



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
GANADERÍA

PROBIÓTICO FECINOR (*Enterococcus faecium*) ADICIONADO
A DIETAS ESTÁNDAR Y CON BAJA PROTEÍNA PARA CERDOS
EN ENGORDA

IVÁN REYES VÁZQUEZ

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

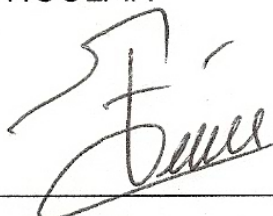
2010

**PROBIÓTICO FECINOR (*Enterococcus faecium*) ADICIONADO A DIETAS
ESTÁNDAR Y CON BAJA PROTEÍNA PARA CERDOS EN ENGORDA**

La presente tesis, titulada: **Probiótico Fecinor (*Enterococcus faecium*) adicionado a dietas estándar y con baja proteína para cerdos en engorda**, realizada por el alumno: **Iván Reyes Vázquez**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

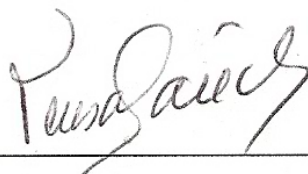
MAESTRO EN CIENCIAS
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
GANADERÍA
CONSEJO PARTICULAR

Consejero:



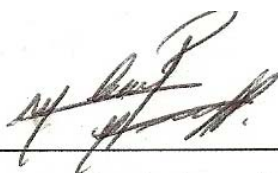
Dr. José Luis Figueroa Velasco

Asesor:



Dr. Maria Teresa Sánchez-Torres Esqueda

Asesor:



Dr. Mario Antonio Cobos Peralta

Asesor:



Dr. José Ma. Fernando Copado Bueno

Montecillo, Texcoco, Edo. de México, Enero de 2010.

AGRADECIMIENTOS

Al Colegio de Postgraduados, en especial al programa de Recursos Genéticos y Productividad - Ganadería por el conocimiento académico brindado para mi formación profesional.

Al CONACYT, por el apoyo económico que me brindó, sin este apoyo no hubiera sido posible el desarrollo de esta Maestría.

Al Dr. José Luís Figueroa Velasco, por darme la oportunidad de ingresar a este programa, por el apoyo, las enseñanzas y sus consejos durante mi estancia en el Colegio de Postgraduados.

Al Dr. Mario Antonio Cobos Peralta por su esfuerzo y dedicación en la realización de la fase de laboratorio y sus aportaciones para mejorar este trabajo de tesis.

A la Dra. María Teresa Sánchez-Torres, por sus observaciones y sugerencias para mejorar este trabajo de tesis.

Al MVZ José Luís Cordero Mora, por sus conocimientos, consejos y colaboración durante la fase de campo en el trabajo de investigación.

Al Dr. José Ma. Fernando Copado Bueno, por sus correcciones aportadas en el mejoramiento de este trabajo de tesis.

Al M.C. Vicente Zamora Zamora por sus recomendaciones, enseñanzas y aportaciones para la realización de este trabajo.

Al personal de laboratorio de Nutrición Animal y de Microbiología del Colegio de Postgraduados por su apoyo para llevar a cabo los análisis correspondientes a este trabajo de investigación.

Gracias a todos...

Iván Reyes Vázquez

DEDICATORIA

A Dios y a mi virgencita Natividad de María por darme vida y salud para seguir adelante con mis metas y guiarme siempre por un buen camino.

A mis padres: **Armando Reyes y Federica Vázquez**, por su amor, cariño, esfuerzo y la dedicación en mi formación profesional, son los mejores padres del mundo y gracias a ellos he cumplido mis metas... *LOS AMO...*

A mi hermana **Lucila Reyes Vázquez**, por el apoyo que siempre me ha brindado y sus consejos de seguir adelante siempre.

A toda la familia Reyes Vázquez, estaremos unidos siempre.

A Ethel por su amor, paciencia y cariño durante todo este largo camino que hemos recorrido juntos.

A la familia Pérez Méndez por su apoyo incondicional.

A todos los colegas del Colegio de Postgraduados, especialmente a Edy, Zamora, Aispuro, Rafael, Jaime Azael, Moisés, Nestor Jorge y a los que olvide por mencionar, gracias por su amistad y apoyo.

Sinceramente...

Iván Reyes Vázquez

CONTENIDO

INDICE DE CUADROS	v
INDICE DE FIGURAS	vii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	viii
RESUMEN	ix
ABSTRACT	x
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1. PROTEÍNA IDEAL	3
2.1.1. Aplicaciones prácticas de la proteína ideal	3
2.2. DIETAS BAJAS EN PROTEÍNA	5
2.2.1. Uso de sorgo y pasta de soya en dietas para cerdos	6
2.2.2. Reducción del nivel proteico	7
2.2.3. Comportamiento productivo de cerdos alimentados con dietas bajas en proteína.....	7
2.2.4. Urea en plasma de cerdos alimentados con dietas con baja proteína	9
2.2.5. Beneficios al medio ambiente al usar dietas bajas en proteína.....	9
2.3. PROBIOTICOS	11
2.3.1. Aditivos en la nutrición de cerdos.....	11
2.3.1.1. Alternativas a los antibióticos	11
2.3.2. Alimentos funcionales	13
2.3.2.1. Probióticos	14
2.3.2.1.1. Definición	15
2.3.2.1.2. Clasificación y características de los probióticos	16
2.3.2.1.3. Mecanismo de acción de los probióticos.....	18
2.3.2.1.4. Importancia del equilibrio de la microflora intestinal.....	23
2.3.2.2. Prebióticos	27
2.3.2.3. Simbióticos.....	29
2.3.3. Probióticos de la especie <i>Enterococcus faecium</i>	30
2.3.3.1. Características y uso de una cepa de <i>Enterococcus faecium</i>	32
2.3.3.2. Uso de <i>Enterococcus faecium</i> en la alimentación animal	33
III. JUSTIFICACIÓN	38
IV. OBJETIVO	39
V. HIPÓTESIS.....	39
VI. MATERIALES Y MÉTODOS.....	40
6.1. Tratamientos evaluados	40
6.2. Variables evaluadas	40
6.3. Material experimental y manejo de los animales	41
6.4. Análisis de laboratorio	45
6.4.1. Análisis microbiológico.....	46
6.5. Análisis estadístico y diseño experimental	49

VII. RESULTADOS.....	51
7.1. Iniciación.....	51
7.2. Crecimiento.....	51
7.3. Finalización.....	52
7.4. Concentración de bacterias de <i>Enterococcus spp.</i> y totales en heces.....	52
7.4.1. Iniciación.....	52
7.4.2. Crecimiento.....	53
7.4.3. Finalización.....	53
VIII. DISCUSIÓN.....	54
8.1. Iniciación.....	54
8.2. Crecimiento.....	55
8.3. Finalización.....	57
8.4. Análisis microbiológico.....	59
IX. CONCLUSIONES.....	61
XI. ANEXOS.....	83

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Perfil de aminoácidos para formular dietas con base en proteína ideal para cerdos en diferentes.....	4
Cuadro 2. Microorganismos utilizados como PRO en los animales y el hombre.....	17
Cuadro 3. Cepas de PRO de <i>Enterococcus faecium</i> autorizadas en la Unión Europea.....	32
Cuadro 4. <i>Enterococcus faecium</i> CECT 4515 está recomendado para la alimentación de las siguientes especies animales y etapas.....	33
Cuadro 5. Tiempo de duplicación de diferentes microorganismos y <i>E. faecium</i>	34
Cuadro 6. Variables productivas de 26 a 62 días con <i>Enterococcus faecium</i>	36
Cuadro 7. Niveles de proteína cruda (%PC), energía metabolizable y de PRO en las tres etapas.....	41
Cuadro 8. Composición (%) de las dietas experimentales utilizadas en iniciación.....	42
Cuadro 9. Composición (%) de las dietas experimentales utilizadas en crecimiento.....	43
Cuadro 10 Composición (%) de las dietas experimentales utilizadas en finalización.....	44
Cuadro 11. Comportamiento productivo de cerdos machos castrados en iniciación, alimentados con dos niveles de proteína y dos niveles de PRO.....	73
Cuadro 12. Características de la canal y concentración de urea en plasma en cerdos machos castrados en iniciación, alimentados con dos niveles de proteína y dos niveles de PRO.....	74
Cuadro 13. Comportamiento productivo en cerdos machos castrados en crecimiento, alimentados con dos niveles de proteína y dos niveles de PRO.....	75
Cuadro 14. Características de la canal y concentración de urea en plasma en cerdos machos castrados en crecimiento, alimentados con dos niveles de proteína y dos niveles de PRO.....	76

