de la fermentación en intestino grueso. En este sentido, las dietas para cerdos podrían verse beneficiadas con la incorporación de cantidades moderadas de este tipo de insumo.

La pulpa de citrus resulta del procesado de los cítricos para la obtención de jugos y sus concentrados. Está compuesta por cáscara, pulpa, semilla y descarte de frutas, y posee un elevado contenido en pectinas (entre un 23 y 45%) y azúcares (Bampidis y Robinson, 2006; Weber et al., 2008). Las pectinas forman parte de la fracción soluble de la fibra dietética y son rápidamente fermentadas por la microbiota de los monogástricos. Sunvold et al. (1995) observaron una mayor producción de AGV y una mayor desaparición de materia orgánica al realizar estudios de fermentación *in vitro* utilizando como inóculo materia fecal de perros consumiendo una dieta suplementada con pulpa de citrus, en comparación con una dieta conteniendo celulosa. Recientemente, Cerisuelo et al. (2010) reportaron que el recuento de enterobacterias en heces de cerdos que recibieron dietas conteniendo 5 o 10% de pulpa de citrus ensilada fue menor que en una dieta control, indicando que un aumento en los productos de fermentación (ej. lactato, AGV) en intestino grueso puede inhibir patógenos intestinales. Resultados preliminares de nuestro equipo de trabajo, indican que la inclusión de fuentes de carbohidratos fermentescibles a través del uso de pulpa de citrus en dietas para perros disminuyó el pH fecal (Brambillasca

et al., 2007) - lo que se relacionaría con un aumento de la producción de ácidos orgánicos en el intestino grueso -, aunque como efecto no deseado, aumentaron simultáneamente la frecuencia de defecación y la cantidad de materia fecal excretada (Britos et al., 2007). Resultados similares se observaron en estos trabajos utilizando pomaza de manzana, subproducto derivado de la obtención de jugo y sidra, alta en pectinas y otros polisacáridos fermentables. Es interesante señalar, que estos subproductos presentaron perfiles de fermentación similares a la inulina al ser evaluados mediante la técnica de producción de gas *in vitro* utilizando como inóculo heces de perros (Brambillasca et al., 2011).

Estos datos sugieren que las fuentes de carbohidratos fermentescibles en intestino como la pulpa de citrus, promueven una mayor actividad fermentativa, ya sea por incremento en el número de bacterias, por incremento en la actividad enzimática bacteriana, por alteración de las poblaciones bacterianas o a la combinación de todos estos factores. No está suficientemente estudiado aún a qué dosis se manifestarían los efectos positivos sin provocar efectos indeseables. Watanabe et al (2010) adicionando niveles crecientes de pulpa de citrus en dietas para cerdos en terminación, observaron una respuesta cuadrática al incremento de pulpa en la dieta en la ganancia diaria y en los días necesarios para llegar a 130 kg. Para esta categoría, niveles de 10 a 11 % de inclusión fueron los que resultaron en mejores desempeños.

Se ha reportado que las paredes celulares de las pasturas utilizadas en Uruguay son muy degradables (Cajarville et al., 2006) y que la concentración de carbohidratos solubles aumenta en el transcurso del día (Repetto et al., 2006; Antúnez et al., 2007) como producto de la actividad fotosintética de la planta. Los forrajes son utilizados como complemento de la dieta en cerdos y existen evidencias que indican condiciones favorables para su utilización en todas las categorías (Barlocco et al., 1999; Bauza et al., 2006), aunque la inclusión de forrajes de alta calidad como aditivos de raciones para cerdos no ha sido suficientemente estudiada aún.

Las pasturas templadas poseen una variedad de carbohidratos que pueden ser considerados prebióticos, como fructanos - carbohidratos solubles de reserva en gramíneas - hemicelulosas y pectinas - carbohidratos de las paredes celulares - (Rodríguez-Palenzuela et al., 1998). Con respecto a la alfalfa (pastura que fue utilizada en esta tesis), es un alimento rico en fibra insoluble (celulosa) pero además, tiene en su composición fructanos y hasta un 13% de pectinas (Jung y Lamb, 2004). Este forraje es ampliamente fermentado en el intestino grueso de los cerdos y los AGV producto de su fermentación pueden proveer hasta un 14% de los requerimientos energéticos diarios para mantenimiento (Kass et al., 1980).

Cabe considerar el hecho de que con el avance de la madurez de la planta se incrementan los polisacáridos que forman parte de la pared celular y que son de baja fermentación, como la celulosa, a la vez que lo hacen las uniones de ésta con la lignina, formando compuestos no digestibles y no fermentables (Van Soest, 1994). Sin duda esta será la limitante más importante para el uso de este tipo de insumos en dietas para cerdos. Andersson y Lindberg (1997 a,b) han reportado que la inclusión de harinas de alfalfa, trébol blanco, trébol rojo y ryegrass perenne en niveles del 10 y 20% de una dieta control produce en cerdos en crecimiento una disminución de la digestibilidad de la materia orgánica, la proteína bruta y de la energía de las dietas.

No obstante, los mismos autores concluyen que la mayor depresión en la utilización de los nutrientes se produce en los segmentos anteriores del intestino, manteniendo el intestino grueso una interesante capacidad fermentativa.

A modo de conclusión, algunos productos naturales y subproductos agroindustriales pueden ser potencialmente utilizados como fuentes de fibra fermentable en dietas para cerdos, especialmente en los lechones. Sin embargo, es necesario considerar que niveles excesivos de fibra en la dieta pueden tener efectos negativos sobre el consumo de alimentos y sobre la digestión de los nutrientes, aunque esta sea fermentable. Por esta razón, la utilización de este tipo de ingrediente en dietas prácticas dependerá de la generación de más información, fundamentalmente en lo que respecta a los niveles de inclusión mínimos y máximos para las diferentes categorías.



## 5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La dieta de los cerdos en Uruguay está integrada por diversos alimentos, entre los que se incluyen alimentos balanceados, granos, forrajes y subproductos de industrias molineras, lácteas, frigoríficas y de alimentación humana. Si bien los alimentos balanceados son los más utilizados en las explotaciones porcinas, los forrajes son parte importante de la dieta, destinándose en el país unas 11 mil hectáreas para alimentación de cerdos (DIEA Encuesta Porcina 2006, 2007).

En el país existe información sobre la utilización de pasturas como base alimenticia en diversas categorías como cerdas (Barlocco et al., 2005), cachorros en terminación (Battezzore y Barlocco, 2003; Bauzá et al., 2005) y lechones (Barlocco et al., 2005); no obstante estos trabajos están orientados a sistemas de producción extensivos a campo. Pese a que la bibliografía en relación a la utilización de alimentos fibrosos y prebióticos en la alimentación de cerdos es extensa, los trabajos en los que se utilicen alfalfa o pulpa de citrus como aditivos que estimulen la fermentación y mejoren el ambiente intestinal son escasos. Como fue previamente mencionado, pasturas templadas como la alfalfa poseen en su composición carbohidratos que pueden ser ampliamente fermentados por la microbiota intestinal de los cerdos y que potencialmente pueden estimular la actividad fermentativa en el intestino grueso (Rodríguez-Palenzuela et al., 1998). Además, antecedentes de nuestro equipo de trabajo indican que subproductos como la pulpa de citrus se relacionan con un aumento en la actividad fermentativa del intestino de perros y presentan cinéticas de fermentación *in vitro* similares a la inulina (Brambillasca et al., 2007; Brambillasca et al., 2011).

Existen algunas interrogantes que surgen de la investigación disponible y que es necesario responder:

Utilizando bajos niveles de inclusión de alfalfa y pulpa de citrus frescas en la dieta de lechones, ¿es posible estimular la actividad fermentativa y modificar poblaciones bacterianas intestinales?

¿Es posible que estos alimentos fibrosos produzcan modificaciones en las vías de eliminación del N de la dieta, disminuyendo la cantidad de N eliminado por orina?

La inclusión de estos alimentos fibrosos, ¿se relacionará con modificaciones en el tamaño y estructura de los órganos gastrointestinales?

¿Es posible que estos alimentos generen modificaciones deseables (incrementos en la fermentación, disminuciones en la excreción nitrogenada), sin provocar disminuciones en el aprovechamiento digestivo de los nutrientes y en parámetros productivos?

En este trabajo de tesis se pretende dar otra utilización a este tipo de alimentos fibrosos y estudiar la inclusión de una pastura (alfalfa), de un subproducto agroindustrial fibroso (pulpa de citrus) y de un prebiótico (inulina) al ser incluidos como aditivos alimentarios estimulantes de la fermentación intestinal, en dietas basadas en alimentos balanceados para lechones.

## 6. HIPÓTESIS

La inclusión de niveles bajos de alfalfa y pulpa de citrus frescas en dietas para lechones:

- estimulará el crecimiento de especies bacterianas benéficas, disminuyendo las potencialmente patógenas, aumentará la fermentación intestinal y disminuirá el pH intestinal,
- provocará una disminución en la eliminación urinaria de N,
- estimulará el crecimiento de los órganos gastrointestinales y se relacionará con un mayor espesor del epitelio del intestino delgado,
- no deprimirá el consumo de las dietas, el aprovechamiento digestivo de las mismas, y por tanto no afectará los parámetros productivos,

de la misma forma que un prebiótico conocido como la inulina

## 7. OBJETIVOS

### 7.1. Objetivo general:

Evaluar el efecto de la inclusión de dos alimentos fibrosos (alfalfa y pulpa de citrus frescas) en dietas de lechones sobre parámetros productivos, nutricionales, microbiológicos y fermentativos del colon, y sobre la morfometría del tracto gastrointestinal.

### 7.2. Objetivos específicos:

Estudiar el efecto de la inclusión de alfalfa y pulpa de citrus frescas en dietas para lechones sobre:

- a) el aprovechamiento digestivo de los nutrientes y parámetros productivos.
- b) la retención y vías de eliminación del N de la dieta.
- c) las poblaciones bacterianas y la actividad fermentativa del colon.
- d) parámetros morfométricos e histológicos del tracto gastrointestinal.

## 8. MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se desarrolló en el Campo Experimental N°2 de Libertad (San José) y en los laboratorios de los Departamentos de Nutrición Animal y de Morfología y Desarrollo (FVet-Udelar) y en el Departamento de Microbiología del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE). Todos los procedimientos de experimentación fueron aprobados por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA).

Se utilizaron 24 lechones machos, castrados, de raza híbrida (Landrace x Large White) de 45 días de edad (PV inicial:  $12,08 \pm 1,69$  kg; PV final:  $18,77 \pm 2,68$ ) y alojados individualmente en jaulas metabólicas (0,90 x 1,20 m). El experimento consistió en un diseño de bloques completos al azar. Los animales fueron bloqueados por PV y asignados de manera aleatoria a uno de 4 tratamientos:

- 1) **CON:** dieta control libre de antibióticos basada en maíz y harina de soja;
- 2) **INU:** CON (97% de la MS total de la dieta) + inulina (3% de la MS total);
- 3) **ALF:** CON (95,5% de la MS total de la dieta) + alfalfa fresca (4,5% de la MS total);
- 4) **CIT:** CON (95,5% de la MS total de la dieta) + pulpa de citrus fresca (4,5% de la MS total).

En el Cuadro I se presentan los ingredientes y la composición química de las dietas experimentales. La dieta CON fue formulada siguiendo las recomendaciones nutricionales propuestas por FEDNA (2006). La alfalfa y la pulpa de citrus se utilizaron picadas (<5 mm) y frescas. Los aditivos se mezclaban con el alimento base y se mantenían refrigerados a 4°C hasta ser suministrados a los animales. En la Figura I se presenta un esquema del período experimental, que consistió en un período de adaptación de 12 días de los animales a las dietas, seguido de un período de recolección de muestras de 11 días. Los animales tuvieron libre acceso a las dietas y a agua fresca durante todo el experimento. El agua se suministró a través de bebederos automáticos instalados en cada jaula metabólica.

El peso vivo de los animales se registró el primer y último día del período de adaptación (días 1 y 12) y los dos últimos días del período de mediciones (día 22 y 23). El consumo de alimento se cuantificó los primeros 7 días del período de muestreo, mientras que las heces y la orina evacuadas desde el día 13 al 16 fueron recolectadas. Las heces de cada animal fueron pesadas cada 12 h y una muestra de 300 g se almacenó a -20°C para análisis posteriores. El volumen de orina diario se recolectó en recipientes conteniendo 25 mL de HCl 6N para evitar la volatilización del N urinario. En los días 14 y 15 del período experimental se midió la consistencia y el pH fecal de las heces de cada individuo. Los últimos dos días del período experimental (días 22 y 23) luego de 3 h de ayuno todos los animales fueron desensibilizados por trauma craneal y sacrificados por sangrado. El orden de los sacrificios se realizó respetando el esquema de bloques y tratamientos, y cada uno de los muestreos individuales se hizo inmediatamente al sacrificio de cada animal. El tracto gastrointestinal (TGI) de cada animal fue removido y los diferentes segmentos del TGI (estómago, duodeno, yeyuno, íleon, ciego y colon) fueron identificados. Los distintos segmentos se ligaron para evitar la mezcla de contenidos y se tomaron muestras de la digesta del íleon y colon. El contenido del colon se utilizó para evaluar la actividad fermentativa de la microbiota y para recuento bacteriano en

placa. Posteriormente todos los segmentos gastrointestinales fueron vaciados de su contenido y medidos en peso y longitud. Se realizaron cortes perpendiculares de 5 cm de longitud del íleon para la microscopía cuantitativa del órgano.

Actividad	Adaptación (d)												Mediciones (d)											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	
Pesaje	■											■											■	■
Consumo													■	■	■	■	■	■						
Heces y orina													■	■	■	■								
Consistencia y pH fecal													■	■										
Eutanasia*																							■	■

\*Se realizaron mediciones y toma de muestras para morfometría del TGI, y digesta para medición de pH (íleon y colon), prueba de fermentación in vitro (colon) y microbiología (colon).

**Figura 1. Esquema del período experimental**

**Cuadro I. Ingredientes y composición química de las dietas experimentales, alfalfa y pulpa de cítricos frescas utilizadas.**

	CON	INU	ALF	CIT	Alfalfa	Pulpa de cítricos
<i>Ingrediente (%)</i>						
Maíz	52,1	50,6	49,8	49,8		
Harina de soja	40,1	38,9	38,3	38,3		
Oleína	2,5	2,4	2,4	2,4		
Fosfato dicálcico	1,5	1,5	1,4	1,4		
Carbonato de calcio	1,2	1,17	1,2	1,2		
Sal	2	1,94	1,92	1,92		
Núcleo vitamínico–mineral <sup>(1)</sup>	0,3	0,29	0,29	0,29		
L-Lisina	0,25	0,24	0,24	0,24		
DL-Metionina	0,1	0,1	0,1	0,1		
Inulina	-	3	-	-		
Alfalfa	-	-	4,5	-		
Pulpa de cítricos	-	-	-	4,5		
<i>Composición química (% en base seca)</i>						
Materia seca, MS	89,17	89,17	77,50	74,17	24,22	16,24
Cenizas	8,41	7,14	7,62	7,17	8,70	3,50
Materia orgánica, MO	91,59	92,86	92,38	92,83	91,30	96,5
Proteína bruta, PB	22,23	19,23	19,11	18,35	21,49	6,64
Fibra detergente neutra, FDN	12,53	13,59	15,66	14,51	29,63	15,99
Fibra detergente ácida, FAD	3,77	4,13	5,44	4,91	15,03	10,58
Hemicelulosas, Hemic	8,77	9,46	10,22	9,6	14,60	5,41
Extracto etéreo, EE	6,34	7,27	6,98	7,18	-	-
Energía metabolizable, kcal/kg <sup>(2)</sup>	3623,4	3636,8	3558,1	3624,9	-	-
CRA <sup>(3)</sup> , g agua/g alimento seco	0,99	1,29	1,15	1,54	-	-

<sup>(1)</sup> Composición por kg de producto: Vit. A, 3.000.000 IU; Vit. D3, 400.000 IU; Vit. E, 4 IU; Vit. B1, 400 mg; Vit. B2, 700 mg; ácido pantoténico, 3g; Vit. B6, 600 mg; Vit. B12, 6 mg; ácido nicotínico, 3 g; Vit. K3, 0,2 g; biotina, 20 mg; colina, 36,8 g; antioxidante, 24 g; Mg, 50 g; Cu, 3,7 g; Co, 0,15 g; Zn, 36,8 g; Mn, 3,7 g; Fe, 15 g; Se, 20 mg; I, 200 mg. <sup>(2)</sup> Calculado de acuerdo a Rostagno et al. (2005). <sup>(3)</sup> CRA: capacidad de retención de agua, por método de filtración según Kyriazakis y Emmans (1995).