Cuadro 15. Comportamiento productivo en cerdos machos castrados en finalización, alimentados con dos niveles de proteína y dos niveles de PRO.....	77
Cuadro 16. Características de la canal y concentración de urea en plasma en cerdos machos castrados en finalización, alimentados con dos niveles de proteína y dos niveles de PRO.....	78
Cuadro 17. Número de unidades formadoras de colonias y concentración de bacterias de muestras en heces de cerdos en etapa de iniciación.....	79
Cuadro 18. Número de unidades formadoras de colonias y concentración de bacterias de muestras en heces de cerdos en etapa de crecimiento	80
Cuadro 19. Número de unidades formadoras de colonias y concentración de bacterias de muestras en heces de cerdos en etapa de finalización.....	81
Cuadro 20. Concentración total de bacterias y de bacterias viables del género <i>Enterococcus</i>	82

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Flujo de nitrógeno en cerdos.....	10
Figura 2.	Cuadrícula de la cámara de Petroff-Hausser, usada para el conteo directo de bacteria	49

LISTA DE ABREVIATURAS

PRO	=	Probióticos
AA	=	Aminoácidos
DBP	=	Dietas bajas en proteína
PC	=	Proteína cruda
EM	=	Energía metabolizable
AML	=	Área del músculo <i>longissimus</i>
AMLI	=	Área del músculo <i>longissimus</i> inicial
AMLF	=	Área del músculo <i>longissimus</i> final
CA	=	Conversión alimenticia
COA	=	Consumo de alimento
TRA	=	Tratamiento
GDI	=	Grasa dorsal inicial
GDF	=	Grasa dorsal final
CMI	=	Carne magra inicial
CMF	=	Carne magra final
GDP	=	Ganancia diaria de peso
PI	=	Peso inicial
PF	=	Peso final
GCM	=	Ganancia de carne magra
EEM	=	Error estándar de la media
GMD	=	Ganancia media diaria de peso
CMD	=	Consumo medio diario de alimento
IC	=	Índice de conversión alimenticia
UFC	=	Unidades formadoras de colonias
FAO	=	Food and Agriculture Organization
OMS	=	Organización Mundial de la Salud
Mcal	=	Megacaloría

PROBIÓTICO FECINOR (*Enterococcus faecium*) ADICIONADO A DIETAS ESTÁNDAR Y CON BAJA PROTEÍNA PARA CERDOS EN ENGORDA.

Iván Reyes Vázquez, MC.

Colegio de Postgraduados, 2010.

Se han realizado varias investigaciones en cerdos para encontrar las cantidades mínimas de PC, adicionada con AA sintéticos, que mantenga los resultados productivos de la dieta estándar; también se han tratado de encontrar aditivos que mejoren la respuesta de los cerdos a dietas con baja proteína. Por ello, se realizó un experimento para evaluar el comportamiento productivo (GDP, COA, CA, GCM), las características de la canal (AML, GD, %CM), la concentración de urea en plasma y de población microbiana total y del PRO en heces de 36 cerdos híbridos (Yorkshire×Duroc×Pietrain) machos castrados en iniciación (11.10 ± 0.51), crecimiento (25.75 ± 1.13), y finalización (51.03 ± 2.20), en respuesta a dos niveles de PC (iniciación: 20.5 y 16.0%; crecimiento: 16.0 y 14.5%; finalización: 14.0 y 12.5%) y dos niveles del PRO *Enterococcus faecium* (0.0 y 1.0 kg ton⁻¹ de alimento) en dietas sorgo-pasta de soya. El diseño utilizado fue un completamente al azar con arreglo factorial 2×2, con 9 repeticiones. Se utilizó el mismo diseño para las tres etapas, y cada cerdo se tomó como una unidad experimental. La energía se mantuvo constante en 3.265 Mcal kg⁻¹. En iniciación no se observaron diferencias ($P > 0.05$) entre tratamientos para las variables productivas. Sólo se observó una reducción ($P \leq 0.05$) en el AMLF al agregar el PRO a la dieta. La concentración de urea en plasma se redujo ($P \leq 0.05$) en 48.91% en dietas con baja proteína comparadas con la dieta estándar. En crecimiento, tampoco se observó efecto de los factores en estudio ($P > 0.05$) sobre la respuesta productiva. La concentración de urea en plasma disminuyó ($P \leq 0.05$) en 18.96% en cerdos alimentados con dietas con baja PC. En finalización, los factores en estudio no afectaron la respuesta productiva ni las características de la canal ($P > 0.05$). La concentración de urea en plasma presentó una reducción ($P \leq 0.05$) de 21.59% en las dietas con baja PC comparadas con las dietas estándar. La concentración de bacterias del género *Enterococcus spp.* en heces fue mayor ($P \leq 0.05$) en los tratamientos que se les adicionó el PRO.

Palabras clave: cerdos, dietas con baja proteína, probiótico, concentración de urea en plasma y de microorganismos en heces.

**FECINOR PROBIOTIC (*Enterococcus faecium*) ADDED TO STANDARD
DIET AND LOW PROTEIN FOR FATTENING PIGS.**

Iván Reyes Vázquez, MC.

Colegio de Postgraduados, 2010.

Several investigations have been conducted in pigs to reduce the crude protein (CP) in amino acid-supplemented diets, to find the minimum amount of CP to maintain the productive results as in the standard diet; in addition, research has been conducted to find additives that improve pig response to low-protein diets. Therefore, an experiment was conducted to evaluate the growth performance (ADG, ADFI, FGR, FFLG), carcass characteristics (LMA, BT, PLM), plasma urea nitrogen concentration, and faeces microbial total and probiotic population of 36 hybrid (Yorkshire×Duroc×Pietrain) barrows during nursery (11.10 ± 0.51), growing (25.75 ± 1.13), and finishing (51.03 ± 2.20) phases, in response to two levels of CP (nursery: 20.5 and 16.0%; growing: 16.0 and 14.5%; finishing: 14.0 and 12.5 %) and two levels of PRO *Enterococcus faecium* (0.0 and 1.0 kg ton⁻¹ of feed), in sorghum-soybean meal based diets. The design was a completely randomized, with a 2×2 factorial arrangement, with nine replicates per treatment. The energy remained constant at 3.265 Mcal kg⁻¹ in all treatments and stages. In nursery pigs, there was no effect of factors ($P>0.05$) on growth performance; just a reduction of LMAF as PRO was added to the diet. The plasma urea nitrogen concentration was reduced by 48.91% as dietary protein was lowered. In the growing pigs, there was no effect of PRO or CP level ($P>0.05$) on growth performance. The plasma urea nitrogen concentration showed an 18.96% reduction as CP level was lowered in the diet. In finishing pigs, there was no effect ($P>0.05$) of analyzed factors on growth performance and carcass characteristics; the plasma urea nitrogen concentration was reduced in 21.59% in pigs fed low-protein diets, compared to standard diet. The concentration of *Enterococcus spp.* bacteria in faeces was higher with the addition of PRO.

Key words: pigs, low-protein diets, probiotic, plasma urea nitrogen concentration and microbial population in faeces.

I. INTRODUCCIÓN

A nivel mundial, México ocupa el lugar 18 en producción de carne de cerdo, y se ubica como el segundo productor latinoamericano. En la década de los 90's la producción de carne de porcino en México mostró una tasa anual de crecimiento del 3.1%, estimándose que para el año 2000 se producirían un millón de toneladas de carne. El crecimiento del valor de su producción representa el 26% del total de carnes producidas, y se estima que el consumo per cápita de carne de porcino es de alrededor de 12 kg (FAO, 2002).

La porcicultura en México es una de las principales actividades económicas del subsector pecuario; el consumo de carne de cerdo ocupa el tercer lugar a nivel nacional. Sin embargo, en los últimos años no se registran cambios significativos en la porcicultura y su crecimiento se ha estancado (Gallardo, 2006). Además, en México, la porcicultura se ubica como la principal actividad ganadera demandante de granos forrajeros, y ocupa el tercer lugar en la demanda de pastas de oleaginosas. Aproximadamente el 50% de estos granos forrajeros y la mayor parte de las pastas de oleaginosas se deben importar (FAO, 2002).

A pesar de que la porcicultura mexicana ha alcanzado un desarrollo significativo en los últimos 20 años, sus características fundamentales siguen siendo una gran heterogeneidad productiva, la dependencia del exterior para la obtención de pie de cría e insumos para las dietas; además, el sector social de la producción, integrado por ejidatarios y comuneros, es muy importante; sin embargo, la porcicultura especializada se concentra en el sector privado, el cual representa el 94% de las explotaciones en unidades de producción de más de 1,000 cabezas. Se estima que el 70% de las unidades privadas son de ciclo completo; el resto son granjas de engorda que producen cantidades limitadas de lechones y las granjas productoras de pie de cría son muy pocas (Pérez, 1999).

También se ha puesto difícil la situación de la porcicultura en México por los altos costos de alimentación, ya que estos se han incrementado hasta en 40% en los últimos meses, debido principalmente al aumento de más del 70% en el precio de los

cereales y los granos. Esto ha traído como consecuencia que el precio de otras materias primas como aminoácidos sintéticos y otras fuentes de proteína también sea más elevado (Borbolla, 2008). Ante esto, se ha sugerido buscar alternativas viables para abaratar costos de producción; por ejemplo, el uso de dietas con baja proteína es una alternativa para que dicha producción sea más económica.

En nuestro país, la tecnificación abarca el 46% de las explotaciones, mientras que el sector semitecnificado representa el 20% y el de traspatio el 34% del inventario nacional. En el primero se produce el 55% de la carne de cerdo; en el segundo el 20%, y el resto, que no entra en la comercialización formal, lo aporta el sector de traspatio. Como ha sucedido en otras ramas de la actividad económica, en la porcicultura las crisis han provocado una fuerte concentración de la producción. A partir de 1990 surgieron explotaciones en las que se contaban entre 25,000 y 30,000 vientres, a las cuales las legislaciones estatales en materia de medio ambiente obligaron a presentar un estudio de impacto ambiental, que hoy en día cuida mucho este aspecto por el cambio climático global. El impacto ambiental de los desechos porcinos incluye, además de las repercusiones directas sobre los recursos hídricos, del suelo y el aire, factores de perturbación como olores, ruidos y plagas (insectos, ratas), y efectos indirectos (sociales y políticos), que son imposibles de cuantificar (Pérez, 1999).

En las últimas décadas, la biotecnología también ha tratado de colaborar para mejorar la salud de los animales (Mejía *et al.*, 2007), impulsando un sinnúmero de aditivos como son los probióticos (PRO), que ayudan a mantener el estado de salud general del organismo y, a la vez, pueden tener un efecto benéfico adicional, terapéutico o preventivo en el animal (Pia *et al.*, 2005), esto con el fin de tener mejoras en la producción y al mismo tiempo reducir el uso excesivo de antibióticos.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. PROTEÍNA IDEAL

El concepto de “proteína ideal” se refiere básicamente al balance exacto de AA esenciales, capaces de satisfacer, sin deficiencias ni excesos, las necesidades absolutas de todos los AA requeridos para su mantenimiento y una máxima deposición muscular en los animales. Esto significa que ningún AA se suministra en exceso en comparación con el resto. Como consecuencia, la retención de proteína es máxima y la excreción de nitrógeno es mínima. Esto se realiza a través de una adecuada combinación de concentrados proteicos y AA sintéticos; también implica conocer la digestibilidad verdadera de los AA (Leclercq, 2000). Este concepto de proteína ideal utiliza a la lisina como AA de referencia (Emmert y Baker, 1997).

La nutrición porcina es el área más avanzada en la utilización del concepto de proteína ideal y de la digestibilidad de AA. Baker (1996) propuso un perfil ideal para la proteína (Cuadro 1), el cual ha sido utilizado desde hace algunos años; además, al formular un alimento, es importante considerar la variación existente en los aportes de los AA y conocer los coeficientes de digestibilidad en los ingredientes a utilizar.

A pesar de ser factible formular bajo el concepto de proteína ideal, esto resulta muy complicado y costoso, porque se requiere de muchos ingredientes para alcanzar el perfil ideal de AA o, de otra manera, utilizar todos los AA de forma sintética, lo que no sería posible ya que son pocos los AA sintéticos existentes en el mercado. No obstante, este concepto puede ser útil en la formulación de dietas con baja proteína, cubriendo las necesidades sólo de AA limitantes sin afectar tanto el costo de la dieta (Gómez *et al.*, 2002).

2.1.1. Aplicaciones prácticas de la proteína ideal

Para aplicar los principios del concepto de proteína ideal, es necesario partir del nivel del primer AA limitante para cubrir el requerimiento del animal, que en el caso de cerdos es lisina; este aminoácido es el que marca la pauta para formular una dieta (Leclercq, 2000).

Cuadro 1. Perfil de aminoácidos para formular dietas en base a proteína ideal para cerdos en diferentes etapas.

Aminoácidos	Patrón ideal, % de Lisina		
	5 a 20 kg	20 a 50 kg	50 a 110 kg
Lisina	100	100	100
Treonina	65	67	70
Triptófano	17	18	19
Metionina + Cistina	60	62	65
Isoleucina	60	60	60
Valina	68	68	68
Leucina	100	100	100
Fenilalanina + tirosina	95	95	95
Arginina	42	36	30
Histidina	32	32	32

Tomado de Baker (1996).

Sin embargo, es importante prevenir los excesos, ya que, con la proteína ideal, los niveles totales de algunos AA (esenciales o no), tendrán un incremento relativo a la lisina digestible. Si el aporte de AA excede los requerimientos, éstos serán metabolizados y el nitrógeno eliminado. Por otro lado, si no existe un exceso de AA, pero uno de ellos es limitante respecto a la proteína ideal, éste AA limitará la síntesis proteica y el resto de aminoácidos serán catabolizados (Torrallardona, 2009).

La principal ventaja de usar el concepto de proteína ideal está en que la relación ideal de AA permanece igual para animales de cualquier potencial genético, aunque los requerimientos serán diferentes dependiendo del sexo, edad o raza, pero sobre todo de su capacidad de depositar tejido magro (Baker, 1996).

2.1.2. Formulación con base a lisina

Los cerdos requieren en su dieta la presencia de diez AA esenciales para tener un buen desarrollo. La lisina es el primer AA limitante en los ingredientes (maíz, sorgo,

pasta de soya) más utilizados para la formulación de dietas para cerdos. Una deficiencia de lisina reduce el consumo de alimento, el crecimiento y la eficiencia de utilización del alimento; por esta razón, es de gran relevancia tener información precisa del contenido de lisina de los ingredientes, así como de su digestibilidad y disponibilidad (Gutiérrez *et al.*, 2008). Por ello, al ser la lisina el primer AA limitante en la elaboración de dietas para cerdos, se ha decidido utilizarlo como punto de partida para la formulación de dietas; posteriormente se ajusta el nivel de los AA esenciales restantes con referencia a lo que es el concepto de proteína ideal.

2.2. DIETAS BAJAS EN PROTEÍNA

El costo de la alimentación generalmente representa más del 50% del costo total de producción, siendo la energía el componente de mayor proporción. Por lo tanto, es importante saber con precisión tanto los requerimientos de energía del cerdo y como el valor energético de los alimentos (Noblet *et al.*, 1994); además, la inclusión de AA sintéticos, especialmente L-lisina-HCl, es muy común en dietas para cerdos, ya que los costos de producción se pueden reducir mediante la sustitución de una parte de la fuente de proteína por AA sintéticos (Knowles *et al.*, 1998).

Una DBP es la que proporciona todos los AA necesarios, al igual que las dietas estándar, pero sin excesos. Para disminuir la concentración de proteína de una dieta se utilizan AA sintéticos, y aquí es donde la economía desempeña su función positiva para el productor (Mavromichalis, 2009).

Dietas con baja proteína se han asociado con una reducción de las pérdidas de energía; también ha permitido la reducción del contenido de proteína cruda en el alimento, manteniendo al mismo tiempo el suministro de AA esenciales (Le Bellego *et al.*, 2001). Sin embargo, existe la tendencia a tener canales con mayor cantidad de grasa cuando los cerdos son alimentados con dietas bajas en proteína adicionadas con AA sintéticos (Kerr *et al.*, 1995; Tuitoek *et al.*, 1997), ya que la reducción de proteína cruda aumenta la energía neta disponible, que se utiliza para mayor deposición de tejido adiposo (Noblet *et al.*, 1994; Le Bellego *et al.*, 2001). Lo anterior se debe a que

hay mayor cantidad de energía disponible para sintetizar tejido adiposo y, por lo tanto, se presenta un aumento de la grasa dorsal, aunque la respuesta productiva es similar en cerdos alimentados con dietas estándar o con DBP (Figueroa *et al.*, 2002); además, al hacer uso de DBP adicionadas con AA sintéticos (lisina, metionina, treonina y triptófano) se excreta menos nitrógeno en las heces (Figueroa *et al.*, 2004), lo que ayuda a contrarrestar la contaminación ambiental.