## 8.1. MEDICIONES Y CÁLCULOS

### 8.1.1. Consumo, parámetros productivos y digestibilidad

Los animales fueron alimentados *ad libitum*. El consumo de las dietas fue medido diariamente en cada animal durante los primeros 7 días del período de colecta de muestras. El consumo de alimento fue calculado como la diferencia entre el peso de alimento ofrecido y rechazado. Los animales fueron pesados el día 1, 12 y 22–23 del experimento para determinar la ganancia diaria de peso. La eficiencia de conversión alimenticia se determinó como la relación entre el aumento diario de peso vivo (g) y el alimento consumido diariamente (g). Las heces se recolectaron y pesaron individualmente durante 4 días (del día 12 al 16) y se almacenaron alícuotas diarias del 10% a -20°C hasta su análisis químico. Se preparó una muestra compuesta de heces por individuo mezclando las heces excretadas en forma proporcional a la cantidad total excretada diariamente. En muestras de heces y dietas experimentales se determinó el contenido de materia seca (MS), cenizas, proteína bruta (PB), fibra detergente neutro (FDN), fibra detergente ácido (FDA) y extracto etéreo (EE). El contenido de materia orgánica (MO) se calculó como la diferencia entre el contenido de MS y el de cenizas, mientras que el contenido en hemicelulosas (Hemic) se calculó como la diferencia entre la FDN y la FDA. El coeficiente de digestibilidad para cada fracción fue calculado como:

$$[\text{nutriente ingerido (g)} - \text{nutriente eliminado (g)}] / \text{nutriente ingerido (g)}.$$

### 8.1.2. Balance de nitrógeno

La orina se recolectó y midió individualmente durante 4 días (del día 12 al 16) en recipientes de vidrio conteniendo 25 mL de una solución de HCl 6N para evitar fermentación y pérdidas de compuestos nitrogenados. Una alícuota de 25 mL de orina de cada animal fue almacenada a -20°C. Posteriormente se preparó una muestra de orina individual que fue utilizada para medir el contenido de N por el método de Kjeldahl. La cantidad de N retenido por cada animal se determinó como:

$$[\text{N ingerido (g)} - (\text{N eliminado en orina (g)} + \text{N eliminado en heces (g)})].$$

La utilización del N se calculó como:

$$[\text{N retenido (g)} / \text{N ingerido (g)}] \times 100.$$

### 8.1.3. Parámetros fecales

Los días 14 y 16 se tomaron muestras de heces para determinar la consistencia y el pH fecal. La consistencia fecal se evaluó en heces recientemente defecadas utilizando una escala descrita por Freitas et al. (2006) de 1 (heces firmes) a 4 (heces líquidas). El pH fecal se midió inmediatamente luego de la defecación con un pH metro digital (eChem Instruments Pte. Ltd., Oakton, Singapur) diluyendo 1 g de heces en 10 mL de agua destilada. Los días de sacrificio de los animales se midieron además el pH de la digesta del íleon y del colon del mismo modo que se realizó para las heces.

#### 8.1.4. Actividad fermentativa de la microbiota del colon

Inmediatamente luego del sacrificio, se utilizó parte de la digesta del colon de los lechones para estimar la actividad fermentativa de la microbiota colónica mediante la medición de la producción de gas *in vitro*, según el procedimiento descrito por Mauricio et al. (1999). Se utilizó digesta colónica de cada animal como inóculo y el alimento control (CON) pre-digerido como sustrato. La pre-digestión de CON se realizó para simular la digestión en el estomago e intestino delgado mediante el procedimiento descrito por Cone et al. (2005). Para este procedimiento, muestras de 60 g de MS fueron incubadas durante 1,5 h en 1500 mL de una solución conteniendo HCl 0,1M con 5 g/L de pepsina (Merck, Darmstadt, Alemania). Luego el pH se neutralizó con 300 mL de NaHCO<sub>3</sub> 0,5 M, y fue seguido por una incubación con 1500 mL de buffer fosfato 0,165 M conteniendo 2 g/L de pancreatina (P-7545, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EEUU) y 2 mL de alfa-amilasa termoestable. Luego de la incubación, el residuo se filtró con un filtro de nylon con poros de 40 µm, y se secó en estufa a 60°C previo a la incubación. La composición química (% en base seca) analizada de CON pre-digerido fue la siguiente: MS: 92,60; Cenizas: 2,55; PB: 7,80; FDN: 20,26; FAD: 8,78; EE: 3,60.

Se evaluó la actividad fermentativa de la microbiota del colon mediante el procedimiento de producción de gas *in vitro*. Para ello, 0,5 g del sustrato pre-digerido fue pesado en frascos de 125 mL y a cada frasco se agregaron 0,5 mL de una solución de vitaminas y buffer fosfato, 0,5 mL de una solución reductora y 38 mL de una solución basal. La composición de las soluciones fue la descrita por Williams et al. (2005). Luego del agregado de las soluciones se hizo circular una corriente de CO<sub>2</sub> dentro de los frascos, se cerraron con tapones de goma butilo y se almacenaron a 4°C por 8 h antes de la inoculación para hidratar el sustrato. Posteriormente los frascos fueron atemperados en baño maría a 39°C durante 2 h antes de ser inoculados. Para la inoculación se utilizó digesta colónica fresca de cada lechón obtenida inmediatamente después del sacrificio. La digesta fue pesada y diluida con una solución salina estéril (9 g de NaCl/L) precalentada a 39° C en una relación peso:volumen de 1:5. El material diluido fue homogeneizado en un mezclador y filtrado a través de 4 capas de paño de quesería. El fluido obtenido fue continuamente gaseado con CO<sub>2</sub> y agitado, y 10 mL del inóculo fue dispensado dentro de cada frasco. Un total de 6 frascos por animal fueron inoculados (3 replicas conteniendo CON pre-digerido + 3 blancos conteniendo únicamente inóculo y medio; en total se incubaron 144 frascos en una única tanda de incubación). Posteriormente, los tapones de goma butilo fueron asegurados con precintos de aluminio y los frascos fueron depositados en baño maría por 92 h. La producción de gas se midió con un transductor conectado a un manómetro (840065, Sper Scientific, Scottsdale, AZ, USA) a las 2, 4, 6, 8, 10, 12, 18, 24, 48, 72 y 92 h posteriores a la inoculación.

Luego de la incubación la desaparición de la materia orgánica (DMO) de cada frasco se determinó depositando los residuos de fermentación en crisoles que fueron secados a 105°C, y posteriormente se incineraron en mufla a 550°C durante 4 h. La DMO *in vitro* se calculó como:

$$1 - [(MO \text{ residual} - MO \text{ blancos}) / MO \text{ inicial}] \times 100,$$

donde la MO residual es la MO recuperada luego de 92 h de fermentación, la MO blancos es la MO recuperada en los blancos correspondientes y la MO inicial son los g de MO del sustrato original incubado en cada frasco (Sunvold et al., 1995).

El volumen de gas fue calculado a partir de la presión medida (psi, libras por pulgada cuadrada) utilizando una ecuación obtenida en un experimento previo como:

$$\text{volumen de gas (mL)} = 3,9484 \times \text{Psi} + 0,2084 \times \text{Psi}^2 \quad (R^2 = 0,978).$$

Los volúmenes de gas obtenidos durante la fermentación fueron referidos a la MO incubada. El perfil de gas fue ajustado al modelo descrito por Groot et al. (1996):

$$G = A/[1 + (C/t)^B]$$

donde G: gas total producido (mL/g), A: producción de gas asintótica (mL/g), B: característica de conmutación de la curva, C: tiempo en el que se alcanza la mitad de la asíntota ( $T_{1/2}$ ) y t: tiempo (h). La tasa máxima de fermentación ( $R_{\max}$ ) y el tiempo en el que se produce ( $T_{\max}$ ) se calcularon de acuerdo a Bauer et al. (2001):

$$\{R_{\max} = [(A \times C^B) \times B \times (T_{\max}^{-(B-1)}) / (1 + (C^B \times T_{\max}^{(-B)})]^2\}$$

$$\{T_{\max} = C \times [(B - 1)/(B + 1)^{(1/B)}]\}$$

### 8.1.5. Microbiología intestinal

Una muestra de la digesta del colon de cada animal fue procesada en un homogeneizador (Stomacher Seward, UK) inmediatamente luego de ser colectada. Se mezcló 1 g de digesta con 10 mL de solución tampón salina fosfatada (PBS) conteniendo 0,5 g/L de cisteína. Se realizaron diluciones seriadas ( $10^{-2}$  a  $10^{-9}$ ) para enumeración de unidades formadoras de colonias (UFC) en placas de dos medios de cultivos selectivos y uno no selectivo. Los medios selectivos utilizados fueron agar MacConkey (Merck, Darmstadt, Alemania) para la enumeración de bacterias Gram negativas fermentadoras de lactosa (coliformes) y agar de Mann, Rogosa y Sharpe (MRS; Merck, Darmstadt, Alemania) para cultivo de bacterias ácido lácticas. Se utilizó el medio no selectivo agar soja tripticasa (TSA; Difco, Inc., Detroit, EEUU) para el aislamiento de bacterias aerobias mesófilas. Las placas fueron incubadas a 37°C durante 48 h. Cada dilución se realizó por triplicado y los recuentos de colonias se expresaron como log<sub>10</sub> de UFC por gramo de heces. El medio MRS se cultivó en condiciones de microaerofilia, mientras que los cultivos en MacConkey y TSA se cultivaron en forma aerobia.

### 8.1.6. Morfometría del TGI

Inmediatamente después del sacrificio, el tracto gastrointestinal de cada animal se ligó en el esófago y el recto y fue removido. Se identificaron los diferentes segmentos del TGI (estómago, duodeno, yeyuno, íleon, ciego y colon), fueron ligados para evitar la mezcla de contenidos y se tomaron muestras de la digesta del íleon (para medición de pH) y colon (para medición de pH e inóculo para producción de gas *in vitro*). Posteriormente todos los segmentos del TGI fueron vaciados de su contenido y medidos en peso y longitud. Se realizaron cortes perpendiculares de 5 cm de longitud del íleon para microscopía cuantitativa. Las muestras del tejido fueron fijadas por inmersión en paraformaldehído bufferado al 4% (pH 7,4) y posteriormente procesadas según procedimientos descritos por Hedemann et al.

(2006). Se capturaron imágenes de los preparados (Laboratorio de Análisis de Imágenes, Depto. de Morfología y Desarrollo, FVet) utilizando microscopio óptico Olympus BX50 (Olympus, Tokio, Japón), video cámara digital (SSCC158P; Sony, Tokio, Japón), y se utilizó el programa Image Pro Plus (Media Cybernetics, MA, EEUU) para la captura y análisis de imágenes. Las imágenes obtenidas fueron utilizadas para medir la altura de vellosidades, espesor del epitelio, profundidad de criptas y la relación vellosidades/criptas. Se tomaron 30 mediciones por individuo y región en lugares donde se identificaron cortes perpendiculares de las estructuras antedichas.

### 8.1.7. Análisis químicos

Las muestras de dietas y heces fueron secadas a 60°C durante 48 h para determinar el contenido en MS y molidas a tamaño de 1 mm. Posteriormente las muestras fueron analizadas para cenizas, PB, FDN, FDA, Hemic y EE. El contenido de cenizas y de PB se determinaron de acuerdo a métodos indicados por AOAC (1990) (942.05, 984.13 respectivamente). La MO se calculó por diferencia (MO = 100 – cenizas). Los contenidos de FDN y FDA se determinaron secuencialmente mediante la técnica descrita por Goering y Van Soest (1970), modificada por Robertson y Van Soest (1981), utilizando un analizador de fibra ANKOM<sub>220</sub> (Ankom Technology Corp., Fairport, NY, EEUU). La fracción de FDN fue analizada con amilasa termoestable; las fracciones FDN y FDA son reportadas incluyendo cenizas. El contenido de hemicelulosas se calculó por diferencia (Hemic = FDN – FDA). El contenido de EE se determinó extrayendo la grasa de las muestras con éter petróleo durante 4 h en un extractor de grasa Goldfish (Labconco Corp., Kansas City, MO, EEUU). Todas las muestras fueron analizadas por triplicado, aceptando coeficientes de variación entre análisis del 3 al 5% según el parámetro.

### 8.1.8. Análisis estadístico

Los datos de rendimiento productivo, características de heces, digestibilidad aparente, balance de N, producción de gas *in vitro* y morfometría del TGI fueron comparados entre tratamientos utilizando el procedimiento PROC MIXED de SAS<sup>®</sup> (SAS Institute, Cary, EEUU, 2000) a través del modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + B_j + e_{ijk},$$

donde  $Y_{ijk}$  es el efecto fijo de  $i$  tratamiento (CON, INU, ALF, CIT), en cada  $k$  réplica animal ( $k=6$  lechones),  $\mu$  es la media general del parámetro,  $T_i$  es el efecto fijo del tratamiento ( $n=4$ ),  $B_j$  es el efecto aleatorio del bloque ( $n=6$ ) y  $e_{ijk}$  el error residual. Las comparaciones entre tratamientos se realizaron mediante contrastes ortogonales. De esta forma se realizaron los siguientes contrastes: C1 = CON vs las dietas conteniendo los aditivos; C2 = INU vs las dietas conteniendo alfalfa o pulpa de citrus; C3 = ALF vs CP.

Las poblaciones microbianas fecales cuantificadas presentaron varianzas heterogéneas, incluso luego de la transformación logarítmica de la variable. Se reportan por tanto las medianas de los recuentos y los valores mínimos y máximos observados para cada variable. El efecto del tratamiento fue analizado utilizando el análisis no paramétrico de Kruskal – Wallis mediante el procedimiento NPAR1WAY de SAS<sup>®</sup>.



Las diferencias entre las medias de los parámetros con valores de  $P \leq 0,05$  fueron aceptadas como significativamente distintas, mientras que valores de P mayores a 0,05 y menores a 0,1 se aceptaron como tendencias.

## 9. RESULTADOS

### 9.1. Parámetros productivos y digestibilidad aparente

En el Cuadro II se presentan los parámetros productivos para los distintos tratamientos. No se observaron diferencias entre los tratamientos para el consumo diario de MS, las ganancias diarias de peso o la conversión alimenticia.

**Cuadro II. Efecto de la inclusión de los aditivos en la dieta sobre parámetros productivos en lechones.**

	Tratamiento <sup>(1)</sup>					Contraste <sup>(3)</sup> (P)		
	CON	INU	ALF	CIT	EEM <sup>(2)</sup>	C1	C2	C3
Consumo, g MS/d	725,9	660,0	630,1	715,4	57,65	0,40	0,86	0,31
Consumo, g MS/kg PV	42,9	40,8	38,6	46,7	4,29	0,85	0,72	0,18
Ganancia diaria, g	438,7	337,3	401,7	385,0	79,50	0,45	0,55	0,87
Conversión alimenticia, g/g <sup>(4)</sup>	0,540	0,434	0,506	0,447	0,095	0,41	0,66	0,62

<sup>(1)</sup> Tratamiento: CON = dieta control basada en maíz y harina de soja; INU = CON + 3% inulina; ALF = CON + 4.5% alfalfa fresca; CIT = CON + 4.5% pulpa de citrus fresca. <sup>(2)</sup> Error estándar de las medias ( $n = 6/\text{tratamiento}$ ). <sup>(3)</sup> Contrastes: C1 = CON vs. inclusión de fibra; C2 = INU vs. (ALF + CIT); C3 = ALF vs. CIT. <sup>(4)</sup> Conversión alimenticia calculada como g de aumento de PV / g de alimento ingerido.

La digestibilidad aparente de los nutrientes se presenta en el Cuadro III. La digestibilidad de la PB fue la única fracción del alimento afectada por los tratamientos. La inclusión de los aditivos en las dietas produjo una disminución en la digestibilidad de la PB del 6,4%, sin que se observaran diferencias entre las distintas fuentes de fibra.

**Cuadro III. Efecto de la inclusión de los aditivos en la dieta sobre la digestibilidad aparente de los nutrientes en lechones.**

	Tratamiento <sup>(1)</sup>					Contraste <sup>(3)</sup> (P)		
	CON	INU	ALF	CIT	EEM <sup>(2)</sup>	C1	C2	C3
<i>Digestibilidad aparente <sup>(4)</sup></i>								
MS, %	85,07	83,61	83,15	83,77	1,56	0,38	0,93	0,77
MO, %	86,03	84,60	84,19	84,68	1,52	0,37	0,92	0,82
PB, %	85,51	80,74	79,36	80,01	2,04	0,02	0,66	0,81
FDN, %	69,75	66,57	71,32	69,55	3,63	0,89	0,40	0,73
FDA, %	62,59	57,98	65,77	64,8	4,69	0,96	0,22	0,89
Hemic., %	72,83	70,32	74,27	71,98	3,34	0,87	0,50	0,63
EE, %	61,47	66,92	58,02	65,92	3,61	0,57	0,23	0,10

<sup>(1)</sup> Tratamiento: CON = dieta control basada en maíz y harina de soja; INU = CON + 3% inulina; ALF = CON + 4.5% alfalfa fresca; CIT = CON + 4.5% pulpa de citrus fresca. <sup>(2)</sup> Error estándar de las medias ( $n = 6/\text{tratamiento}$ ). <sup>(3)</sup> Contrastes: C1 = CON vs. inclusión de fibra; C2 = INU vs. (ALF + CIT); C3 = ALF vs. CIT. <sup>(4)</sup> Digestibilidad aparente: MS = material seca; MO = materia orgánica; PB = proteína bruta; FDN = fibra detergente neutra; FDA: fibra detergente ácida; Hemic. = hemicelulosas.

## 9.2. Parámetros fecales

Las características de las heces (g excretados, contenido de MS y consistencia), así como el pH de la digesta del íleon y colon de los lechones son presentados en el Cuadro IV. La excreción diaria de heces frescas tendió a ser mayor en los tratamientos que incluyeron aditivos ( $P=0,09$ ) sin que se observaran diferencias entre los distintos tipos de aditivos utilizados. El contenido de MS de las heces se redujo con la inclusión de aditivos en la dieta ( $P=0,03$ ); dentro de los tipos de aditivos, los animales suplementados con inulina excretaron heces con un contenido de MS que tendió a ser mayor que para los animales que recibieron dietas conteniendo alfalfa o pulpa de citrus ( $P=0,06$ ). Además, las heces de los lechones alimentados con la dieta control tuvieron una consistencia más firme que la de los alimentados con dietas suplementadas con aditivos ( $P=0,04$ ). Los valores de pH en las heces y en la digesta del íleon no fueron afectados por los tratamientos; no obstante, el pH de la digesta del colon fue mayor en los lechones que recibieron la dieta que contenía inulina con respecto a los alimentados con ALF y CIT ( $P=0,02$ ).

**Cuadro IV. Efecto de la inclusión de los aditivos en la dieta sobre las características fecales y de la digesta en lechones.**

	Tratamiento <sup>(1)</sup>				EEM <sup>(2)</sup>	Contraste <sup>(3)</sup> (P)		
	CON	INU	ALF	CIT		C1	C2	C3
Excreción fecal, g/d	331,6	364,6	442,7	464,1	57,41	0,09	0,12	0,73
MS en heces, %	31,3	29,3	24,5	24,4	2,56	0,03	0,06	0,98
Consistencia <sup>(4)</sup>	1,57	1,97	2,21	2,11	0,33	0,04	0,46	0,73
pH fecal	6,03	6,03	6,38	6,17	0,13	0,31	0,13	0,28
pH ileal	6,38	6,27	6,35	6,57	0,24	0,94	0,53	0,53
pH colónico	6,19	6,28	6,07	5,93	0,10	0,33	0,02	0,28

<sup>(1)</sup> Tratamiento: CON = dieta control basada en maíz y harina de soja; INU = CON + 3% inulina; ALF = CON + 4.5% alfalfa fresca; CIT = CON + 4.5% pulpa de citrus fresca. <sup>(2)</sup> Error estándar de las medias ( $n = 6/\text{tratamiento}$ ). <sup>(3)</sup> Contrastes: C1 = CON vs. inclusión de fibra; C2 = INU vs. (ALF + CIT); C3 = ALF vs. CIT. <sup>(4)</sup> Consistencia fecal: 1 (heces firmes) a 4 (heces líquidas).

## 9.3. Balance de nitrógeno

Los efectos de la inclusión de los aditivos sobre el balance del N se presentan en el Cuadro V. Los animales alimentados con dietas que contenían aditivos presentaron un consumo de N menor que los que consumieron la dieta control ( $P=0,03$ ). Sin embargo, la inclusión de aditivos no modificó la excreción fecal diaria de N. La eliminación urinaria diaria de N fue mayor en el grupo que recibió la dieta suplementada con alfalfa ( $P=0,02$ ), mientras que el grupo que recibió la dieta conteniendo inulina fue el que tendió a eliminar diariamente menos N por orina ( $P=0,09$ ). El N retenido por día fue mayor en el grupo control que en los grupos de lechones que recibieron dietas suplementadas con aditivos ( $P=0,01$ ). La inclusión de aditivos deprimió la utilización de N ( $P=0,02$ ). En este parámetro las diferentes fuentes de aditivos provocaron efectos diferentes, ya que la alfalfa fue el tratamiento que presentó menor utilización de N ( $P=0,03$ ) e INU tendió a utilizar mejor el N que los restantes tratamientos que contenían aditivos ( $P=0,09$ ).

**Cuadro V. Efecto de la inclusión de los aditivos sobre la ingestión, excreción y retención de N en lechones.**

	Tratamiento <sup>(1)</sup>					Contraste <sup>(3)</sup> (P)		
	CON	INU	ALF	CIT	EEM <sup>(2)</sup>	C1	C2	C3
N ingerido, g/d	24,1	19,8	18,6	19,5	1,85	0,03	0,76	0,74
Excreción fecal de N, g/d	3,51	3,74	3,76	3,73	0,38	0,53	0,99	0,96
Excreción urinaria de N, g/d	1,95	1,79	3,96	1,98	0,55	0,33	0,09	0,02
N retenido, g/d	18,67	14,23	10,9	13,78	1,70	0,01	0,37	0,24
N utilizado, % <sup>(4)</sup>	77,13	71,55	56,99	69,83	4,00	0,02	0,09	0,03

<sup>(1)</sup> Tratamiento: CON = dieta control basada en maíz y harina de soja; INU = CON + 3% inulina; ALF = CON + 4.5% alfalfa fresca; CIT = CON + 4.5% pulpa de citrus fresca. <sup>(2)</sup> Error estándar de las medias ( $n = 6/\text{tratamiento}$ ). <sup>(3)</sup> Contrastes: C1 = CON vs. inclusión de fibra; C2 = INU vs. (ALF + CIT); C3 = ALF vs. CIT. <sup>(4)</sup> g de N retenido/ g de N ingerido.

#### 9.4. Microbiología intestinal

En el Cuadro VI se presentan los recuentos en las poblaciones microbianas del colon de acuerdo a los diferentes tratamientos. No se observaron diferencias entre los distintos tratamientos en el número de UFC ( $\log_{10}/\text{g}$  de digesta fresca) de ninguno de los grupos bacterianos cuantificados.

**Cuadro VI. Efecto de la inclusión de los aditivos en la dieta sobre las poblaciones bacterianas colónicas en lechones.**

	Tratamiento <sup>(1)</sup>				P <sup>(3)</sup>
	CON	INU	ALF	CIT	
<i>Bacterias colónicas, <math>\log_{10}</math> UFC/g digesta fresca <sup>(2)</sup></i>					
Coliformes	7,65 (7,26-9,81)	7,49 (6,87-8,63)	8,03 (6,69-9,21)	7,33 (6,55-8,06)	0,344
Bacteria ácido lácticas	8,73 (7,31-9,45)	8,60 (7,16-9,32)	8,94 (7,40-9,41)	8,45 (7,83-8,75)	0,411
Aerobias totales	8,98 (7,39-9,89)	8,90 (7,18-9,95)	9,23 (8,01-9,51)	8,08 (7,41-9,00)	0,312

<sup>(1)</sup> Tratamiento: CON = dieta control basada en maíz y harina de soja; INU = CON + 3% inulina; ALF = CON + 4.5% alfalfa fresca; CIT = CON + 4.5% pulpa de citrus fresca. <sup>(2)</sup> Medianas de cada tratamiento. Los valores mínimos y máximos se presentan entre paréntesis. <sup>(3)</sup> P: probabilidad del efecto de la dieta determinado mediante test de Kruskal-Wallis.

#### 9.5. Actividad fermentativa de la microbiota del colon

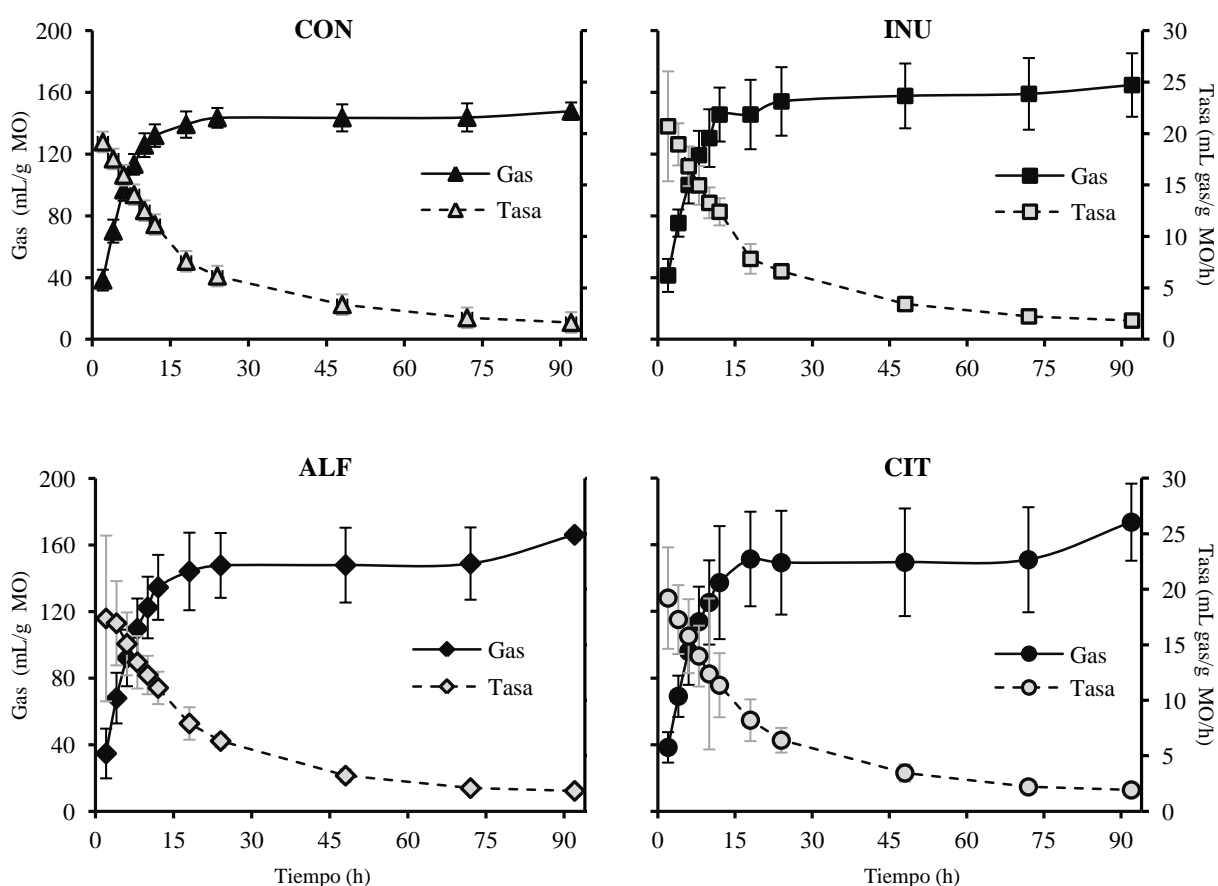
Los parámetros de fermentación *in vitro* ajustados a los modelos matemáticos se presentan en el Cuadro VII, mientras que las cinéticas de fermentación *in vitro* durante las 92 h de incubación se presentan en la Figura 2. La producción de gas de los inóculos provenientes de los animales alimentados con el tratamiento control tendió a ser menor que la de los alimentados con dietas suplementadas con aditivos ( $P=0,07$ ). Los lechones alimentados con INU presentaron un menor tiempo medio para alcanzar la producción asintótica de gas ( $P<0,01$ ) así como una mayor tasa máxima de producción de gas ( $P<0,01$ ) que los animales que recibieron los demás tratamientos. Por otra parte, el tiempo en que se produjo la tasa máxima de fermentación tendió a ser mayor cuando la digesta utilizada para la fermentación *in*

*in vitro* provino de los animales que recibieron ALF (P=0,06). No se detectaron diferencias entre tratamientos para la desaparición de MO.

**Cuadro VII. Cinéticas de fermentación *in vitro* de alimento control (CON) pre-digerido utilizando como inóculo digesta colónica de lechones alimentados con dietas suplementadas o no con aditivos.**

	Tratamiento <sup>(1)</sup>					Contraste <sup>(3)</sup> (P)		
	CON	INU	ALF	CIT	EEM <sup>(2)</sup>	C1	C2	C3
Gas, mL/g MO	144,2	151,1	146,9	151,5	7,49	0,07	0,56	0,24
T <sub>1/2</sub> , h	3,95	3,85	4,31	4,27	0,22	0,24	<0,01	0,85
R <sub>max</sub> , mL/h	23,00	24,79	22,23	22,45	1,24	0,84	<0,01	0,81
T <sub>max</sub> , h	1,71	1,62	2,06	1,60	0,23	0,79	0,32	0,06
DOM, %	40,26	41,11	42,29	39,27	2,17	0,78	0,89	0,28

<sup>(1)</sup> Tratamiento: CON = dieta control basada en maíz y harina de soja; INU = CON + 3% inulina; ALF = CON + 4.5% alfalfa fresca; CIT = CON + 4.5% pulpa de citrus fresca. <sup>(2)</sup> Error estándar de las medias (n = 6/tratamiento). <sup>(3)</sup> Contrastes: C1 = CON vs. inclusión de fibra; C2 = INU vs. (ALF + CIT); C3 = ALF vs. CIT. <sup>(4)</sup> Gas: mL de gas acumulado/g MO incubada; T<sub>1/2</sub>: mitad de tiempo para alcanzar la producción de gas asintótica; R<sub>max</sub>: tasa máxima de producción de gas; T<sub>max</sub>: tiempo en el que se produce la R<sub>max</sub>; DMO: porcentaje de desaparición de la MO incubada.



**Figura 2. Cinéticas de producción de gas *in vitro* y tasas de fermentación a través de 92 h de incubación de alimento control (CON) pre-digerido incubado digesta colónica de lechones alimentados con dietas suplementadas o no con aditivos. Las barras indican el error estándar en cada punto de medición.**

## 9.6. Morfometría del TGI

En el Cuadro VIII se presentan el peso vacío y la longitud de los diferentes segmentos del TGI para los diferentes tratamientos, mientras que en el Cuadro IX se presentan estos mismos parámetros relativos al peso vivo. No se detectaron diferencias significativas en el peso de los segmentos gastrointestinales. Se observó que el peso vacío del duodeno tendió a ser menor ( $P=0,07$ ) en los lechones suplementados con inulina con respecto a los que recibieron las otras dos fuentes de fibra. Además el peso del intestino delgado tendió a ser menor ( $P=0,09$ ) en el grupo control que en los suplementados. Con respecto a la longitud de los órganos, no se observaron diferencias entre los tratamientos excepto que los animales alimentados con INU presentaron longitudes de estómagos que tendieron a ser menores ( $P=0,09$ ), mientras que los que recibieron CIT tuvieron una menor longitud del segmento yeyuno-íleon ( $P=0,05$ ).