2.2.1. Uso de sorgo y pasta de soya en dietas para cerdos

El sorgo se utiliza ampliamente en todo el mundo como alimento para el ganado en general (Ward y Southern, 1995) y es considerado como la principal fuente alternativa en la alimentación de cerdos (Cousins *et al.*, 1981; Lin *et al.*, 1987; Brudevold y Southern, 1994). En México representa el principal cereal utilizado en la alimentación de cerdos. Se trata de una excelente fuente de energía (3,280 kcal/kg de EM, y proteína cruda (8.9%) para los cerdos (NRC, 1998). El sorgo contiene más triptófano (NRC, 1998) que el maíz, y por lo tanto, puede ser más económico adicionarlo con aminoácidos sintéticos (Brudevold y Southern, 1994); sin embargo, también se han encontrado desventajas al usar el sorgo, ya que contiene taninos, factores antinutricionales que afectan la digestibilidad de los nutrientes y empobrece el valor nutricional del alimento, por lo que se sugiere analizar el contenido de taninos ya que se llegan a encontrar diferencias en el valor nutricional del alimento de 90 a 95% cuando se usan sorgos con alto contenido de taninos (Cousins *et al.*, 1981).

Muchos investigadores han demostrado que lisina y treonina son el primero y segundo AA limitantes, respectivamente, en sorgo y pasta de soya en las dietas para cerdos, y el tercer aminoácido limitante es metionina o isoleucina (Hansen *et al.*, 1993). Lordelo *et al.* (2008) mencionan que también es importante complementar las DBP a base de maíz-trigo-pasta de soya con valina, junto con los AA de mayor importancia (lisina, triptófano, treonina y metionina), ya que aumenta el consumo de alimento en cerdos en iniciación.

2.2.2. Reducción del nivel proteico

Subalimentar a los animales se opone a la productividad, incluyendo deméritos en la calidad del producto (la canal), pero la provisión excesiva de nutrientes puede ser más costosa que las deficiencias, porque se puede llegar a limitar la producción y, además, el costo del alimento será mayor; por lo tanto, satisfacer los requerimientos es importante, y satisfacerlos con la mayor exactitud posible, es mejor (Cuarón, 1999).

En gran parte, cuidando los niveles de la proteína en la dieta y ajustando la relación de los AA a un perfil ideal, se evitan deficiencias y excedentes y la consecuente producción de energía a partir de AA, ya que cuando los AA son consumidos en exceso, experimentan la pérdida de sus grupos amino, cuyo nitrógeno debe ser excretado, y sus esqueletos carbonados residuales pueden seguir uno de dos destinos: la conversión en glucosa (gluconeogénesis) o su oxidación a través del ciclo del ácido tricarboxílico; ambos procesos (excreción de nitrógeno y oxidación de esqueletos carbonados) resultan muy costosos para el organismo desde el punto de vista metabólico, ya que aumenta el gasto energético para el mantenimiento a expensas del crecimiento (Cuarón, 1999).

En otras palabras, la oxidación de la proteína incrementa las pérdidas de energía metabólica por la orina, e incrementa la producción de calor. Al exceder los niveles proteicos en la dieta, se incrementan estas pérdidas energéticas, decrece la energía metabolizable y disminuye la eficiencia de utilización de la energía metabolizable, resultando todo esto en una menor oferta de energía neta; además, se demostró que el total de pérdida de energía a partir de proteína catabolizada es de 48.5 a 50% (Just, 1982). Figueroa *et al.* (2004) también afirman que al disminuir la proteína cruda en dietas de cereal-pasta de soya se reduce la desaminación de los excesos de aminoácidos, la síntesis de urea y su excreción en la orina.

2.2.3. Comportamiento productivo de cerdos alimentados con dietas bajas en proteína

En cerdos en iniciación no hay claridad acerca de la limitación de los AA en DBP a base de maíz-pasta de soya (Mavromichalis *et al.*, 1998). El uso de sorgo en lugar de

maíz en dietas para cerdos, no ha dado resultados convincentes, y existen pocos estudios en DBP para cerdos en iniciación. En una investigación realizada con este tipo de dietas, no se encontraron diferencias en ganancia diaria de peso, consumo de alimento, y ganancia de carne magra entre tratamientos. Además, se observó que en las DBP, al reducir el nivel de aceite de soya en las dietas disminuye el costo del alimento; en cuanto al área del músculo *longissimus* y porcentaje de carne magra no hubo diferencia entre tratamientos (Trujillo *et al.*, 2007).

En las dietas para cerdos en crecimiento, la respuesta productiva no cambia al disminuir el porcentaje de proteína cruda y suplementarla con AA sintéticos; además, se puede mejorar la calidad de la canal si se baja la cantidad de energía metabolizable en esas dietas de baja proteína (Figuroa *et al.*, 2004). Sin embargo, Kerr *et al.* (1995) afirman que cuando se disminuye el porcentaje de proteína cruda (hasta 12%) y no se agregan AA sintéticos se produce un descenso en la ganancia diaria y la eficiencia alimenticia de los cerdos en crecimiento. En otro trabajo, Figuroa *et al.* (2002) comentan que la proteína se puede reducir hasta 11% (en dietas a base de maíz-pasta de soya), siempre y cuando, además de agregar lisina, metionina, treonina y triptófano, se agreguen valina, histidina o isoleucina, ya que estos últimos son aminoácidos limitantes a este nivel de baja proteína.

En otro experimento con cerdos en crecimiento, Figuroa *et al.* (2004) encontraron que al reducir la proteína cruda de 16.5 a 12.5% en dietas sorgo-pasta de soya, aumentó el consumo de alimento pero no se afectó la ganancia diaria, conversión alimenticia, ganancia de carne magra, grasa dorsal, área del músculo *longissimus* y porcentaje de carne magra; y al reducir la energía metabolizable en las mismas dietas aumentó el consumo de alimento y mejoró la ganancia de carne magra, pero no hubo efecto en la conversión alimenticia, grasa dorsal y porcentaje de carne magra.

Para cerdos en finalización, se ha visto que al disminuir la proteína cruda se reduce la ganancia diaria de peso, el peso final y la ganancia de carne magra, y por el contrario, aumenta la conversión alimenticia, pero no hubo efecto en el consumo de alimento, grasa dorsal, área del músculo *longissimus* y porcentaje de carne magra (Figuroa *et al.*, 2004). Figuroa *et al.* (2008) recomiendan que la proteína puede

disminuirse de 14 a 12.5% para cerdos en finalización, y que, al ser complementada con AA sintéticos, no se ve afectada la respuesta productiva.

2.2.4. Urea en plasma de cerdos alimentados con dietas con baja proteína

La concentración de urea en plasma se usa como un indicador de rápida respuesta a los cambios en el nivel de PC o de AA en la dieta; esto significa que el metabolismo del nitrógeno tiene una rápida respuesta a los cambios en la dieta (Coma *et al.*, 1995; Figueroa *et al.*, 2008). El consumo de excesos de proteína incrementa la síntesis y la excreción de urea; este aumento se refleja en una mayor concentración de urea en plasma (Eggum, 1970), y la eficiencia de utilización de la proteína para formar tejido muscular es inversamente proporcional a la concentración de urea en plasma (Chen *et al.*, 1995); por lo tanto, cuando se tienen bajos niveles de urea, indican un uso adecuado de la proteína de la dieta, y por el contrario, los altos niveles de urea indican un uso ineficiente y desperdicio del nitrógeno (Knowles *et al.*, 1998).

Trujillo *et al.* (2007) y Figueroa *et al.* (2008) reportan que la urea en plasma disminuye al reducirse la concentración de PC en cerdos en iniciación, y además, no se presentan diferencias en ganancia diaria de peso, consumo de alimento ni ganancia de carne magra entre tratamientos.

Al realizar los análisis de la concentración de urea en plasma de cerdos en iniciación alimentados con dietas a base de sorgo-pasta de soya se encontró que la proteína cruda puede reducirse de 20.5 hasta 16%, y no se ve afectado el nivel productivo, pero se recomienda adicionar AA sintéticos para igualar la concentración de una dieta estándar (Trujillo *et al.*, 2007).

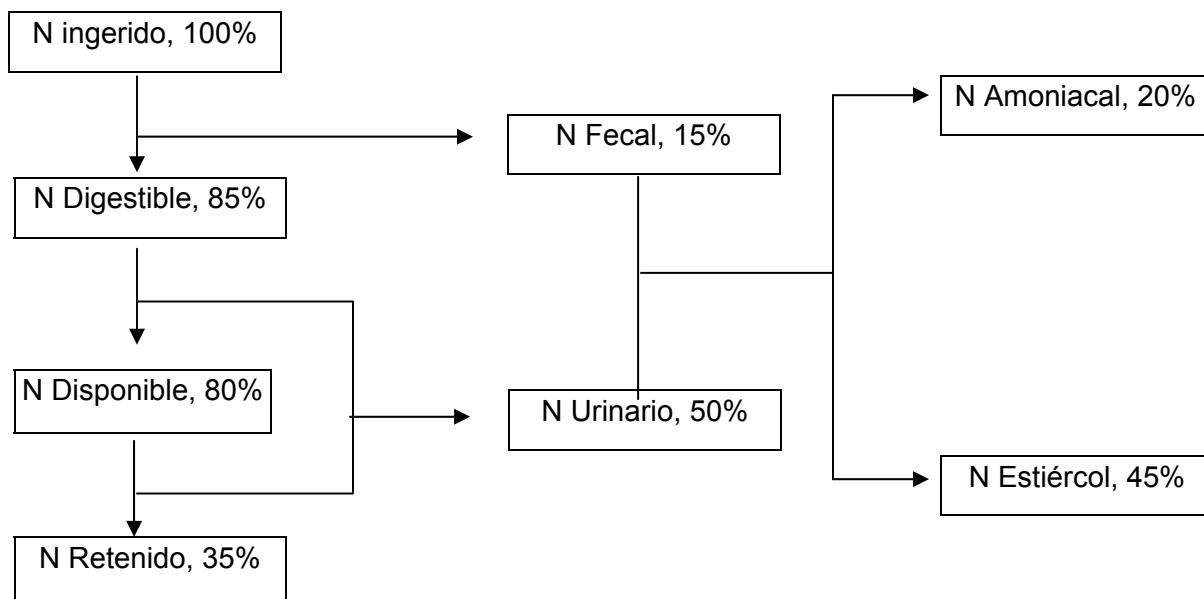
2.2.5. Beneficios al medio ambiente al usar dietas bajas en proteína

La preocupación por los temas ambientales supone un desafío creciente para la ganadería. Actualmente se trata de disminuir la contaminación, un tema de investigación que a todo mundo preocupa y que aumenta a medida que pasa el tiempo. Los desechos producidos por esta actividad generan muchos compuestos que de

alguna manera contribuyen al cambio climático, ya que mucho del nitrógeno excretado se encuentra en forma de amoniaco, lo que afecta la salud de las personas y de los animales (Rivera, 2008).

Es importante señalar que al manipular las concentraciones de proteína se reducen las emisiones de amoniaco al medio ambiente. La mayor parte del nitrógeno alimenticio está presente en forma de proteína; el exceso no retenido en los tejidos corporales puede encontrarse en otras formas en las heces y la orina, después de ser o no metabolizado; la urea se encuentra principalmente en la orina y los aminoácidos y los péptidos en las heces (Figura 1). Estos últimos pueden proceder del alimento, de las secreciones endógenas y de la conversión bacteriana; se estima que la urea y los péptidos se encuentran entre 40-80% y 30-50% respectivamente, de la excreción total de nitrógeno. Una vez excretada la urea se convierte rápidamente en amoniaco, gas nocivo para los humanos y que contribuye al mal olor del ambiente. Las fuentes de nitrógeno excretadas en las heces son menos volátiles que el nitrógeno de la orina, puesto que el nitrógeno fecal se encuentra unido químicamente dentro de las proteínas y otros compuestos (Hartog y Sijtsma, 2007).

Figura 1. Flujo de nitrógeno en cerdos (Ferket *et al.*, 2002).



Un estudio hecho por Panetta *et al.* (2006) demostró que se llegan a reducir de 13 a 58% en promedio las emisiones de amoniaco en función de manipular la cantidad de proteína en la dieta para cerdos. Sin embargo, la correcta formulación es esencial para garantizar que los nutrientes satisfagan los requerimientos de los animales y no se observen efectos negativos sobre el comportamiento productivo; además, las estrategias aplicadas a la dieta para reducir el amoniaco en las heces resultan económicas para el productor, ya que dependen directamente de los costos de alimentación.

2.3. PROBIOTICOS

2.3.1. Aditivos en la nutrición de cerdos

Los aditivos para alimentación animal se han utilizado ampliamente en dietas para cerdos; la mayoría de los productores de cerdos los utilizan debido a su demostrada capacidad para aumentar la tasa de crecimiento, mejorar la utilización del alimento, y reducir la mortalidad y muchas infecciones (Dritz *et al.*, 1997).

En general, los aditivos disponibles para cerdos caen dentro de cinco categorías: 1) drogas que incluyen: antibióticos, quimioterapéuticos y antihelmínticos; 2) minerales promotores de crecimiento; 3) enzimas; 4) ácidos orgánicos; y 5) probióticos (Dritz *et al.*, 1997).

2.3.1.1. Alternativas a los antibióticos

Las propiedades de los promotores de crecimiento respecto a los agentes antimicrobianos en animales fueron descubiertas a finales de 1940 (Close, 2000). Los investigadores observaron que las aves crecían mejor cuando se agregaban en el alimento cantidades subterapéuticas de antibióticos, en comparación con las que no recibían este tratamiento (Moore *et al.*, 1946).

Por mucho tiempo los antibióticos han sido el método utilizado para mejorar la salud y el ambiente intestinal de los animales y con ello, su rendimiento, muchas investigaciones confirmaron este uso. Los principales efectos asociados con la

inclusión de agentes antimicrobianos como aditivos en la alimentación son: la prevención de trastornos digestivos y el mejoramiento del rendimiento del alimento y los animales, reducción del desperdicio de nutrientes, disminución de la contaminación ambiental y menor costo de producción (Close, 2000). Actualmente, los productores y las mismas empresas se han dado cuenta que el uso excesivo de los antibióticos causan resistencia de los patógenos; por ello, en algunos países las autoridades vigilan la industria de los alimentos balanceados y se han buscado alternativas para sustituir los antibióticos; se han encontrado muchas opciones para modificar el ambiente intestinal y el rendimiento de los animales sin usar antibióticos en el alimento o en los mismos animales (Risley, 2005).

Los promotores de crecimiento tienen como objetivo expresar al máximo la capacidad genética propia del animal con una alimentación balanceada. En la Unión Europea se prohíbe la utilización de sustancias anabólicas y hormonales, y la prohibición de los antibióticos promotores del crecimiento en varias partes del mundo ha resultado en los últimos años en una intensa búsqueda de estrategias alimenticias alternativas a los antibióticos para cerdos (Canibe *et al.*, 2003). A raíz de esto, en varios países se ha prohibido el uso de antibióticos, como en Suecia en 1986; en 1997 la Unión Europea, Dinamarca, Alemania y Finlandia prohibieron el uso de la Avoparcina; en 1998, el de Tilosina fosfato, Espiramicina, Bacitracina de zinc y Virginiamicina, y sólo dejaron disponibles Flavofosfolipol, Salinomicina y Avilamicina para uso en cerdos (Roura, 2001).

La unión Europea ha sido líder en esta área de investigación, debido a que ellos han respetado la prohibición de los antibióticos y han demostrado que la restricción alimenticia, el uso de DBP, y los alimentos funcionales son las alternativas más viables y apropiadas para reducir el uso excesivo de los antibióticos, especialmente en los lechones al destete (Risley, 2005), sin mencionar que existe una amplia gama de productos tratando de sustituir a los antibióticos.

De acuerdo con Close (2000), algunas alternativas al uso de agentes antimicrobianos en cerdos pueden ser las siguientes:

- Acidificantes en el alimento.
- Oligosacáridos.
- Enzimas.
- Extractos vegetales.
- Saborizantes.
- Alimentos funcionales (PRO, prebióticos, simbióticos).
- Polisacáridos no almidonosos.
- Productos proteínicos y AA.

2.3.2. Alimentos funcionales

Actualmente, en los países industrializados ha cambiado el concepto de nutrición, pasando de aportar los nutrientes necesarios en la dieta a la idea de que la dieta puede contener ingredientes que además de nutrir, promuevan específicamente la salud. Los alimentos funcionales son productos nutritivos y no nutritivos que no sólo alimentan, sino que modulan determinadas funciones del organismo, produciendo un efecto benéfico más allá de lo nutricional (Ferrer y Dalmau, 2001). Además, se busca un beneficio fisiológico adicional que reduzca el riesgo de una enfermedad crónica, o que mejore la salud del individuo (Figuroa *et al.*, 2006).

Figuroa *et al.* (2006) definen a los alimentos funcionales como compuestos que pueden ser o no nutritivos y que pueden tener efectos sobre las funciones del organismo, y que a su vez brindan bienestar al animal. Además, estos autores consideran alimentos funcionales a los prebióticos, PRO, simbióticos, antioxidantes, productos secundarios del metabolismo vegetal, lípidos estructurales, ácidos grasos poliinsaturados, subproductos del metabolismo de las grasas, péptidos bioactivos, fibras, vitaminas y minerales.

A final de cuentas, la infinidad de definiciones que puedan existir para un alimento funcional nos da a entender el mismo significado: la salud, la prevención y la disminución de enfermedades es su prioridad; por lo tanto, el desarrollo de alimentos funcionales constituye una oportunidad real de contribuir a mejorar la calidad de la dieta

y la selección de alimentos que pueden afectar positivamente la salud y el bienestar del animal (De las Cagigas y Blanco, 2002).