**Cuadro VIII. Efecto de la inclusión de los aditivos en la dieta sobre el peso vacío y la longitud de los segmentos digestivos de lechones.**

	Tratamiento <sup>(1)</sup>					Contraste <sup>(3)</sup> (P)		
	CON	INU	ALF	CIT	EEM <sup>(2)</sup>	C1	C2	C3
<i>Peso vacío del órgano</i>								
Estómago, g	181,9	167,6	174,7	172,8	11,91	0,45	0,67	0,91
Duodeno, g	18,5	16,7	20,9	20,0	1,80	0,81	0,07	0,69
Yeyuno-íleon, g	751,3	685,3	747,8	703,9	36,86	0,37	0,38	0,41
Ciego, g	62,8	51,4	60,8	52,1	5,51	0,22	0,47	0,28
Colon, g	317,9	333,8	292,8	299,8	18,81	0,68	0,12	0,80
Intestino delgado, g	683,4	773,0	755,5	749,4	37,13	0,09	0,66	0,91
Intestino grueso, g	380,8	385,3	353,6	351,8	21,65	0,50	0,23	0,96
TGI, g <sup>(4)</sup>	1329,4	1254,8	1296,9	1248,6	60,11	0,36	0,80	0,57
<i>Longitud del órgano</i>								
Estómago, cm	16,74	15,67	17,17	16,50	0,74	0,66	0,09	0,38
Duodeno, cm	19,42	18,50	21,17	20,33	1,88	0,77	0,30	0,73
Yeyuno-íleon, m	11,24	10,44	11,08	9,71	0,48	0,16	0,94	0,05
Ciego, cm	15,17	12,93	15,50	13,83	1,09	0,26	0,12	0,16
Colon, m	2,88	2,85	2,78	2,62	0,16	0,50	0,46	0,51

<sup>(1)</sup> Tratamiento: CON = dieta control basada en maíz y harina de soja; INU = CON + 3% inulina; ALF = CON + 4.5% alfalfa fresca; CIT = CON + 4.5% pulpa de citrus fresca. <sup>(2)</sup> Error estándar de las medias ( $n = 6/\text{tratamiento}$ ). <sup>(3)</sup> Contrastes: C1 = CON vs. inclusión de fibra; C2 = INU vs. (ALF + CIT); C3 = ALF vs. CIT. <sup>(4)</sup> Tracto gastrointestinal total.

Cuando el peso y longitud de los distintos segmentos del tubo digestivo se expresaron en relación al PV de los animales (Cuadro IX) no se detectaron diferencias ni en el peso de los órganos ni en la longitud de los mismos.

**Cuadro IX. Efecto de la inclusión de los aditivos en la dieta sobre el peso y la longitud relativa (g o cm/kg PV) de los segmentos digestivos de lechones.**

	Tratamiento <sup>(1)</sup>					Contraste <sup>(3)</sup> (P)		
	CON	INU	ALF	CIT	EEM <sup>(2)</sup>	C1	C2	C3
<i>Peso vacío del órgano (g)/PV (kg)</i>								
Estómago, g	9,27	8,93	9,53	9,58	0,45	0,89	0,28	0,91
Duodeno, g	0,96	0,91	1,13	1,12	0,11	0,50	0,12	0,91
Yeyuno-íleon, g	38,66	36,95	40,79	39,05	2,16	0,91	0,24	0,55
Ciego, g	3,19	2,82	3,28	2,91	0,30	0,59	0,45	0,39
Colon, g	16,20	18,01	15,82	16,87	0,95	0,47	0,12	0,38
Intestino delgado, g	40,46	37,87	41,93	40,16	2,38	0,86	0,23	0,56
Intestino grueso, g	19,39	20,83	19,09	19,78	1,09	0,64	0,24	0,61
TGI, g <sup>(4)</sup>	69,57	67,62	70,52	69,53	3,27	0,92	0,50	0,81
<i>Longitud del órgano (cm)/PV (kg)</i>								
Estómago, cm	0,88	0,84	0,93	0,93	0,05	0,67	0,12	0,97
Duodeno, cm	0,98	1,01	1,14	1,15	0,11	0,36	0,34	0,96
Yeyuno-íleon, cm	57,3	56,1	60,4	54,5	3,72	0,94	0,73	0,21
Ciego, cm	0,78	0,72	0,85	0,78	0,07	0,92	0,27	0,42
Colon, cm	14,7	15,5	14,9	14,8	0,91	0,71	0,56	0,92

<sup>(1)</sup> Tratamiento: CON = dieta control basada en maíz y harina de soja; INU = CON + 3% inulina; ALF = CON + 4.5% alfalfa fresca; CIT = CON + 4.5% pulpa de citrus fresca. <sup>(2)</sup> Error estándar de las medias (n = 6/tratamiento). <sup>(3)</sup> Contrastes: C1 = CON vs. inclusión de fibra; C2 = INU vs. (ALF + CIT); C3 = ALF vs. CIT. <sup>(4)</sup> Tracto gastrointestinal total.

Respecto a la histología cuantitativa el íleon, no se observaron diferencias entre tratamientos para ninguna de las variables cuantificadas (Cuadro X).

**Cuadro X. Efecto de la inclusión de los aditivos en la dieta sobre la morfometría histológica del íleon.**

	Tratamiento <sup>(1)</sup>					Contraste <sup>(3)</sup> (P)		
	CON	INU	ALF	CIT	EEM <sup>(2)</sup>	C1	C2	C3
Altura vellosidades, µm	384,3	399,2	389,2	429,6	67,1	0,77	0,90	0,66
Espesor mucosa, µm	915,9	993,0	998,7	1093,3	135,7	0,46	0,76	0,61
Profundidad criptas, µm	531,6	593,9	609,6	661,4	86,3	0,36	0,70	0,66
Vellosidad/Cripta	0,72	0,70	0,65	0,70	0,11	0,77	0,86	0,70

<sup>(1)</sup> Tratamiento: CON = dieta control basada en maíz y harina de soja; INU = CON + 3% inulina; ALF = CON + 4.5% alfalfa fresca; CIT = CON + 4.5% pulpa de citrus fresca. <sup>(2)</sup> Error estándar de las medias (n = 6/tratamiento). <sup>(3)</sup> Contrastes: C1 = CON vs. inclusión de fibra; C2 = INU vs. (ALF + CIT); C3 = ALF vs. CIT.

## 10. DISCUSIÓN

El consumo diario de MS por animal para todos los tratamientos se encontró dentro de los niveles esperados para la categoría según lo indicado por NRC (1998). A pesar de que la inclusión de fibra en las dietas de cerdos puede llevar a modificaciones en el consumo de alimentos, no se registraron modificaciones en ninguna de las variables relacionadas con el rendimiento productivo (consumo de MS, ganancia diaria de PV o conversión alimenticia). Se ha reportado que un aumento en los niveles de fibra de las dietas está asociado a una reducción en el contenido de EM del alimento (Noblet et al., 2001) y esta reducción puede ser un estímulo para aumentar el consumo de la dieta manteniendo de esta forma el consumo de energía (Lee et al., 2002). Por otra parte, el efecto de repleción de la fibra dietética puede llevar a saciedad (Kyriazakis & Emmans, 1995) o a disminuir la palatabilidad de la dieta (Braude, 1967). No obstante, según los datos reportados en algunas publicaciones la inclusión en la dieta de cerdos de 7,5% de pulpa de citrus (Weber et al., 2008), 4% de pulpa de remolacha (Bikker et al., 2006) o 3% de inulina (Loh et al., 2006) no afectan el consumo o la eficiencia de crecimiento. Posiblemente los niveles de fibra utilizados en el presente experimento (3% de inulina, 4,5% de alfalfa y pulpa de citrus; FND: desde 12,5 a 15,7%) no fueron suficientemente altos como para modificar de manera sustancial el contenido de fibra y energía de las dietas, y por tanto influir sobre el consumo de alimentos y la eficiencia de crecimiento.

A pesar de que las fracciones de menor digestión (NDF, ADF y hemicelulosas) fueron mayores en las dietas suplementadas en comparación con la dieta control (por ej., un nivel de FDN 8,5%, 25% y 15% mayor en INU, ALF y CIT, respectivamente) la digestibilidad aparente de la MS, MO, fracciones de fibra y EE de las dietas experimentales no fueron afectadas por la inclusión de aditivos (Cuadro 2). No obstante, según otros autores la digestibilidad aparente de los nutrientes en las dietas de cerdos disminuye cuando aumentan los niveles de fibra (Le Goff et al., 2003), debido a la adición de ingredientes de baja digestibilidad, lo que diluye la cantidad de nutrientes disponibles para la digestión hidrolítica (Smiricky-Tjardes et al., 2003). Es interesante destacar que la digestibilidad de las diferentes fracciones fibrosas en nuestro trabajo (en promedio 69%, 63% y 72% para la FDN, FDA y hemicelulosas, respectivamente) fue más elevada que valores de digestibilidad reportados por Noblet et al. (2001) que señalan que la digestibilidad de la fibra de la dieta varía entre 40 y 60%. Seguramente, la alta digestibilidad de las fracciones fibrosas de las dietas, sumado a que los niveles de fibra utilizados no fueron demasiado elevados [FEDNA (2006) indica un máximo de 13% de FND para lechones de entre 12 y 22 kg de PV], pueden explicar que la digestibilidad de los nutrientes no fue afectada con la inclusión de fibra. Además, el hecho de que la digestibilidad de la mayoría de los nutrientes no fuera modificada por los aditivos explica y se relaciona con los resultados obtenidos en consumo y eficiencia de crecimiento.

En este trabajo únicamente se observaron cambios en la digestibilidad de la PB, que fue menor en los tratamientos suplementados con aditivos ( $P=0,02$ ). Esta depresión en la digestibilidad de la proteína pudo deberse a una disminución en el tiempo de tránsito de la digesta a través del TGI ya observada por otros en dietas suplementadas con fibra (Bindelle et al., 2008), lo que limita el tiempo de contacto entre nutrientes y enzimas, y productos de digestión con superficies de absorción (De Haer y De Vries, 1993). Además, la disminución en la digestibilidad de las proteínas pudo deberse a



un aumento en la excreción de nitrógeno unido a la fracción fibrosa de la digesta, a una mayor pérdida de nutrientes endógenos asociados a un aumento en la masa microbiana excretada en las heces (Andersson y Lindberg, 1997a), así como a un aumento en las secreciones digestivas que se producen cuando los niveles de fibra en la dieta aumentan (Wenk, 2007).

Con respecto al balance de N, dado que el contenido de N fue mayor en la dieta control y que no hubieron diferencias entre tratamientos para el consumo de alimentos, el consumo de N fue mayor en los animales que recibieron el tratamiento CON. No obstante, la excreción de N fue similar entre tratamientos debido a que el menor consumo de N en los grupos suplementados con fibra fue compensado por la reducción en la digestibilidad de la PB (N x 6,25), resultando en una excreción fecal similar, como fue reportado por Zervas y Siljstra (2002). Los animales que recibieron las dietas suplementadas con fibra retuvieron menos N y lo utilizaron menos eficientemente. Dentro de los tratamientos suplementados con aditivos, el tratamiento que incluyó alfalfa fue el que presentó menores valores de utilización de N y mayor excreción urinaria de N. Se ha reportado que la inclusión de carbohidratos fermentables en las dietas produce una modificación en la excreción de N, aumentando en heces y disminuyendo en orina (Schulze et al., 1995; Cahn et al., 1997) debido a que el N es retenido en el intestino grueso, lo que estaría asociado a los procesos de síntesis de proteína bacteriana. Como consecuencia de lo anterior, disminuye el N que se absorbe a través de la pared del intestino, que pasa a la sangre y que finalmente es excretado por orina (Bindelle et al., 2008). Este efecto, al comparar los aditivos entre sí, fue parcialmente notado con la inclusión de inulina, que tendió a producir una leve reducción en el N emitido a través de la orina al ser comparado con los otros dos aditivos.

En este experimento la excreción fecal en los grupos suplementados con los aditivos tendió a ser mayor que los que recibieron la dieta control. Además, la inclusión de los aditivos en las dietas produjo heces con mayor contenido en humedad y de consistencia más blanda. El consumo de fibra influye en diversos procesos metabólicos, disminuyendo la absorción de nutrientes y la aumentando producción de heces (Bauer et al., 2006). Cummings et al., (1992) observaron que alimentos ricos en celulosa, como la alfalfa, provocan un efecto de repleción en el colon, una disminución en el tiempo de tránsito fecal y un aumento en el volumen de las heces. Sin embargo, en nuestro trabajo la inclusión de alfalfa o pulpa de citrus en las dietas no modificó de manera significativa la cantidad de heces excretadas como era esperable, seguramente debido a que ni el consumo de las dietas, ni la digestibilidad de la MS o MO de las dietas fueron diferentes entre tratamientos.

De acuerdo a las características de las heces, la inclusión de fibra en las dietas produjo heces con mayor contenido en humedad y de consistencia más blanda. De acuerdo con la composición de las dietas experimentales aquí utilizadas, las fuentes de fibras, sobre todo las rápidamente fermentables como inulina o pulpa de citrus, contribuyen a aumentar la capacidad de retención de agua de la digesta y de la materia fecal, lo que disminuye el contenido de MS de las heces (Fahey et al., 1992), llevando a que se excreten heces más blandas (Twomey et al., 2003). Además, existe un efecto osmótico de los productos de fermentación (AGV, lactato) y de los carbohidratos que no son fermentados en intestino, lo que se relaciona con una menor consistencia fecal (Twomey et al., 2003). En nuestro trabajo no detectamos

diferencias entre grupos en el pH fecal medido en heces, aunque sí encontramos que el pH colónico fue mayor en INU que en ALF y CIT, por lo que seguramente la presencia de fibra en los grupos suplementados fue el factor más relacionado con la disminución en la consistencia fecal detectada.

Como fue mencionado anteriormente, el pH de las heces y de la digesta del íleon no fue diferente entre tratamientos, aunque sí se encontró que el pH de la digesta del colon fue más bajo para los animales suplementados con alfalfa y pulpa de citrus que los que recibieron INU. La inclusión de fibra fermentable en la dieta lleva a la acumulación de ácidos orgánicos (ácido láctico y AGV) como productos finales de la fermentación microbiana, lo que provocaría la disminución en el pH luminal y fecal (Twomey et al., 2003), aunque este efecto pudo ser notado únicamente en la digesta de los animales alimentados con CIT y ALF. El pH en íleon no se modificó a pesar de que la fermentación microbiana comienza en intestino delgado y que las fuentes de fibra de fermentación rápida (como inulina) comienzan a ser fermentadas en los segmentos más proximales del TGI como íleon y colon proximal (Bosch et al., 2008). El pH en heces no fue diferente entre tratamientos seguramente porque los ácidos orgánicos que se producen en el colon fueron completamente absorbidos en este tramo del intestino, lo que condujo a valores de pH incambiados en las heces, del mismo modo que fue observado por Houdijk et al. (1998).

Los resultados obtenidos mediante el recuento de poblaciones bacterianas sugieren que no existió un efecto prebiótico en términos de estimulación de las bacterias lácticas o de la depleción en el número de bacterias Gram negativas fermentadoras de lactosa. Con el fin de estimar la influencia de los tratamientos sobre grandes grupos bacterianos, es posible asumir que este último grupo corresponde en su gran mayoría a coliformes (Orban et al., 1997). Disminuciones en el recuento de potenciales patógenos intestinales (por ej. coliformes o clostridios) han sido descritos con la inclusión de oligosacáridos en la dieta de cerdos (Liu et al., 2008), pectinas de citrus en la dieta de perros (Biagi et al., 2010) o pulpa de citrus ensilada en dietas de cerdos en crecimiento (Cerisuelo et al., 2010). Por otra parte, Loh et al. (2006) observaron que no existió un estímulo en la población de bifidobacterias y lactobacilos en el colon de cerdos en post-destete suplementados con 3% de inulina en la dieta. Parece ser que las fuentes de fibra a los niveles utilizados en nuestro experimento no modificaron de manera selectiva las poblaciones microbianas del colon. Además, es posible que cada animal hospede su propia composición bacteriana única y específica, incluso al recibir la misma dieta que otros animales (Metzler & Mosenthin, 2008). De todas formas, si consideramos que las modificaciones que se produjeron en los parámetros de fermentación (pH del colon o fermentación *in vitro*) son atribuibles a modificaciones en la microbiota intestinal, es posible que con una aproximación a la cuantificación de los grupos bacterianos mediante una técnica tradicional como el recuento en placa no siempre podamos detectar diferencias entre los grupos bacterianos medidos. La cuantificación de los grupos microbianos mediante técnicas moleculares (por ej. PCR cuantitativo) podría permitirnos esclarecer el impacto de la adición de alfalfa o pulpa de citrus en las dietas para modular las poblaciones microbianas en los cerdos.

La composición del sustrato fermentado indica que la pre-digestión del alimento control indujo un aumento en las fracciones fibrosas (FDN, FDA y hemicelulosas) y una disminución en el contenido de PB. Estas modificaciones en el contenido de

nutrientes luego de una hidrólisis enzimática están en el mismo sentido que los reportados por Bindelle et al., (2007) y Bauer et al., (2003). Con respecto a la fermentación *in vitro*, el inóculo de los animales alimentados con las dietas suplementadas con aditivos tendió a producir más gas que los que recibieron la dieta control. Asimismo, el inóculo de los animales alimentados con INU produjo una velocidad de fermentación mayor, en términos de que presentó un menor  $T_{1/2}$  y una mayor tasa de fermentación ( $R_{max}$ ). Estas diferencias sugieren que la composición de las dietas influye en los perfiles de fermentación, ya que la fibra de la dieta modifica la microbiota del intestino grueso, tanto en especies como en cantidades que la componen (Williams et al., 2001).

Los estudios que evalúan la actividad fermentativa del inóculo mediante la producción de gas *in vitro* en cerdos alimentados con dietas con diferentes niveles y tipos de fibra son escasos. Bindelle et al. (2007) trabajando con inóculos fecales de cerdos alimentados con dietas bajas y altas en fibra, y altas y bajas en fibra soluble observaron que la mayor influencia de los donantes de inóculo sobre las cinéticas de fermentación *in vitro* está dada por la fracción de fibra soluble de la dieta. Esto concuerda en parte con los datos obtenidos en nuestro experimento, donde la microbiota del colon más activa en fermentar el sustrato fue la que provino de los animales suplementados con inulina. Este mayor estímulo puede deberse a que las fibras solubles son generalmente fermentadas en mayor magnitud (McBurney et al., 1985) y velocidad (Shim, 2005) que las fibras de menor solubilidad. No obstante, esperábamos encontrar una respuesta similar en el grupo alimentado con pulpa de citrus (rica en fibra soluble), dado que esta presenta perfiles de fermentación *in vitro* similares a lo de la inulina cuando se utiliza como inóculo materia fecal de perros (Brambillasca et al., 2011). Sin embargo, la pulpa de citrus no estimuló la actividad fermentativa de la microbiota del colon en la misma magnitud que la inulina.

Con respecto a la morfometría de los órganos digestivos, únicamente se observaron diferencias significativas en la longitud del yeyuno-íleon de los animales que recibieron la dieta suplementada con pulpa de citrus. No se detectaron diferencias en el tamaño, tanto en peso como en longitud, de ninguno de los segmentos del TGI, excepto para el peso del duodeno y del intestino delgado que tendieron a ser menores en los lechones que recibieron INU y CON respectivamente, y la longitud del yeyuno-íleon (menor en el tratamiento CIT) y del estómago que tendió a ser menor para los animales que recibieron INU. Los tratamientos no influyeron sobre ninguna de las variables cuando se expresaron en relación al PV de los animales. Len et al. (2009) reportaron que cerdos alimentados con dietas que contenían niveles altos (nivel de inclusión=25%; FDN=17%) de diferentes fuentes fibrosas (afrechillo de arroz, harina de batata o residuo de mandioca) tuvieron mayores pesos del TGI que los alimentados con dietas bajas en fibra (FDN=9%). En el mismo sentido, Pluske et al. (1998) observaron que el aumento en el consumo de fibra soluble y almidón resistente se asocia con el aumento en los pesos del colon y del intestino total. Si bien el aumento en el tamaño de los órganos digestivos podría relacionarse con condiciones intestinales más saludables, este efecto puede ser desfavorable desde un punto de vista productivo, ya que el aumento en el peso de los órganos digestivos incide de manera negativa en los pesos de faena de los animales (Rijnen et al., 2001; Pluske et al., 1998).

Es posible que los niveles de fibra utilizados en nuestro trabajo no hayan sido suficientemente altos, o bien el número de animales no fue suficiente como para observar cambios en los tamaños de la mucosa intestinal o del tejido subyacente (ej. capas musculares). Esto está en el mismo sentido que la histología cuantitativa, donde no se observaron diferencias entre los tratamientos. La relación altura de vellosidades/profundidad de criptas es un indicador de la capacidad de digestión y absorción del intestino delgado (Montagne et al., 2003). La altura de las vellosidades en nuestro trabajo fueron similares a las reportadas en otros trabajos en los que se incluyeron pectinas y cáscara de cebada (Hedemann et al., 2006) o chito-oligosacáridos (Liu et al., 2008) en la dieta de lechones, aunque la relación vellosidades/criptas fue menor en nuestro experimento (debido a que las profundidades de criptas medidas por nosotros fue mayor). El mantenimiento de esta relación y la altura de las vellosidades sugieren que no fue perjudicada la capacidad de hidrólisis y absorción de nutrientes del intestino delgado, lo que está de acuerdo con los resultados de consumo, ganancia de peso y digestibilidad de nutrientes obtenidos.

## 11. CONCLUSIONES

La inclusión de inulina al 3%, y de alfalfa y pulpa de citrus en niveles del 4,5% en dietas para lechones no deprime el consumo, la eficiencia productiva ni provoca aumentos en la excreción de heces.

Además, se observó un aumento en la actividad fermentativa del intestino grueso con la inclusión de los aditivos. La inulina aumentó las velocidades de fermentación *in vitro*, mientras que el pH colónico fue menor con la inclusión de pulpa de citrus. No obstante, no hubo modificaciones en el recuento de los grupos bacterianos realizado.

Por otra parte, los efectos benéficos de la utilización de fibra sobre la eliminación de N no pudieron ser observados, ya que la inclusión de los aditivos afectó negativamente el metabolismo del N, deprimiendo la digestibilidad y la utilización global del N.

Con los niveles utilizados y el número de observaciones analizadas no pudieron demostrarse cambios en los parámetros morfológicos del tracto gastrointestinal ni en la histología cuantitativa del íleon, asociados a la inclusión de inulina, alfalfa o pulpa de citrus.

En base a los resultados obtenidos, no se considera que la inclusión de alfalfa o pulpa de citrus genere efectos claramente benéficos en lechones en etapa de post-destete.

## 12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) Andersson C., Lindberg J. E. (1997). Forages in diets for growing pigs 1. Nutrient apparent digestibilities and partition of nutrient digestion in barley-based diets including lucerne and white-clover meal. *Anim Sci* 65:483-491.
- 2) Andersson C., Lindberg J. E. (1997). Forages in diets for growing pigs 2. Nutrient apparent digestibilities and partition of nutrient digestion in barley-based diets including red-clover and perennial ryegrass meal. *Anim Sci* 65:493-500.
- 3) Antúnez M., Caramelli A., Britos A., Zanoniani R., Repetto J.L., Boggiano P., Cajarville C. (2007). Efecto del momento del día y del tipo de metabolismo fotosintético sobre el contenido en azúcares solubles de diferentes especies forrajeras. XXXV Jornadas Uruguayas de Buiatría. Paysandú.
- 4) AOAC - Association of Official Analytical Chemist. (1990). *Official Methods of Analysis*, 15<sup>a</sup> ed. Arlington, 69-90.
- 5) Awati A. (2005). Prebiotics in piglet nutrition? Fermentation kinetics along the GI tract. Tesis Doctoral, Wageningen Institute of Animal Science, Wageningen University and Research Centre, Wageningen, Holanda.
- 6) Bach Knudsen K. E. (2001). Development of antibiotic resistance and options to replace antimicrobials in animal diets. *Proc Nutr Soc* 60:291-299.
- 7) Bampidis B.A., Robinson P.H. (2006). Citrus by-products as ruminant feeds: A review. *Anim Feed Sci Technol* 128:175-217.
- 8) Barlocco N., Vadell A., Monteverde S., Primo P. (1999). Comportamiento productivo y mortalidad de lechones en el posdestete a campo. *Rev Fac Cs Vets* 40(4):201-206.
- 9) Barlocco N., Battegazzore G., Primo P., Aguiar T. (2005). Contribución a la definición de programas de alimentación de cerdas gestantes en condiciones de pastoreo permanente y restricción de concentrado. Comunicado técnico en producción porcina n° 3 Universidad de la República, Facultad de Agronomía - Centro Regional Sur.
- 10) Barlocco N., Gómez A., Vadell A., Franco J. (2005). Crecimiento de lechones en sistemas de producción acampo. *Rev Unell Cienc Tec* 23:67-72.
- 11) Barton M. D. (2000). Antibiotic use in animal feed and its impact on human health. *Nutr Res Rev* 13:279-299.
- 12) Battegazzore G., Barlocco N. (2003). Resultados preliminares de la incorporación de pasturas en dietas para cerdos en recría-terminación. 1. Efecto del nivel de restricción de concentrado sobre el consumo de forraje. IV Jornadas Técnicas de la Facultad de Veterinaria, 12-14 de Noviembre, Montevideo, Uruguay.

- 13) Bauer E., Williams B. A., Voigt C., Mosenthin R., Verstegen M.W. A. (2001). Microbial activities of faeces from unweaned and adult pigs, in relation to selected fermentable carbohydrates. *Anim Sci* 73:313–322.
- 14) Bauer E., Williams B.A., Voigt C., Mosenthin R., Verstegen M.W. A. (2003). Impact of mammalian enzyme pretreatment on the fermentability of carbohydrate-rich feedstuffs. *J Sci Food Agric* 83:207-214.
- 15) Bauer E., Williams B. A., Verstegen M. W. A., Mosenthin R. (2006). Fermentable carbohydrates: potential dietary modulators of intestinal physiology, microbiology and immunity in pigs. En: *Biology of Nutrition in Growing Animals*. Eds. Mosenthin R., Zentek J, Zebrowska T. Ed. Elsevier Limited, 4<sup>a</sup> Ed., Edinburgh, Cap. 1, pp.33-63.
- 16) Bauzá R., González A., Panissa G., Petrocelli H., Miller V. (2005). Evaluación de dietas para cerdos en recría incluyendo forraje y suero de queso. *Rev Arg Prod Anim* 25:11-18.
- 17) Bauzá R., González A., Panissa G. (2006). Consumo de forraje por cerdos en ceba recibiendo dos niveles de alimento concentrado. *Rev Comp Prod Porc* 13(1):72-75.
- 18) Benyacoub J., Czarnecki-Maulden G. L.; Cavadini C., Sauthier T., Anderson R. E., Schiffrin E. J., von der Weid T. (2003). Supplementation of food with *Enterococcus faecium* (SF68) stimulates immune function in young dogs. *J Nutr* 133:1158-1162.
- 19) Biagi G., Cipollini I., Grandi M., Zaghini G. (2010). Influence of some potential prebiotics and fibre-rich foodstuffs on composition and activity of canine intestinal microbiota. *Anim Feed Sci Technol* 159:50-58.
- 20) Bikker P. A., Dirkzwager J., Fledderus P., Trevisi I., le Huërou-Luron J. P., Lallès J. P., Awati A. (2006). The effect of dietary protein and fermentable carbohydrates levels on growth performance and intestinal characteristics in newly weaned piglets. *J Anim Sci* 84:3337-3345.
- 21) Bindelle J., Buldgen A., Lambotte D., Wavreille J., Leterme P. (2007). Effect of pig faecal donor and of pig diet composition on *in vitro* fermentation of sugar beet pulp. *Anim Feed Sci Technol* 132:212-226.
- 22) Bindelle J., Buldgen A., Leterme P. (2008). Nutritional and environmental consequences of dietary fibre in pig nutrition: a review. *Biotechnol Agron Soc Environ* 12(1):69-80.
- 23) Bindelle J., Buldgen A., Delacollette M., Wavreille J., Agneessens R., Destain J. P., Leterme P. (2009). Influence of source and concentrations of dietary fiber on *in vivo* nitrogen excretion pathways in pigs as reflected by *in vitro* fermentation and nitrogen incorporation by fecal bacteria. *J Anim Sci* 87:583-593.

- 24) Bosch G., Pellikaan W. F., Rutten P. G. P., van der Poel A. F. B., Verstegen M. W. A., Hendriks W.H. (2008). Comparative in vitro fermentation activity in the canine distal gastrointestinal tract and fermentation kinetics of fiber sources. *J Anim Sci* 86:2979-2989.
- 25) Brambillasca S., Fraga M., Deluca C., Britos A., Cajarville C. (2007). Uso de pulpa de citrus y pomaza de manzana como prebióticos en perros I: efecto sobre poblaciones bacterianas y pH fecales. V Jornadas Técnicas de Facultad de Veterinaria. UdelaR. 21-23, Noviembre, Montevideo, Uruguay, P-50.
- 26) Brambillasca S., Deluca C., Britos A., Reyes L., Cajarville C. (2011). In vitro fermentative characteristics of citrus pulp, apple pomace and inulin combined in increasing levels with a predigested dog food. *J Anim Sci* 89 (E-Suppl. 1):725-726.
- 27) Braude R. (1967). The effect of changes in feeding patterns on the performance of pigs. *Proc Nutr Soc* 26:163-181.
- 28) Britos A., Brambillasca S., Fraga M., Deluca C., Cajarville C. (2007). Uso de pulpa de citrus y pomaza de manzana como prebióticos en perros II: efecto sobre la cantidad diaria total de heces, la consistencia fecal y la frecuencia de defecación. V Jornadas Técnicas de Facultad de Veterinaria. UdelaR. 21-23, Noviembre, Montevideo, Uruguay, P-50.
- 29) Butler J.E., Klobasa F., Werhahn E. (1981). The differential localization of IgA, IgM and IgG in the gut of suckled neonatal piglets. *Vet Immunol Immunopathol* 2:53-65.
- 30) Bywater R., McConville M., Phillips I. Shryock T. (2005). The susceptibility to growth-promoting antibiotics of *Enterococcus faecium* isolates from pigs and chickens in Europe. *J Antimicrob Chemother* 56:538-543.
- 31) Cajarville C., Aguerre M., Repetto J. L. (2006). Rumen pH, NH<sub>3</sub>-N concentrations and forage degradation kinetics of cows grazing temperate pastures and supplemented with different sources of grain. *Anim Res* 55:511-520.
- 32) Callaway T. R., Anderson R. C., Edrington T. S., Elder R. O., Genovese K. J., Bischoff K. M., Poole T. L., Jung Y. S., Harvey R. B., Nisbet D. J. (2003). Preslaughter intervention strategies to reduce food-borne pathogens in food animals. *J Anim Sci* 81(E. Suppl. 2):E17-E23.
- 33) Canh T. T., Verstegen M.W.A., Aarnink A.J.A., Schrama J. W. (1997). Influence of dietary factors on nitrogen partitioning and composition of urine and feces of fattening pigs. *J Anim Sci* 75:700-706.
- 34) Canibe N., Bach Knudsen K. E. (2001). Degradation and physicochemical changes of barley and pea fibre along the gastrointestinal tract of pigs. *J Sci Food Agric* 82:27-39.
- 35) Casey P., Gardiner G., Casey G., Bradshaw B., Lawlor P., Lynch P., Leonard F., Stanton C., Ross R., Fitzgerald G., Hill C. (2007). A five-strain probiotic



combination reduces pathogen shedding and alleviates disease signs in pigs challenged with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Appl Environ Microbiol* 73:1858-1863.

36) Cerisuelo A., Castelló L., Moset V., Martínez M., Hernández P., Piquer O., Gómez E., Gasa J., Lainez M. (2010). The inclusion of ensiled citrus pulp in diets for growing pigs: Effects on voluntary intake, growth performance, gut microbiology and meat quality. *Livest Sci* 134:180-182.

37) Cone J. W., Jongbloed A. W., Van Gelder A. H., de Lange L. (2005). Estimation of protein fermentation in the large intestine of pigs using a gas production technique. *Anim Feed Sci Technol* 123-124:463-472.

38) Conway P. L. (1994). Function and regulation of the gastrointestinal microbiota of the pig. *Proceedings of the VI<sup>th</sup> Int - l Symposium on Digestive Physiology in Pigs*. Eds. Souffrant, W.B., H. Hagemester. EAAP Publication, Ban Doberan, Alemania, pp. 231-240.

39) Corthésy B., Gaskins R., Mercenier A. (2007). Cross-talk between probiotic bacteria and the host Immune system. *J Nutr* 137:781S-790S.

40) Cross M. (2002). Microbes versus microbes: immune signals generated by probiotic lactobacilli and their role in protection against microbial pathogens. *FEMS Immunol Med Microbiol* 34:245-253.

41) Cummings J. H., Bingham S. A., Heaton K. W., Eastwood E. A. (1992). Fecal weight, colon cancer risk, and dietary-intake of nonstarch polysaccharides (dietary fiber). *Gastroenterology* 103:1783-1789.

42) De Haer L. C. M., De Vries A.G. (1993). Feed intake patterns and feed digestibility in growing pigs housed individually or in groups. *Livest Prod Sci* 33:277-292.

43) DIEA. (2007). Encuesta porcina 2006. Caracterización de la situación productiva, tecnológica, comercial y social del sector porcino. (FPTA 170). DIEA-INIA. Montevideo, Uruguay. 75 p.

44) DIEA. (2010). Anuario estadístico agropecuario 2010. Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca. Dirección de Estadísticas Agropecuarias. Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/portal/hgxpp001.aspx?7.5.352.O.S.0.MNU:E:27:6:MNU:;> fecha de consulta: 19/10/11.

45) Escudero-Álvarez E., González-Sánchez P. (2006) La fibra dietética. *Nutr Hosp* 21:61-72.