Actualmente está de moda agregar PRO para la elaboración de alimentos funcionales y depende, por un lado, del sinergismo que debe establecerse entre estos cultivos y los iniciadores de la fermentación, lo que permite obtener un producto con excelentes propiedades gustativas y, por otro lado, de los factores externos que afectan o condicionan la viabilidad de las cepas probióticas. Cabe mencionar que uno de los requisitos principales de este tipo de alimentos funcionales es que los microorganismos PRO permanezcan viables y activos en el alimento y durante el tránsito gastrointestinal para garantizar así su potencial beneficio en el huésped (Pia *et al.*, 2005).

De todos los alimentos funcionales que existen, los de mayor importancia son los prebióticos, PRO y simbióticos; estos en conjunto son capaces de modificar la composición de la microflora intestinal aumentando principalmente el número de lactobacilos y bifidobacterias, lo que hace que disminuya la población de bacterias patógenas (Figueroa *et al.*, 2006).

2.3.2.1. Probióticos

Los alimentos funcionales más relevantes son los PRO, y en un principio se les llamo así a los microorganismos vivos representados fundamentalmente por los derivados lácteos fermentados (Belén *et al.*, 2003). La denominación de PRO surge y se utiliza a nivel general desde hace muchos años (Olivera, 2008). Actualmente, la industria alimentaria menciona las bondades de los alimentos adicionados con microflora intestinal, ya que mejoran muchas patologías y previenen otras. La adición de cierto tipo de bacterias contribuye al mantenimiento de un determinado tipo de flora, y con esta base nace el concepto de PRO: microorganismo vivo, componente de los alimentos que cuando se ingiere tiene un efecto benéfico sobre el individuo mejorando el equilibrio de su flora intestinal (Martínez-Cócera y Mesa, 2005).

2.3.2.1.1. Definición

En el año de 1907, Ellie Metchnikoff realizó estudios sobre la salud en humanos con relación a la flora intestinal, y su hipótesis fue que la longevidad de los búlgaros y de los habitantes de otras zonas europeas estaba relacionada con el consumo del yogurt, de manera que disminuía la actividad patogénica de las bacterias presentes en el intestino (Figueroa *et al.*, 2006).

Según López-Brea y Domingo (2007), la denominación de PRO fue utilizado en un principio por Lilly y Stillwell (1965) para describir a sustancias producidas por un microorganismo que estimula el crecimiento de otro, esto es, una función opuesta a los antibióticos, y Parker (1974) también definió a los PRO como organismos y sustancias que contribuyen al balance intestinal.

Posteriormente, Fuller (1989) define a los PRO como un complemento alimenticio a base de microorganismos vivos y vitales que producen efectos beneficiosos sobre el organismo animal, mejorando el equilibrio microbiano intestinal. Mas recientemente, en 1992 también los PRO fueron definidos como uno o más microorganismos vivos con capacidad para optimizar la microflora intestinal (Havenaar y Huis in't Veld, 1992; Klaenhammer, 2000); y Guarner y Schaafsma (1998) definieron a los PRO como sustancias que al momento de ser ingeridos exhiben efectos benéficos sobre la función inmune y el tracto gastrointestinal. En el año 2002 la Food and Agriculture Organization (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) definen a los PRO como microorganismos vivos que, administrados en cantidades suficientes, proveen efectos fisiológicos benéficos sobre el huésped (Manzanares *et al.*, 2006); en Estados Unidos se usa el término “direct-fed microbials” (Cepero, 2006).

Desde entonces, la definición de PRO ha evolucionado notablemente. Sin embargo, todas sus definiciones se refieren a que son microorganismos vivos, principalmente bacterias, usados en forma de suplementos nutricionales que, tras ser ingeridos en cantidades suficientes, mejoran el equilibrio microbiano en el tracto gastrointestinal, provocando efectos benéficos sobre la salud, mas allá de los efectos nutricionales tradicionales (Amores *et al.*, 2004).

2.3.2.1.2. Clasificación y características de los probióticos

Los microorganismos que constituyen los PRO son principalmente bacterias capaces de producir ácido láctico, que son las más conocidas, pero también se incluyen bacterias no lácticas, levaduras y hongos (Caja *et al.*, 2003).

Para que un microorganismo sea útil y sea considerado como un PRO debe cumplir determinadas características (Cepero, 2006), como las siguientes:

1. Seguro para el animal sin causar enfermedad ni toxicidad.
2. Resistente al ácido gástrico y a la bilis; debe llegar vivo al intestino, por lo que debe soportar el pH gástrico y los ácidos biliares en el intestino delgado.
3. Capacidad de colonización del intestino: sólo algunas cepas se adhieren al epitelio intestinal. Esto es necesario para lograr una exclusión competitiva eficaz.
4. Capacidad de inhibir el crecimiento de patógenos: deben producir ácidos u otras sustancias que inhiban el crecimiento de patógenos gram-negativos como *E. coli*.
5. Estables y viables durante los procesos tecnológicos.
6. Estables y viables durante el almacenaje. Hay que tener en cuenta si el microorganismo usado es aerobio o anaerobio para conservarlo adecuadamente.
7. Modular la respuesta inmune.
8. Modificar actividades microbianas.

Los microorganismos comúnmente usados como PRO son los siguientes (Cepero, 2006):

1. *Lactobacilli*. Se usan con frecuencia pues no son patógenos, son componentes de la microbiota intestinal normal, y se les suponen efectos benéficos.
2. *Bacillus*. Es más estable a los tratamientos térmicos y al pH gástrico debido a su capacidad de formar esporas, que deben germinar en el intestino para ser activas. No pueden adherirse a la pared intestinal pero tienen una gran capacidad de multiplicación. Favorecen el desarrollo de *Lactobacillus* y deprimen el crecimiento de

Cuadro 2.- Microorganismos utilizados como PRO en los animales y el hombre.

Microorganismos	Género	Especies
Bacterias lácticas no esporuladas (Gram +)	Lactobacilos (<i>Lactobacillus</i>)	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. rhamnosum</i> , <i>L. GG</i> , <i>L. delbrueckii bulgaricus</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. lactis</i> , <i>L. cellobiosus</i>
	Bífidobacterias (<i>Bifidobacterium</i>)	<i>B. bifidum</i> , <i>B. longum</i> , <i>B. thermophilus</i> , <i>B. infantis</i> , <i>B. adolescents</i> , <i>B. animalis</i>
	Estreptococos (<i>Streptococcus</i>)	<i>S. thermophilus</i> , <i>S. lactis</i> , <i>S. cremoris</i> , <i>S. salivarius</i> , <i>S. intermedius</i> , <i>S. leuconostoc</i>
	Enterococos (<i>Enterococcus</i>)	<i>E. faecali</i> , <i>E. faecium</i>
	Lactococos (<i>Lactococcus</i>)	<i>L. lactis</i>
	Pediococos (<i>Pediococcus</i>)	<i>P. acidilactici</i>
	Leuconostoc (<i>Leuconostoc</i>)	<i>L. mesenteroides</i>
Bacterias lácticas esporuladas (Gram+)	Sporolactobacilos (<i>Sporolactobacillus</i>)	<i>S. inulinus</i>
Bacterias no lácticas Esporuladas	Bacilos (<i>Bacillus</i>)	<i>B. subtilis</i> , <i>B. coagulans</i> , <i>B. clausii</i> , <i>B. cereus</i> (var. <i>toyoi</i>), <i>B. licheniformis</i> ,
	Bacterias propiónicas (<i>Propionibacterium</i>)	<i>P. freudenreichii</i>
Levaduras	Sacaromicetos (<i>Saccharomyces</i>)	<i>S. cerevisiae</i> (R), <i>S. Boulardii</i>
Hongos	Aspergilos (<i>Aspergillus</i>)	<i>A. niger</i> , <i>A. oryzae</i>

Caja et al., (2003)

E. coli, *Clostridium*, *Streptococcus*, y *Enterobacteriaceae*. Además, durante la germinación de las esporas se liberan enzimas que ayudan a la digestión.

3. *Streptococci*. También forman parte de la microbiota intestinal y producen ácido láctico. Sus características benéficas son similares a las de los lactobacilos, pero se han estudiado menos porque algunas especies pueden ser patógenas.

4. *Saccharomyces*. Levadura muy utilizada en medicina humana para combatir las diarreas causadas por antibióticos. Sus características favorables son: crece muy bien a 37 °C, resiste el pH y tiene un efecto antimicrobiano, del cual no se conocen bien los mecanismos de acción. Sin embargo, no es capaz de colonizar el tracto gastrointestinal, por lo que se debe administrar a diario para que funcione.