46) Fahey Jr. G. C., Mewhen N. R., Corbin J. E., Hamilton A. K., Bauer L. L. , Titgemeyer E. C., Hirakawa D. A. (1992). Dietary fiber for dogs: III. Effects of beet pulp oat fiber additions to dog diets on nutrient intake, digestibility, metabolizable energy, and digesta mean retention time. *J Anim Sci* 70:1169-1174.

- 47)Federación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal. Necesidades nutricionales para ganado porcino. Normas FEDNA. (2006). Eds. de Blas C., Gasa J., Mateos, G. G. Madrid, 2006. 60p.
- 48)Freitas L. S., Lopes D. C., Freitas A. F., Carneiro J., Corassa A., Pena S., Costa L. (2006). Avaliação de ácidos orgânicos em dietas para leitões de 21 a 49 dias de idade. Rev Bras Zootec 35(4):1711-1719.
- 49)Gibson G. R., Roberfroid M. B. (1995). Dietary modulation of the colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. J Nutr 125:1401-1412.
- 50)Gibson G. R., Probert H. M., Loo J. V., Rastall R. A., Roberfroid M. B. (2004). Dietary modulation of the human colonic microbiota: Updating the concept of prebiotics. Nutr Res Rev17:259-275.
- 51)Goering H.K., Van Soest P.J. (1970). Forage fiber analysis (apparatus, reagents, procedures and some applications). Agric Handbook 379, USDA.
- 52)Grieshop C. M., Flickinger E. A., Fahey Jr. G. C. (2002). Oral administration of arabinogalactan affects immune status and fecal microbial populations in dogs. J Nutr 132:478-482.
- 53)Groot J. C. J., Cone J. W., Williams B. A., Debersaques F.M.A., Lantinga, E. A. (1996). Multiphasic analysis of gas production kinetics for *in vitro* fermentation of ruminant feeds. Anim Feed Sci Technol 64:77-89.
- 54)Hedemann M. S., Eskildsen M., Lærke H. N., Pedersen C., Lindberg J. E., Laurinen P., Bach Knudsen K. E. (2006). Intestinal morphology and enzymatic activity in newly weaned pigs fed contrasting fiber concentrations and fiber properties. J Anim Sci 84:1375-1386.
- 55)Houdijk J. G. M., Bosch M. W., Verstegen M. W. A., Berenpas H. J. (1998). Effects of dietary oligosaccharides on the growth performance and faecal characteristics of young growing pigs. Anim Feed Sci Technol71:35-48.
- 56)Isolauri E., Sütas Y., Kankaanpää P., Arvilommi H., Salminen S. (2001). Probiotics: effects on immunity. Am J Clin Nutr 73:444S-450S.
- 57)Jenkins D. J. A., Kendall C. W. C., Vuksan V. (1999). Inulin, oligofructose and intestinal function. J Nutr 129:1431S-1433S.
- 58)Jensen, B. B. (1998). The impact of feed additives on the microbial ecology of the gut in young pigs. J Anim Feed Sci 7:45-64.
- 59)Jung H. G., Lamb J. F. S. (2004). Prediction of cell wall polysaccharide and lignin concentrations of alfalfa stems from detergent fiber analysis. Biomass Bioen 27:365-373.

- 60) Kass M. L., Van Soest P. J., Pond W.G. (1980). Utilization of dietary fiber from alfalfa by growing swine. II. Volatile fatty acid concentrations in and disappearance from the gastrointestinal tract. *J Anim Sci* 50:192-197.
- 61) Katouli M., Melin L., Jensen-Waern M., Wallgren P., Möllby R. (1999). The effect of zinc oxide supplementation on the stability of the intestinal flora with special reference to composition of coliforms in weaned pigs. *J Appl Microbiol* 87:564-573.
- 62) Krehbiel C. R., Rust S. R., Zhang G., Gilliland S. E. (2003). Bacterial direct-fed microbials in ruminant diets: performance response and mode of action. *J Anim Sci* 81(E. Suppl. 2):E120-E132.
- 63) Kyriazakis I.; Emmans G. C. (1995). The voluntary feed intake of pigs given feeds based on wheat bran, dried citrus pulp and grass meal, in relation to measurements of feed bulk. *Br J Nutr* 73:191-207.
- 64) Le Goff G., Noblet J., Cherbut C. (2003). Intrinsic ability of the faecal microbial flora to ferment dietary fibre at different growth stages of pigs. *Liv Prod Sci* 81:75-87.
- 65) Lee C. Y., Lee H. P., Jeong J. H., Baik K. H., Jin S. K., Lee J. H., Sohn S. H. (2002). Effects of restricted feeding, low-energy diet, and implantation of trenbolone acetate plus estradiol on growth, carcass traits, and circulating concentrations of insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF-binding protein-3 in finishing barrows. *J Anim Sci* 80:84-93.
- 66) Len N. T., Hong T. T. T., Ogle B., Lindberg J. E. (2009). Comparison of total tract digestibility, development of visceral organs and digestive tract of Mong cai and Yorkshire x Landrace piglets fed diets with different fibre sources. *J Anim Phys Anim Nutr* 93:181-191.
- 67) Liu P., Piao X. S., Kim S. W., Wang L., Shen Y. B., Lee H. S., Li S. Y. (2008). Effects of chito-oligosaccharide supplementation on the growth performance, nutrient digestibility, intestinal morphology, and fecal shedding of *Escherichia coli* and *Lactobacillus* in weaning pigs. *J Anim Sci* 86:2609-2618.
- 68) Loh G., Eberhard M., Brunner R. M., Hennig U., Kuhla S., Kleessen B., Metges C. C. (2006). Inulin alters the intestinal microbiota and short-chain fatty acid concentrations in growing pigs regardless of their basal diet. *J Nutr* 136:1198-1202.
- 69) Mauricio R. M., Mould F. L., Dhanoa M. S., Owen E., Channa K. S., Theodorou M. K. (1999). A semi-automated *in vitro* gas production technique for ruminant feedstuff evaluation. *Anim Feed Sci Technol* 79:321-330.
- 70) McBurney M. I., Horvath P. J., Jeraci J. L., Van Soest P. J. (1985). Effect of *in vitro* fermentation using human faecal inoculum on the water-holding capacity of dietary fibre. *Br J Nutr* 53:17-24.

- 71)Mc Donald P., Edwards R. A., Greenhalgh J. F., Morgan C. A. (2006). *Nutrición animal*. Ed. Acribia S.A., 6ª ed. Zaragoza. P-587.
- 72)Melin M., Wallgren P. (2002). Aspects on feed related prophylactic measures aiming to prevent post weaning diarrhoea in pigs. *Acta Vet Scand* 43:231-245.
- 73)Metzler B. U., Mosenthin R. (2008). A review of interactions between dietary fiber and the gastrointestinal microbiota and their consequences on intestinal phosphorus metabolism in growing pigs. *Asian Australas J Anim Sci* 21(4):603-615.
- 74)Montagne L., Pluske J. R., Hampson D. J. (2003). A review of interactions between dietary fibre and the intestinal mucosa, and their consequences on digestive health in young non-ruminant animals. *Anim Feed Sci Technol* 108:95-117.
- 75)Montagne L., Boudry G., Favier C., Le Huërou-Luron I., Lallès J. P., Sève B. (2007). Main intestinal markers associated with the changes in gut architecture and function in piglets after weaning. *Br J Nutr* 97:45-57.
- 76)Mosenthin R., Sauer W. C., Henkel H., Ahrens F., de Lange C. F. M. (1992). Tracer studies of urea kinetics in growing pigs: II. The effect of starch infusion at the distal ileum on urea recycling and bacterial nitrogen excretion. *J Anim Sci* 70:3467-3472.
- 77)Noblet, J., Le Goff, G. (2001). Effect of dietary fibre on the energy value of feeds for pigs. *Anim Feed Sci Technol* 90:35-52.
- 78)National Research Council - NRC. (1998). *Nutrient Requirements of Swine*. National Academy Press. 10ª ed. Washington, P-210.
- 79)Outor-Monteiro D., Carvalho Pinheiro V. M., Medeiros Mourão J. L., Machado Rodrigues M. A. (2010). Strategies for mitigation of nitrogen environmental impact from swine production. *R Bras Zootec* 39:317-325.
- 80)Orban J. I., Patterson J. A., Adeola O., Sutton A. L., Richards G. N. (1997). Growth performance and intestinal microbial populations of growing pigs fed diets containing sucrose thermal oligosaccharide caramel. *J Anim Sci* 75:170-175.
- 81)Owusu-Asiedu A., Patience J. F., Laarveld B., Van Kessel A. G., Simmins P. H., Zijlstra R. T. (2006). Effects of guar gum and cellulose on digesta passage rate, ileal microbial populations, energy and protein digestibility, and performance of grower pigs. *J Anim Sci* 84:843-852.
- 82)Pérez J. F., Nofrarías M. (2008). Influencia de la nutrición sobre la patología digestiva del lechón. XXIV Curso de Especialización FEDNA. pp. 81-105.
- 83)Pié S., Lallès J. P., Blazy F., Laffitte J., Sève B., Oswald I. P. (2004). Weaning is associated with an upregulation of expression of inflammatory cytokines in the intestine of piglets. *J Nutr* 134:641-647.

- 84)Pié S., Awati A., Vida S., Falluel I., Williams B. A., Oswald I. P. (2007). Effects of added fermentable carbohydrates in the diet on intestinal proinflammatory cytokine-specific mRNA content in weaning piglets. *J Anim Sci* 85:673-683.
- 85)Pluske J.R., Thompson M.J., Atwood C.S., Bird P.H., Williams L.H., Hartmann P.E. (1996). Maintenance of villus height and crypt depth, and enhancement of disaccharide digestion and monosaccharide absorption, in piglets fed on cows' whole milk after weaning. *Br J Nutr*76:409-422.
- 86)Pluske J. R., Pethick D. W., Mullan B. P. (1998). Differential effects of feeding fermentable carbohydrate to growing pigs on performance, gut size and slaughter characteristics. *Anim Sci* 67:147-156.
- 87)Pond W. G., Varel V. H. (1989). Comparative response of swine and rats to high-fiber or high-protein diets. *J Anim Sci* 67:716-723.
- 88)Pollmann M., Nordhoff M., Pospischil A., Tedin K., Wieler L. H. (2005). Effects of a probiotic strain of *Enterococcus faecium* on the rate of natural *Chlamydia* infection in swine. *Infect Immun* 73(7): 4346-4353.
- 89)Propst E. L., Flickinger E. A., Bauer L. L., Merchen N. R., Fahey Jr. G. C. (2003). A dose-response experiment evaluating the effects of oligofructose and inulin on nutrient digestibility, stool quality, and fecal protein catabolites in healthy adult dogs. *J Anim Sci* 81:3057-3066.
- 90)Repetto J.L., Britos A., Cozzolino D., Errandonea N., Cajarville C. (2003). Nutritive value of Lucerne and Fescue during autumn I: relationship between water soluble carbohydrates and nitrogen contents throughout the day. *Proceedings of the IX World Conference on Animal Production*. pag: 26.
- 91)Rijnen, M.; Dekker, R. A.; Bakker, G. C. M.; Verstegen, M. W. A.; Schrama, J. W. (2001). Effects of dietary fermentable carbohydrates on the empty weights of the gastrointestinal tract in growing pigs. En: Lindberg J. E., Ogle B. (eds.), *Digestive Physiology of Pigs*. CABI Publishing, Wallingford, UK, pp. 17-20.
- 92)Robertfroid M. (2007). Prebiotics: the concept revisited. *J Nutr* 137:830S-837S.
- 93)Robertson J. B., Van Soest P. J. (1981). The detergent system of analysis and its application to human foods. En: *The analysis of dietary fiber in food*. Ed. WPT James, O. Theander, M. Dekker. Nueva York.pp.123-158.
- 94)Rodríguez-Palenzuela P., García J., de Blas C. (1998). Fibra soluble y su implicación en nutrición animal: enzimas y probióticos. XIV Curso de Especialización FEDNA. *Avances en nutrición y alimentación animal*. pp. 227-240.
- 95)Rostagno, H.S.; Albino, L.F.; Donzele, J.L., Gomez P. C., de Oliveira F., Lopes D. C., Ferreira A. S., Barreto S. L. (2005). *Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais*. 2.ed. Viçosa, MG: UFV P-186.

- 96) Schrezenmeir J., de Vrese M. (2001). Probiotics, prebiotics, and synbiotics - approaching a definition. *Am J Clin Nutr* 73(suppl):361S-364S.
- 97) Schulze H., van Leeuwen P., Verstegen M. W., van den Berg J. W. (1995). Dietary level and source of neutral detergent fiber on ileal endogenous nitrogen flow in pigs. *J Anim Sci* 73:441-448.
- 98) Seifert S., Waltz B. (2007). Inulin and oligofructose: review of experimental data on immune modulation. *J Nutr* 137:2563S-2567S.
- 99) Serena A., Jørgensen H., Bach Knudsen K. E. (2009). Absorption of carbohydrate-derived nutrients in sows as influenced by types and contents of dietary fiber. *J Anim Sci* 87:136-147.
- 100) Shim, S.B., (2005). Effects of prebiotics, probiotics and synbiotics in the diet of young pigs. Ph.D. Thesis, Wageningen Institute of Animal Sciences, Wageningen University and Research Centre, Wageningen, Holanda.
- 101) Shoaf K., Mulvey G. L., Armstrong G. D., Hutkins R. W. (2006). Prebiotic galactooligosaccharides reduce adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to tissue culture cells. *Infect Immun* 74:6920-6928.
- 102) Smiricky-Tjardes M. R., Grieshop C. M., Flickinger E. A., Bauer L. L., Fahey Jr. G. C. (2003). Dietary galactooligosaccharides affect ileal and total-tract nutrient digestibility, ileal and fecal bacterial concentrations, and ileal fermentative characteristics of growing pigs. *J Anim Sci* 81:2535-2545.
- 103) Spencer J. D., Touchette K. J., Liu H., Allee G. L., Newcomb M. D., Kerley M. S., Pace L. W. (1997). Effect of spray-dried plasma and fructooligosaccharide on nursery performance and small intestinal morphology of weaned pigs. *J Anim Sci* 75 (suppl 1):199.
- 104) Sunvold G. D., Fahey Jr. G. C., Merchen N. R., Titgemeyer E. C., Bourquin L. D., Bauer L. L., Reinhart G. A. (1995). Dietary fiber for dogs: IV. In vitro fermentation of selected fiber sources by dog fecal inoculum and in vivo digestion and metabolism of fiber-supplemented diets. *J Anim Sci* 73, 1099-1109.
- 105) Swanson K., Grieshop C. M., Flickinger E. A., Bauer L., Healy H. P., Dawson K., Merchen N., Fahey, Jr. G. C. (2002). Supplemental fructooligosaccharides and mannanoligosaccharides influence immune function, ileal and total tract nutrient digestibilities, microbial populations and concentrations of protein catabolites in the large bowel of dogs. *J Nutr* 132:980-989.
- 106) Taras D., Vahjen W., Macha M., Simon O. (2006). Performance, diarrhea incidence, and occurrence of *Escherichia coli* virulence genes during long-term administration of a probiotic *Enterococcus faecium* strain to sows and piglets. *J Anim Sci* 84:608-617.
- 107) Topping D. L., Gooden J. M., Brown I. L., Biebrick D. A., McGrath L., Trimble R. P., Choct M., Illman R. J. (1997). A high amylose (amylomaize) starch

raises proximal large bowel starch and increases colon length in pigs. *J Nutr* 127: 615-622.

108) Twomey L.N., Pluske J.R., Rowe J.B. Choet M., Brown W., McConnell M.F., Pethick D.W. (2003). The effects of increasing levels of soluble non-starch polysaccharides and inclusion of feed enzymes in dog diets on faecal quality and digestibility. *Anim Feed Sci Technol* 108:71-82.

109) Van Loo, J.A. (2004). Prebiotics promote good health: the basis, the potential and the emerging evidence. *J Clin Gast* 38:70-75.

110) Van Soest P.J. (1994). Nutritional ecology of the ruminant. 2a. ed., Ithaca, Ed. Cornell University Press, 476p.

111) Vos A., M'Rabet L., Stahl B., Boehm G., Garssen J. (2007) Immuno-modulatory effects and potential working mechanisms of orally applied nondigestible carbohydrates. *Crit Rev Immunol* 27:97-140.

112) Watanabe P.E., Thomaz M.C., dos Santos Ruiz U., dos Santos V.M., Fraga A.L., Fonseca Pascoal L.A., Zaneti da Silva S., Gonzáles de Faria H. (2010). Effect of inclusion of citrus pulp in the diet of finishing swines. *Braz Arch Biol Technol* 53:709-718.