Dentro de los factores externos más importantes que afectan la viabilidad y sobrevivencia de las bacterias probióticas se encuentran los siguientes (Pia *et al.*, 2005):

- El pH (condiciones de acidez derivadas del proceso de fermentación).
- El oxígeno disuelto (especialmente para las bifidobacterias).
- Las interacciones antagónicas entre especies.
- La composición química del medio de cultivo.
- La concentración final de azúcares (aumento de la presión osmótica).
- Las prácticas de inoculación (es importante conocer el momento adecuado para el agregado del cultivo PRO).
- La temperatura y duración de la fermentación, y
- Las condiciones de almacenamiento del producto.

2.3.2.1.3. Mecanismo de acción de los probióticos

Aunque en los últimos años el efecto de los PRO en el ecosistema microbiano ha sido investigado, el mecanismo de acción es muy complejo y no es todavía completamente conocido (Cepero, 2006), si bien podría ser fácilmente entendido desde el punto de vista del equilibrio ecológico bacteriano, y esto es importante en el caso del efecto en el intestino (López-Brea y Domingo, 2007).

En general, los PRO actúan acidificando el ambiente intestinal, segregando sustancias que inhiben el crecimiento de microorganismos patógenos, consumiendo nutrientes específicos o uniéndose competitivamente a los receptores intestinales de forma que mantienen la flora intestinal y así evitan la acción de patógenos. Además, tienen propiedades inmunomoduladoras, ya que modifican la respuesta a antígenos, aumentan la secreción de IgA específica frente a rotavirus, facilitan la captación de antígenos en la placa de Peyer, producen enzimas hidrolíticas, y disminuyen la inflamación intestinal. Mediante la supresión del crecimiento de bacterias que convierten los procarcinógenos en carcinógenos, el consumo de enzimas procarcinogénicas o a través de la producción de sustancias inhibitoras de dichas enzimas es posible que disminuyan el desarrollo de determinados tumores. También aumentan la actividad de las hidrolasas de las sales biliares que se unen al colesterol y ayudan a su eliminación, por lo que tienen un efecto hipocolesterolémico. Mediante la producción de triglicéridos de cadena corta inhiben la síntesis de colesterol, lo redistribuyen desde el plasma al hígado y por desconjugación de las sales biliares el colesterol no se reabsorbe (Ferrer y Dalmau, 2001).

El principal mecanismo de acción de los PRO es la exclusión competitiva, pero se han sugerido muchas otras acciones benéficas (Cepero, 2006).

- Exclusión competitiva

El término “exclusión competitiva” fue formulado por Nurmi, quien logró demostrar la prevención de la colonización de pollitos de un día por *Salmonella* tras la administración de material cecal de gallinas (Nurmi y Rantala, 1973). La capacidad de la flora intestinal para evitar la colonización de otras bacterias potencialmente patógenas ha sido atribuida a diferentes mecanismos relacionados con la competencia por nutrientes, por los espacios y puntos de adhesión en el epitelio intestinal y también con la producción de sustancias antimicrobianas (bacteriocinas) o productos metabólicos que inhiben su crecimiento (Medel *et al.*, 2007).

Las bacteriocinas son sustancias antimicrobianas de tipo peptídico, producidas por los microorganismos, capaces de inhibir el crecimiento de otros individuos de la misma familia. Tradicionalmente las bacteriocinas producidas por los microorganismos

gram-positivos son de tamaño pequeño y estables al calor, y su actividad antimicrobiana está encaminada a un espectro bacteriano mayor que el de aquellas bacteriocinas producidas por bacterias gram-negativas (López-Brea y Domingo, 2007). También han mostrado tener un efecto positivo frente a las gastroenteritis producidas por cepas de *E. coli* y *Campylobacter*, reduciendo considerablemente su proliferación (Marquina y Santos, 2001).

Para su estudio, Nes *et al.* (1996) clasificaron a las bacteriocinas de acuerdo a sus características bioquímicas y genéticas, y los dividió en dos grupos (López-Brea y Domingo, 2007):

- 1) Bacteriocinas de clase I o lantibióticos: péptidos pequeños, activos sobre la membrana que contienen algunos AA poco comunes, como lantionina, b-metil-lantionina y dihidroalanina. Los lantibióticos se dividen a su vez en tipos A y B, de acuerdo a sus características estructurales: los del grupo A son moléculas alargadas con una estructura flexible en solución y el grupo B adopta una estructura más rígida.
- 2) Bacteriocinas de clase II o no lantibióticos: sustancias de peso molecular variable que contienen AA comunes y se pueden diferenciar en cuatro grupos. Las de clase IIa son péptidos activos frente a *Listeria*; las de clase IIb son formadoras de porinas, están constituidas por dos péptidos necesarios para la actividad antimicrobiana; las de clase IIc son péptidos pequeños, termoestables, y necesitan un péptido transportador; y las de clase IId se definen como bacteriocinas circulares.

Se ha sugerido una tercera clase de bacteriocinas en las que se incluyen enzimas termolábiles que degradan la pared celular; sin embargo, este grupo aun está en discusión.

El mecanismo de acción de las bacteriocinas es complejo. La mayoría son activadas sobre las membranas celulares, destruyendo la integridad de la membrana citoplasmática mediante la formación de poros, lo que aumenta la permeabilidad y

provoca la salida al exterior de compuestos intracelulares pequeños; con esto se alteran los mecanismos de producción de energía y la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas, ocasionando de esta manera muerte celular (López-Brea y Domingo, 2007).

Muchas cepas de PRO, particularmente diferentes lactobacilos y bifidobacterias, poseen capacidad para adherirse a las células epiteliales (Servin y Coconnier, 2003), pudiendo ser este uno de los mecanismos mediante los cuales ejercen su acción. En algunos experimentos en animales se ha comprobado que las bacterias de los PRO, al actuar sobre las células epiteliales del intestino, resaltan la expresión de ARN para las mucinas MUC2 y MUC3, que son glicoproteínas con una acción protectora frente a las infecciones intestinales, con excepción de si se trata de bacterias productoras de mucinasa (Mack *et al.*, 1999).

Sin embargo, es cierto que existe evidencia de que las cepas de PRO administradas en el alimento consiguen colonizar permanentemente el tracto digestivo; es por ello que parece más razonable que la exclusión se ejerza por competición de nutrientes o por inhibición de patógenos a través de la producción de diferentes metabolitos (Medel *et al.*, 2007).

- Refuerzo de la barrera gastrointestinal

Las bacterias intestinales contribuyen a la correcta permeabilidad de la mucosa intestinal. Determinados microorganismos perjudiciales incrementan la permeabilidad y favorecen el paso de bacterias y macromoléculas de la dieta a través de la mucosa; sin embargo, diferentes PRO pueden prevenir y reparar dicho daño, lo cual ha sido constatado *in vitro* en cultivos celulares e *in vivo* con animales en experimentación (López-Brea y Domingo, 2007). Los lactobacilos producen ácidos orgánicos que al metabolizar la fibra hacen que se reduzca el pH, inhibiendo el crecimiento de patógenos (Cepero, 2006). Los PRO previenen la desorganización del citoesqueleto celular mejorando así la función de barrera de la mucosa (Resta-Lenert, y Barrett, 2003).

- Efectos sobre el sistema inmune

Durante las primeras etapas de vida los mamíferos se enfrentan a un gran número de patógenos; por lo tanto, una respuesta inapropiada puede comprometer la capacidad del intestino para digerir y absorber los nutrientes con consecuencias sobre los aspectos productivos, llegando a contraer enfermedades (Medel *et al.*, 2007).

La modulación del sistema inmunitario es uno de los efectos benéficos más comunes con el uso de PRO en animales. Este efecto puede ser el resultado de factores solubles que afectan la permeabilidad epitelial, inhiben la cascada inflamatoria o bien la activación de las células dendríticas (López-Brea y Domingo, 2007); también pueden ayudar a la prevención de algunas alergias como las que se presentan en lechones contra la soya, una de las causas frecuentes de la diarrea post-destete (Li *et al.*, 1990).

Las bacterias que se adhieren a la pared intestinal son reconocidas como antígenos por las células inmunitarias de la lámina propia, lo que estimula las defensas. También las levaduras tienen esta propiedad (Cepero, 2006).

- Mejoras en la digestión del alimento

El PRO tiene un efecto estimulante sobre la secreción de enzimas endógenas, y, si le sumamos el desarrollo y la funcionalidad de las vellosidades intestinales, así como la reducción en la agresión microbiana al epitelio, va a mejorar la función digestiva de tal modo que también se mejora la digestión de algún tipo particular de nutriente que el animal por sí mismo no sea capaz de digerir (Medel *et al.*, 2007). En este sentido, la administración de *Lactobacillus* modificados capaces de producir β -glucanasas, han reducido la viscosidad de la digesta y mejorado la digestibilidad en pollos (Siew *et al.*, 2005). En rumiantes, la utilización de PRO en el alimento también mejoró la digestión de la fibra mediante una estimulación de la población celulolítica y una reducción de la acidosis ruminal (Martin y Nisbet, 1992).