113) Weber T. E, Schinckel A. P., Houseknecht K. L., Richert B. T.. (2001). Evaluation of conjugated linoleic acid and dietary antibiotics as growth promotants in weanling pigs. *J Anim Sci* 79:2542-2549.

114) Weber T. E., Ziemer C. J., Kerr B. J. (2008). Effects of adding fibrous feedstuffs to the diet of young pigs on growth performance, intestinal cytokines, and circulating acute-phase proteins. *J Anim Sci* 86:871-881.

115) Weickert M. O., Pfeiffer A. F. H. (2008). Metabolic effects of dietary fiber consumption and prevention of diabetes. *J Nutr* 138:439-442.

116) Wenk C. (2007). Secondary effects of dietary fibre in the nutrition of monogastric animals. En: 6. BOKU-Symposium Tierernährung, Eds. Plitzner C., Kraft M., Windisch W. M., Viena, Cap. 2 pp.10-24.

117) Williams B. A., Bosch M. W., Boer H., Verstegen M. W. A., Tamminga S. (2005). An in vitro batch culture method to assess potential fermentability of feed ingredients for monogastric diets. *Anim Feed Sci Technol* 123-124: 445-462.

118) Williams B. A., Verstegen M. W. A., Tamminga S. (2001). Fermentation in the large intestine of single-stomached animals and its relationship to animal health. *Nutr Research Reviews* 14:207-227.

119) Wyatt G. M., Horn N., Gee J. M., Johnson I. T. (1988). Intestinal microflora and gastrointestinal adaptation in the rat in response to non-digestible dietary polysaccharides. *Brit J Nutr* 60:197-207.

120) Tunland B. C., Meyer D. (2002). Nondigestible oligo- and polysaccharides (dietary fibre): their physiology and role in human health and food. *Compr Rev Food Sci Food Safety* 1:74–92.

121) Zervas S., Zijlstra R. T. (2002). Effects of dietary protein and fermentable fiber on nitrogen excretion patterns and plasma urea in grower pigs. *J Anim Sci* 80: 3247-3256.



## ANEXO

Sebastián Brambillasca; Pablo Zunino; Cecilia Cajarville. Addition of inulin, alfalfa and citrus pulp in diets for piglets: Effects on nutritional and faecal parameters, digestive tract weight and colonic bacterial populations.

Artículo enviado a la Revista Brasileira de Zootecnia

*“Los papers no son la ciencia, y mucho menos LA VERDAD. Más bien son ejercicios que practican los científicos para convencer a los otros de lo importante que son las cosas que ellos hacen.”*

Pablo Kreimer

**Addition of inulin, alfalfa and citrus pulp in diets for piglets: Effects on nutritional and faecal parameters, digestive tract weight and colonic bacterial populations.<sup>1</sup>**

**Sebastián Brambillasca<sup>2</sup>; Pablo Zunino<sup>3</sup>; Cecilia Cajarville<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Project supported by Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC), UdelaR.

<sup>2</sup>Departamento de Nutrición Animal, Facultad de Veterinaria, UdelaR, Montevideo, Uruguay.

<sup>3</sup>Departamento de Microbiología, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, MEC, Montevideo, Uruguay.

Corresponding author: [ccajarville@gmail.com](mailto:ccajarville@gmail.com)

## ABSTRACT

The effect of the inclusion of inulin, alfalfa, and citrus pulp in diets for piglets on growth performance, nutritional and faecal parameters, digestive tract size and colonic microbial populations was evaluated. Twenty-four cross-breed piglets (initial BW:  $9.75 \pm 1.63$  kg) in a randomized complete block design were housed in metabolic cages and assigned to one of 4 treatments: 100% corn and soybean meal control diet (CON), 97% CON+3% inulin (INU), 95.5% CON+4.5% fresh alfalfa (ALF) and 95.5% CON+4.5% fresh citrus pulp (CIT). The experiment consisted of a 12 d adaptation period followed by 11 d for samples collection. During the last 2 days of the experiment all animals were euthanized, the digestive tract of each animal was removed and an individual sample of colonic digesta was collected. Intake, growth performance, digestibility of nutrients, N balance, faecal characteristics, weight of digestive organs and colonic bacteria populations were measured. Data were analyzed by a mixed procedure considering treatment effect and means were separated by orthogonal contrasts. Fibre sources did not modify animal performance, development of digestive tract organs nor colonic microbial populations. However, fibre inclusion led to lower protein digestibility, N retention and softens faecal consistency. It is concluded that these fibre sources at these levels of inclusion do not generate clearly beneficent effects in piglets.

Key words: dietary fibre, nitrogen balance, gastrointestinal tract, microbiota, swine.

## Introduction

Dietary fibre is composed by the sum of polysaccharides and lignin that escape the enzymatic digestion of the host animal and include resistant starch, soluble and insoluble fibre and lignin (Metzler & Mosenthin, 2008). The inclusion of small quantities of fermentable dietary fibre in the diet of monogastrics enhance the production of lactate and short chain fatty acids (SCFA) in the gut, and these microbial by-products are capable of inhibiting the growth of intestinal pathogens such as *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. and *Clostridium* spp. (Montagne et al., 2003; Bindelle et al., 2008). Fibre sources included in the diet of growing pigs can be related to the growth in weight and length of the gut (Len et al., 2009), alter the passage rate of digesta and may have further undesirable implications diminishing feed consumption, daily gain and digestibility of nutrients (Owusu-Asiedu et al., 2006). Moreover, the inclusion of fibrous ingredients in the diet of pigs may produce a shift in N excretion from urine to faeces as a consequence of microbial protein synthesis in the hindgut and thus, a reduction in ammonia emissions (Outor-Monteiro et al., 2010).

Citrus pulp and alfalfa are fibrous sources with different fibre characteristics. Citrus pulp is rich in pectins (Bampidis & Robinson, 2006), fraction that compose soluble fibre that is rapidly fermented by hindgut microbiota of monogastrics. This by-product can be included in levels up to 10% in the diets of finishing pigs without affecting daily gain (Watanabe et al., 2010). Alfalfa is rich in insoluble fibre (cellulose) but also has in its composition fructans and up to 13% of pectins (Jung & Lamb, 2004). This forage is widely fermented in the hindgut of pigs, and SCFA produced by its fermentation can provide up to 14% of the daily energy requirements for maintenance (Kass et al., 1980). Both fibre sources may have prebiotic activity (fermentable ingredients that benefits the host through their selective metabolism in

the intestinal tract) and can serve as substrates for endogenous colonic bacteria and provide metabolic substrates to the consumer.

So, our hypothesis was that fresh citrus pulp and alfalfa may have similar biological activity than inulin, a commercial and known prebiotic. The aims of this study were to evaluate the inclusion in the diet of piglets of two fibre feedstuffs of different fibre characteristics (alfalfa and citrus pulp) and a prebiotic (inulin) on 1) growth performance and faecal characteristics; 2) digestibility of nutrients and N balance; and 3) GIT size and colonic microbial populations in piglets.

### **Materials and Methods**

All procedures were approved by the Bioethics Committee of the Veterinary Faculty (UdelaR). Twenty-four castrated crossbreed male piglets (Landrace x Large White) of 45 days of age (initial BW  $9.75 \pm 1.63$  kg; final BW  $18.77 \pm 2.68$ ) were individually allocated in metabolism crates (0.9 x 1.20 m). Animals were blocked by weight and assigned to one of four treatments (Table 1): a control diet based in corn and soybean-meal (CON), 97% CON plus 3% inulin (INU), 95.5% CON plus 4.5% alfalfa (ALF) and 95.5% CON plus 4.5% citrus pulp (CIT). The CON feed was formulated following the nutritional recommendations proposed by FEDNA (2006). All additives were added to the feed prior feeding and on dry matter basis. Alfalfa and citrus pulp were used chopped and fresh. The experiment consisted in a 12-day adaptation phase period followed by an 11-day sampling period. Animals had free access to diets and fresh water throughout the experiment.

Table 1. Ingredient and chemical composition of experimental diets.

	CON	INU	ALF	CIT
Corn	521	506	498	498
Soybean meal	401	389	383	383
Olein	25	243	24	24
Dicalcium phosphate	15	15	14	14
Calcium carbonate	12	12	12	12
Salt	20	19	19	19
Vitamin-Mineral mix <sup>(1)</sup>	3	3	3	33
L-Lysine	3	2	2	2
DL-Methionine	1	1	1	1
Inulin <sup>(2)</sup>	-	30	-	-
Alfalfa	-	-	45.5	-
Citrus pulp	-	-	-	45.5
Dry matter (DM)	891.7	891.7	775.0	741.7
Ash	84.1	71.4	76.2	71.7
Organic matter (OM)	915.9	928.6	923.8	928.3
Crude protein (CP)	222.3	192.3	191.1	183.5
Neutral detergent fibre (NDF)	125.3	135.9	156.6	145.1
Acid detergent fibre (ADF)	37.7	41.3	54.4	49.1
Hemicelluloses (Hemic)	87.7	94.6	102.2	96.0
Ether extract (EE)	63.4	72.7	69.8	71.8
Metabolizable energy, kcal/kg <sup>(3)</sup>	3623.4	3636.8	3558.1	3624.9
WHC <sup>(4)</sup> , g water/g dry feed	0.99	1.29	1.15	1.54

<sup>(1)</sup> Composition by kg of product: Vit. A, 3,000,000 IU; Vit. D3, 400,000 IU; Vit. E, 4 IU; Vit. B1, 400 mg; Vit. B2, 700 mg; pantothenic acid, 3g; Vit. B6, 600 mg; Vit. B12, 6 mg; nicotinic acid, 3 g; Vit. K3, 0.2 g; biotin, 20 mg; choline, 36.8 g; antioxidant, 24 g; Mg, 50 g; Cu, 3.7 g; Co, 0.15 g; Zn, 36.8 g; Mn, 3.7 g; Fe, 15g; Se, 20 mg; I, 200 mg.

<sup>(2)</sup> Frutafit HD, Saporiti (average chain length:  $\geq 9$  monomers).

<sup>(3)</sup> Calculated according to Rostagno et al. (2005).

<sup>(4)</sup> Water-holding capacity by filtration according to Kyriazakis & Emmans (1995).

Body weight of animals was measured the first day of the adaptation phase and the first and last day of the sampling period (day 11 and day 23 respectively). Feed intake was quantified the first 7 days of the sampling period, whereas all faeces and urine voided from day 12 until day 16 were collected. Faeces were weighed, sub-sampled and frozen (-20°C) until analysis for total tract digestibility of nutrients.

Urine volume was measured and 25 mL of 6N HCl was added to the container to prevent volatilization of urinary N. On day 14 faecal pH was measured individually and immediately after defecation with a digital pH meter (eChem Instruments Pte. Ltd., Oakton, Singapore) diluting 1 g of faeces in 10 mL of distilled water. On day 14 and 15 faecal consistency was scored in fresh faeces using a scale from 1 (firm stools) to 4 (watery stools) as described by Freitas et al. (2006). The last two days of the experiment (day 22 and 23) after a fasting period of 3 h, all animals were desensitized by cranial trauma and bleeding euthanized. The gastrointestinal tract (GIT) of each animal was removed and its segments (stomach, duodenum, jejunum-ileum, caecum and colon) were weighed empty of contents. An individual sample of colonic digesta was also collected and processed immediately for bacterial culture.

Diets and faecal samples were dried at 60°C for 48 h to determine dry matter (DM), individual faecal samples were pooled, and diets and faecal pools were then ground using a 1 mm screen. Diets and faecal pooled samples were analysed for organic matter (OM) and crude protein (CP) (AOAC, 1990, ID 942.05 and 984.13 respectively). Neutral detergent fibre (NDF) and acid detergent fibre (ADF) were determined according to Robertson & Van Soest (1981) in an ANKOM<sub>220</sub> fibre analyser (Ankom Technology Corp., Fairport, NY, USA) with NDF and ADF assayed sequentially with a heat stable amylase and expressed inclusive of residual ash. Hemicelluloses (Hemic) were calculated as the difference between NDF and ADF. The ether extract (EE) fraction was determined extracting the fat with petroleum ether for 4 h using a Goldfish fat extractor (Labconco Corp., Kansas City, MO, USA). The water-holding capacity (WHC) of feeds was determined using the filtration method described by Kyriazakis & Emmans (1995). Coefficient of total

tract apparent digestibility was calculated as: [nutrient intake (g/d) – faecal nutrient output (g/d)] / nutrient intake (g/d)].

For bacterial counts, 1 g of colonic digesta from each animal was homogenized in 10 mL of sterile PBS containing 0.5 g/L of cysteine using a Stomacher blender (Seward, UK). Serial dilutions were performed ( $10^{-2}$  to  $10^{-9}$ ) for enumeration of colony-forming units (CFU) on plates of the different culture media. MacConkey agar (Merck, Darmstadt, Germany) was used for coliform enumeration, lactic acid bacteria were cultivated on de Mann, Rogosa and Sharpe (MRS) agar (Merck, Darmstadt, Germany) and total aerobic mesophilic bacteria were grown on Trypticase Soy Agar (Difco, Inc., Detroit, USA). Each dilution was determined in triplicate and the numbers of bacteria were expressed as  $\log_{10}$  CFU per gram of fresh faeces. Cultures were incubated at 37°C for 48 h. Cultures on MRS agar were grown under microaerophilic conditions while MacConkey and TSA plates were incubated aerobically.

Data for growth performance, faecal characteristics, apparent digestibility, N balance and weights of digestive segments were analysed using the MIXED procedure of SAS (version 9.0) by the model:  $Y_{ijk} = \mu + T_i + B_j + e_{ijk}$ , where  $Y_{ijk}$  is the effect of  $i$  treatment ( $i = \text{CON, INU, ALF, CIT}$ ), in  $k$  animal replicate ( $k = 6$  pigs),  $\mu$  is the overall mean,  $T_i$  the fixed effect of the treatment ( $n=4$ ),  $B_j$  the random effect of BW block ( $n=6$ ), and  $e_{ijk}$  the residual error. Comparisons between means were done by orthogonal contrasts. Contrasts used were: C1 = CON vs diets with fibre sources added; C2 = INU vs diets containing alfalfa or citrus pulp; C3 = ALF vs CP. Faecal microbial populations had heterogeneous variances, even after logarithmic transformation. Therefore, median, minimum and maximum values are reported, and data was analysed for diet effect using Kruskal-Wallis nonparametric analysis of



variance by the NPARIWAY procedure of SAS. Differences among means with  $P < 0.05$  were accepted as representing statistically significant differences.

## **Results and Discussion**

Intake, growth performance, digestibility of nutrients and faecal characteristics are presented in Table 2. Fibre inclusion in the diets did affect neither daily DM consumption nor growth performance parameters. Fibre may have diverse implications on intake and growth of pigs. Lee et al., (2002) reported that fibre may reduce the energy content of feed creating an incentive to raise feed consumption in order to maintain the intake of energy. Otherwise, the bulking capacity of dietary fibre can lead to a state of satiety reducing the intake of food (Kyriazakis & Emmans, 1995). In the present study it seems that fibre levels used were not high enough to influence the intake and growth performance parameters, and these effects of fibre on intake and performance variables are not observed if fibre sources are included in the diet in levels below 10% (Weber et al., 2008).

Despite poorly digestible fractions (NDF, ADF and hemicelluloses) in this work were higher in the fibre supplemented diets in comparison with control (Table 1) apparent digestibilities of DM, OM, fibrous fractions and EE of the experimental diets were not affected by the fibre inclusion (Table 2). The effect of fibre on digestibility was only observed for the CP fraction ( $P < 0.05$ ). The reduction on CP digestibility could be due either to a shorter transit time in the GIT and time of exposure of the bolus to host's digestive enzymes (Bindelle et al., 2008), an enhanced excretion of nutrients bound in the bulk of the bolus of the fibrous digesta, or a higher endogenous loss of nutrients associated with the microbial mass excreted in faeces (Andersson & Lindberg, 1997).

Table 2. Effect of the inclusion of additives in the diet on growth performance, apparent digestibility and faecal characteristics in piglets.

	Treatment <sup>(1)</sup>				SEM <sup>(2)</sup>	Contrast <sup>(3)</sup> (P – value)		
	CON	INU	ALF	CIT		C1	C2	C3
<i>Growth performance</i>								
Intake, g DM/d	725.9	660.0	630.1	715.4	57.65	0.399	0.859	0.308
Intake, g DM/kg BW	42.9	40.8	38.6	46.7	4.29	0.849	0.719	0.175
ADG, g	438.7	337.3	401.7	385.0	79.50	0.447	0.550	0.874
G:F, g/g	0.54	0.43	0.51	0.45	0.095	0.409	0.685	0.622
<i>Apparent total tract digestibility <sup>(4)</sup></i>								
DM	0.852	0.837	0.833	0.838	0.016	0.372	0.949	0.833
OM	0.860	0.846	0.842	0.847	0.015	0.370	0.930	0.816
CP	0.855	0.807	0.794	0.800	0.020	0.024	0.663	0.801
NDF	0.698	0.666	0.713	0.696	0.036	0.889	0.396	0.737
ADF	0.626	0.580	0.658	0.648	0.047	0.961	0.219	0.886
EE	0.615	0.669	0.580	0.650	0.036	0.572	0.231	0.104
<i>Faecal characteristics</i>								
Wet faecal output, g/d	331.6	364.6	442.7	464.1	57.41	0.088	0.118	0.735
Faecal DM	0.31	0.29	0.24	0.24	0.026	0.031	0.057	0.979
Consistency <sup>(5)</sup>	1.57	1.97	2.21	2.11	0.325	0.041	0.460	0.732
Faecal pH	6.03	6.03	6.38	6.17	0.130	0.307	0.134	0.281

<sup>(1)</sup> Treatment: CON = corn–soybean meal based control diet; INU = CON plus 3% inulin; ALF = CON plus 4.5% fresh alfalfa; CIT = CON plus 4.5% fresh citrus pulp.

<sup>(2)</sup> Standard error of means (n = 6/treatment).

<sup>(3)</sup> Contrast: C1 = CON vs. fibre inclusion; C2 = INU vs. (ALF + CIT); C3 = ALF vs. CIT.

<sup>(4)</sup> Apparent digestibility: DM = dry matter; OM = organic matter; CP= crude protein; NDF = neutral detergent fibre; ADF: acid detergent fibre; EE: ether extract.

<sup>(5)</sup> Faecal consistency score: 1 (firm faeces) to 4 (watery faeces).

Wet faecal output among treatments were not different ( $P>0.05$ ). However, dry matter content in faeces were lower and faeces were soften in the groups supplemented with additives ( $P<0.05$ ). No differences were observed among fibre sources for these parameters. This is consistent with that fibre inclusion in the diet contribute to the WHC of faecal matter and hence diminish the DM content of faeces (Fahey et al., 1992) and lead to softer stools consistency (Twomey et al., 2003). Faecal pH values were not affected by treatments (Table 2). The inclusion of

fermentable fibre in the diet results in the accumulation of acidic fermentation end-products (lactate, SCFA) in the gut and hence the luminal and faecal pH falls (Twomey et al., 2003). Maybe in our study the inclusion of fibre sources was not high enough to affect faecal pH, or organic acids produced were promptly and completely absorbed in the hindgut leading in an unchanged pH in the faeces as observed by Houdijk et al., (1998).

Treatments did not affect the empty weight of the GIT organs (Table 3). It has been previously reported by Len et al., (2009) that pigs feed diets containing high levels (inclusion levels=250 g/kg; NDF=17%) of different fibre sources (rice bran, sweet potato vine meal or cassava residue) had heavier GIT than those given a low fibre diet (NDF=9%). The same authors also suggest that the length of time pigs are fed a high fibre diet is also important respect to trophic effects on the GIT. Our results are indicative that citrus pulp and alfalfa included at a 45.5 g/kg in the diet, in an experimental period of 23 days do not affect the weight of the GIT organs.

Table 3. Effect of the inclusion of additives in the diet on the relative weight (g/kg BW) of the empty digestive segments of piglets.

	Treatment <sup>(1)</sup>				SEM <sup>(2)</sup>	Contrast <sup>(3)</sup> (P – value)		
	CON	INU	ALF	CIT		C1	C2	C3
Stomach	0.93	0.89	0.95	0.96	0.045	0.892	0.275	0.904
Duodenum	0.08	0.09	0.11	0.11	0.013	0.113	0.203	0.927
Jejunum-ileum	3.87	3.70	4.08	3.90	0.216	0.907	0.244	0.546
Caecum	0.32	0.28	0.33	0.29	0.030	0.591	0.451	0.390
Colon	1.62	1.80	1.58	1.69	0.095	0.473	0.116	0.377
Small intestine	3.95	3.79	4.19	4.02	0.225	0.832	0.239	0.565
Large intestine	1.94	2.08	1.91	1.98	0.109	0.643	0.242	0.609
GIT	6.81	6.76	7.05	6.95	0.310	0.743	0.504	0.810

<sup>(1)</sup> Treatment: CON = corn–soybean meal based control diet; INU = CON plus 3% inulin; ALF = CON plus 4.5% fresh alfalfa; CIT = CON plus 4.5% fresh citrus pulp.

<sup>(2)</sup> Standard error of means (n = 6/treatment).

<sup>(3)</sup> Contrast: C1 = CON vs. fibre inclusion; C2 = INU vs. (ALF + CIT); C3 = ALF vs. CIT.

Concerning the N balance parameters (Table 4), animals fed CON presented a higher N intake ( $P < 0.05$ ) but faecal N output was similar among treatments. The reduced N intake in the fibre supplemented diets was compensated by a reduction in the digestibility of CP ( $N \times 6.25$ ) for these treatments, resulting in similar faecal N excretion (Zervas & Siljstra, 2002). Animals fed the control diet retained more N and utilized it more efficiently ( $P < 0.05$ ). Alfalfa supplemented animals showed the highest N urinary output and the lowest N utilization. Fermentable carbohydrates have been reported to produce a shift in N output from urine to faeces (Cahn et al., 1997) due to N is retained in the large intestine for bacterial proteins synthesis and as a consequence N transfer to blood and finally excreted in urine is decreased (Bindelle et al., 2008). However, this effect could not be detected in our work, and conversely, the inclusion of fibre produced a negative effect on N metabolism.

Table 4. Effect of fibre inclusion in the diet on N balance in piglets.

	Treatment <sup>(1)</sup>				SEM <sup>(2)</sup>	Contrast <sup>(3)</sup> (P – value)		
	CON	INU	ALF	CIT		C1	C2	C3
N intake, g/d	24.13	19.76	18.61	19.49	1.848	0.035	0.758	0.740
Faecal N output, g/d	3.51	4.29	3.76	3.73	0.502	0.439	0.343	0.970
Urinary N output, g/d	1.95	1.79	3.96	1.98	0.548	0.334	0.094	0.019
N retention, g/d	18.67	13.68	10.90	13.78	1.774	0.009	0.544	0.263
N utilization, %	77.13	74.08	56.99	69.83	4.028	0.023	0.033	0.019

<sup>(1)</sup> Treatment: CON = corn–soybean meal based control diet; INU = CON plus 3% inulin; ALF = CON plus 4.5% fresh alfalfa; CIT = CON plus 4.5% fresh citrus pulp.

<sup>(2)</sup> Standard error of means (n = 6/treatment).

<sup>(3)</sup> Contrast: C1 = CON vs. fibre inclusion; C2 = INU vs. (ALF + CIT); C3 = ALF vs. CIT.

Differences in the assessed colonic microbial populations were not detected with the inclusion of fibre sources in the experimental diets used here (Table 5). Depletion in the number of intestinal potential pathogens (i.e. coliforms, *C. perfringens*) has been described with the inclusion of oligosaccharides (Liu et al.,

2008) and pectins from citrus (Biagi et al., 2010). Recently, Cerisuelo et al. (2010) reported that the inclusion of ensiled citrus pulp in the diet of growing pigs in levels of 5 or 10% in the diet reduced the enterobacteria count in faeces in comparison with the control diet, effect that could be due to an enhance in the hindgut fermentation with the consequent increase of lactate and SCFA. It seems that fibre sources at the levels used here did not change selectively the hindgut microbial population, and that each individual pig harbours its own specific and unique bacterial composition even when receiving the same diet (Metzler & Mosenthin, 2008). Further investigation using molecular techniques can help to clarify the impact of citrus pulp and alfalfa addition in the diet to modulate the swine microbial populations.

Table 5. Effect of fibre inclusion in the diet on colonic microbial populations <sup>(1)</sup> of piglets

	Treatment <sup>(2)</sup>				P <sup>(3)</sup>
	CON	INU	ALF	CIT	
<i>Colonic bacteria, log<sub>10</sub> CFU/g wet digesta</i>					
Coliforms	7.65 (7.26-9.81)	7.49 (6.87-8.63)	8.03 (6.69-9.21)	7.33 (6.55-8.06)	0.344
Lactic acid bacteria	8.73 (7.31-9.45)	8.60 (7.16-9.32)	8.94 (7.40-9.41)	8.45 (7.83-8.75)	0.411
Total aerobes	8.98 (7.39-9.89)	8.90 (7.18-9.95)	9.23 (8.01-9.51)	8.08 (7.41-9.00)	0.312

<sup>(1)</sup>Median values for each treatment are reported. The minimum and maximum values are shown in parenthesis.

<sup>(2)</sup>Treatment: CON = corn–soybean meal based control diet; INU = CON plus 3% inulin; ALF = CON plus 4.5% fresh alfalfa; CIT = CON plus 4.5% fresh citrus pulp.

<sup>(3)</sup>P: probability of diet effect as determined by Kruskal-Wallis test.

## Conclusions

The inclusion of inulin, alfalfa and citrus pulp are not associated with beneficial effects on neither GIT development nor colonic microbial populations. The depression of CP digestibility and N retention, as well as the increase of faecal

output and softness indicate that these fibre sources at these levels of inclusion are not recommended in piglets.

### **Aknowlegments**

Authors gratefully thank ANII (Agencia Nacional de Investigación e Innovación) for the scholarship of the first author; and Karina Cabrera, Melina Hernández, Eduardo Menezes, Florencia Pieruccioni, Elena Reyes, Lucía Rivero, Raúl Zinola, Analía Pérez-Ruchel, Alvaro Santana and Alejandro Bielli for their help in field work.

### **References**

ANDERSSON C.; LINDBERG, J.E. Forages in diets for growing pigs 1. Nutrient apparent digestibilities and partition of nutrient digestion in barley-based diets including lucerne and white-clover meal. **Animal Science**, v.65, p.483–491, 1997.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMIST – AOAC. **Official methods of analysis**. 15.ed. Arlington, 1990. 1230p.

BAMPIDIS, B.A.; ROBINSON, P.H. Citrus by-products as ruminant feeds: A review. **Animal Feed Science and Technology**, v.128, p175–217, 2006.

BIAGI, G.; CIPOLLINI, I.; GRANDI, M. et al. Influence of some potential prebiotics and fibre-rich foodstuffs on composition and activity of canine intestinal microbiota. **Animal Feed Science and Technology**, v.159, p.50–58, 2010.

BINDELLE, J.; BULDGEN, A.; LETERME, P. Nutritional and environmental consequences of dietary fibre in pig nutrition: a review. **Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement**, v.12, n,1, p.69–80, 2008.

CANH, T.T.; VERSTEGEN, M.W.; AARNINK, A.J. et al. Influence of dietary factors on nitrogen partitioning and composition of urine and feces of fattening pigs. **Journal of Animal Science**, v.75, p.700–706, 1997.

CERISUELO, A.; CASTELLÓ L.; MOSET, V.; et al. The inclusion of ensiled citrus pulp in diets for growing pigs: Effects on voluntary intake, growth performance, gut microbiology and meat quality. **Livestock Science**, v.134, p. 180–182, 2010.

FAHEY, JR, G.C.; MEWHEN, N.R.; CORBIN, J.E., et al. Dietary fiber for dogs: III. Effects of beet pulp oat fiber additions to dog diets on nutrient intake, digestibility, metabolizable energy, and digesta mean retention time. **Journal of Animal Science**, v.70, p.1169–1174, 1992.

FREITAS, L.S.; LOPES, D.C.; FREITAS, A.F. et al. Avaliação de ácidos orgânicos em dietas para leitões de 21 a 49 dias de idade. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, n.4, p.1711–1719, 2006.

FUNDACIÓN ESPAÑOLA PARA EL DESARROLLO DE LA NUTRICIÓN ANIMAL – FEDNA. **Necesidades nutricionales para ganado porcino**. Normas FEDNA. de Blas, C.; Gasa, J.; and Mateos, G.G. (Eds.). Madrid, 2006. 60p.

HOUDIJK, J.G.; BOSCH, M.W.; VERSTEGEN, M.W. et al. Effects of dietary oligosaccharides on the growth performance and faecal characteristics of young growing pigs. **Animal Feed Science Technology**, v.71, p.35–48, 1998.

JUNG, H.J.G.; LAMB, J.F.S. Prediction of cell wall polysaccharide and lignin concentrations of alfalfa stems from detergent fiber analysis. **Biomass and Bioenergy**, v.27, p.365 – 373, 2004.

KASS, M.L.; VAN SOEST, P.J.; POND, W.G. Utilization of dietary fiber from alfalfa by growing swine. II. Volatile fatty acid concentrations in and

disappearance from the gastrointestinal tract. **Journal of Animal Science**, v.50, p.192–197, 1980.

KYRIAZAKIS, I.; EMMANS, G.C. The voluntary feed intake of pigs given feeds based on wheat bran, dried citrus pulp and grass meal, in relation to measurements of feed bulk. **British Journal of Nutrition**, v.73, 191–207, 1995.

LEE, C.Y.; LEE, H.P.; JEONG J.H. et al. Effects of restricted feeding, low-energy diet, and implantation of trenbolone acetate plus estradiol on growth, carcass traits, and circulating concentrations of insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF-binding protein-3 in finishing barrows. **Journal of Animal Science**, v.80, 84–93, 2002.

LEN, N.T.; HONG, T.T.T.; OGLE, B. et al. Comparison of total tract digestibility, development of visceral organs and digestive tract of Mong cai and Yorkshire x Landrace piglets fed diets with different fibre sources. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v.93, p.181–191, 2009.

LIU, P; PIAO, X.S.; KIM, S.W. et al. Effects of chito-oligosaccharide supplementation on the growth performance, nutrient digestibility, intestinal morphology, and fecal shedding of *Escherichia coli* and *Lactobacillus* in weaning pigs. **Journal of Animal Science**, v.86, p.2609–2618, 2008.

METZLER, B.U.; MOSENTHIN, R. A review of interactions between dietary fiber and the gastrointestinal microbiota and their consequences on intestinal phosphorus metabolism in growing pigs. **Asian – Australasian Journal of Animal Science**, v.21, n.4, p.603–615, 2008.

MONTAGNE, L.; PLUSKE, J.R.; HAMPSON, D.J. A review of interactions between dietary fibre and the intestinal mucosa, and their consequences on digestive



health in young non-ruminant animals. **Animal Feed Science and Technology**, v.108, p.95–117, 2003.

OUTOR-MONTEIRO, D.; PINHEIRO, V.M.; MOURÃO, J.L. et al. Strategies for mitigation of nitrogen environmental impact from swine production. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, p.317–325, 2010.

OWUSU-ASIEDU, A.; PATIENCE, J.F.; LAARVELD, B. et al. Effects of guar gum and cellulose on digesta passage rate, ileal microbial populations, energy and protein digestibility, and performance of grower pigs. **Journal of Animal Science**, v.84, p.843–852, 2006.

ROBERTSON J. B., VAN SOEST P. J. The detergent system of analysis and its application to human foods. In: JAMES, W.P.T., THEANDER, O.; DEKKER, M. (Eds.): **The analysis of dietary fiber in food**. Ed. New York, p:123–158, 1981.

ROSTAGNO, R.S.; ALBINO, L.F.T.; DONZELE, J.L. et al. **Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais**. 2.ed. Viçosa, MG: UFV, 2005. 186p.

TWOMEY, L.N.; PLUSKE, J.R.; ROWE, J.B. et al. The effects of increasing levels of soluble non-starch polysaccharides and inclusion of feed enzymes in dog diets on faecal quality and digestibility. **Animal Feed Science and Technology**, v.108, p.71–82, 2003.

WATANABE, P.H.; THOMAZ, M.C.; RUIZ, U.D. et al. Effect of inclusion of citrus pulp in the diet of finishing swines. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.53, p. 709–718, 2010.

WEBER, T.E.; ZIEMER, C.J.; KERR, B.J. Effects of adding fibrous feedstuffs to the diet of young pigs on growth performance, intestinal cytokines, and circulating acute-phase proteins. **Journal of Animal Science**, v.86, p.871–881, 2008.

ZERVAS, S.; ZIJLSTRA R.T. Effects of dietary protein and fermentable fiber on nitrogen excretion patterns and plasma urea in grower pigs. **Journal of Animal Science**, v.80, p.3247–3256, 2002.