Por otro lado, los PRO también estimulan la absorción de agua y electrolitos, de lo que se deduce su utilidad en el tratamiento de diarreas (Marteau *et al.*, 2001). En general, cabe señalar que el conocimiento de los mecanismos es limitado, ya que la enorme complejidad que existe entre los microorganismos y el alimento, el animal y su

microbiota, hacen más difícil predecir los efectos de un determinado PRO; probablemente esta sea la razón por la cual los resultados de algunas investigaciones con PRO han sido contradictorios (Medel *et al.*, 2007).

Por lo anterior, el uso de PRO como aditivos ha generado mucho escepticismo debido a la variabilidad de los resultados obtenidos en condiciones prácticas (Apalajahti *et al.*, 2004). Las causas son diversas: uso de cepas poco viables y/o poco resistentes a la granulación, administración inadecuada, mala elección del microorganismo, o conservación inapropiada del mismo (Cepero, 2006). Algunos efectos de los PRO, atribuidos a las bacterias lácticas, están muy documentados y se conoce su mecanismo de acción (como por ejemplo: la disminución de la intolerancia a lactosa); mientras que otros, como las propiedades antitumorales o el efecto hipocolesterolémico, requieren mayores estudios *in vitro* y en modelos experimentales para poder confirmar el modo de acción (Pia *et al.*, 2005).

2.3.2.1.4. Importancia del equilibrio de la microflora intestinal

La flora intestinal en los mamíferos no rumiantes consta de alrededor de 10^{11} - 10^{14} microorganismos vivos. El equilibrio de la microflora intestinal se basa en conseguir una relación más o menos estable de dominancia de los microorganismos no patógenos sobre los patógenos, capaces de inducir una respuesta inmunitaria. Dicha respuesta da lugar a cambios metabólicos destinados a maximizar la respuesta inmune. Entre las múltiples causas que pueden alterar el equilibrio de la microflora intestinal podemos destacar las siguientes (Roura, 2001):

- a) La composición de nutrientes (ingredientes de la dieta).
- b) Características físicas de la dieta.
- c) Las situaciones de estrés.
- d) La sanidad ambiental.
- e) La carga de microorganismos de la dieta.

La mejor forma de maximizar el crecimiento y la productividad es un buen estado sanitario. Las diferencias son mucho más grandes cuando las condiciones higiénicas empeoran. De forma similar, los antibióticos en la dieta parecen reducir la frecuencia con que los microorganismos potencialmente patógenos pueden atravesar el epitelio intestinal y prevenir de esta forma el estrés inmunológico (Roura *et al.*, 1992).

La digestión y absorción de nutrientes es un proceso muy complejo en el que diferentes órganos, enzimas, hormonas, nervios y músculos se ven involucrados; además, el sistema digestivo presenta diferencias entre rumiantes y no rumiantes, siendo parte de estas diferencias su dependencia de los microorganismos para digerir eficientemente su alimento. Para los rumiantes, la población bacteriana es necesaria debido a la carencia de enzimas endógenas capaces de degradar carbohidratos como la celulosa o hemicelulosa, que representan alto porcentaje de su dieta habitual; más aun, la masa microbiana que abandona el rumen constituye una de las principales fuentes de proteína para el animal. Para los no rumiantes, la dependencia de la microbiota no es tan estrecha, aunque contrariamente a lo que se podría pensar, la actividad fermentativa en su intestino es de gran importancia desde el punto de vista nutricional. La fermentación en el intestino grueso de los residuos indigestibles del alimento produce, como en el rumen, ácidos grasos de cadena corta que pueden ser absorbidos por el hospedero y ser utilizados como substrato energético por el epitelio intestinal. En cerdas adultas se ha estimado que el 25% de sus necesidades de energía para mantenimiento podrían ser cubiertas por estos productos de la fermentación (Yen *et al.*, 1991).

La secreción bacteriana parece ser capaz de estimular la secreción de enzimas endógenas del animal, pudiendo tener también un papel relevante en la absorción de nutrientes regulando la permeabilidad del epitelio, y también reconocer el papel de las bacterias intestinales en la síntesis de muchas vitaminas, particularmente las del grupo B y vitamina K (Medel *et al.*, 2007).

Las vellosidades y criptas del intestino tienen por objeto maximizar la superficie de absorción de nutrientes, pero también lo convierte en la mayor superficie de contacto del cuerpo con el medio ambiente exterior. Esto representa un constante reto

para el animal que tiene que combatir continuamente contra la colonización de su células y tejidos por diversos microorganismos. Una primera línea de defensa de tipo no inmune es ofrecida por el intestino a tres niveles: la motilidad gastrointestinal, la barrera mucosa y la flora intestinal (Medel *et al.*, 2007).

- a) Motilidad gastrointestinal. El constante peristaltismo del tubo digestivo provoca un flujo continuo y, junto con ella, la mayor parte de los microorganismos, evitando la colonización permanente del intestino. Por otro lado, los jugos gástricos, incluyendo el ácido clorhídrico del estómago, enzimas y productos antimicrobianos secretados por los enterocitos, ofrecen un ambiente desfavorable para el crecimiento de bacterias.
- b) Barrera mucosa. La barrera mucosa es una estructura muy compleja que proporciona una separación física entre la luz intestinal y el epitelio. Está compuesta principalmente por mucinas (mucopolisacáridos y glicoproteínas) secretadas por las células calciformes. La composición estructural de las glicoproteínas es diversa y constituye una variedad de receptores para la adherencia de diferentes bacterias. El flujo continuo del mucus promovido por los movimientos ciliares de las vellosidades y por el peristaltismo intestinal, favorece la eliminación continua de bacterias indeseables previniendo su adhesión al epitelio y su posible invasión; por otro lado, la misma barrera de la mucosa también protege los enterocitos de la agresión física del alimento e incluso de las propias enzimas digestivas.
- c) Flora intestinal. La flora intestinal está constituida por las bacterias comensales que viven íntimamente asociadas al epitelio intestinal. Estos microorganismos actúan como una barrera frente a la colonización de las células del hospedero por patógenos. Esta capacidad se conoce como “exclusión competitiva” y se basa en diversos mecanismos como la competencia por receptores o puntos de unión en el epitelio, la producción de sustancias antimicrobianas, llamadas bacteriocinas, o diversos productos de la fermentación y metabolitos que crean micronichos desfavorables para el crecimiento de patógenos.

La flora intestinal constituye un complejo ecosistema en el que muchas especies de bacterias viven en una relación simbiótica; pero para mantener el organismo joven y sano, es fundamental preservar este equilibrio bacteriano, sobre todo en el intestino, donde se realiza la digestión y asimilación de los nutrientes y la eliminación de los residuos metabólicos, energéticos y neurohormonales (Cabrera y Fadrugas, 2005).

En el caso de los lechones, al nacimiento presentan un sistema digestivo poco desarrollado, y durante las primeras dos o tres semanas de vida, el patrón de producción de enzimas digestivas está adaptado exclusivamente para digerir leche materna; en este tiempo de vida, las enzimas proteolíticas, específicamente pepsina, tripsina y quimotripsina, son responsables de hidrolizar la fracción proteica del alimento, contribuyendo al buen funcionamiento del aparato digestivo en los lechones lactantes (Mejía *et al.*, 2007).

Posteriormente, el destete representa una situación estresante, ya que se da la separación brusca de la madre, la mezcla de camadas, el cambio de ambiente o corral, y el cambio a una dieta sólida y, en la mayoría de los casos, de difícil digestibilidad para el animal. La grasa, la lactosa y la caseína de la leche son sustituidos por carbohidratos y proteínas complejas, en su mayoría de origen vegetal. Como consecuencia, la primera semana tras el destete se reduce la ingestión y se movilizan las escasas reservas corporales con que cuenta el animal a esta edad. Los primeros días tras el destete son también críticos por la reducción de la longitud de los *villi*, incrementándose la proporción de enterocitos inmaduros y por lo tanto se reduce la capacidad enzimática de la mucosa. Como consecuencia, disminuye la concentración de *Lactobacillus* y prolifera *E. coli* ante la presencia de sustratos fácilmente fermentables en el intestino grueso (almidón y proteína); este conjunto de factores representa un elevado riesgo de padecer problemas en la digestión y absorción de nutrientes, desencadenando problemas entéricos y diarreas mecánicas, que no harán otra cosa que agravar la situación. El aporte desde el inicio del destete de bacterias acidolácticas con alta capacidad de proliferación, mejora la adaptación de los lechones a su nueva situación,

favorece la proliferación de otros microorganismos benéficos y se reduce la proliferación de patógenos (Díaz, 2006).

2.3.2.2. Prebióticos

Gibson y Roberfroid (1995) definieron a un prebiótico como un ingrediente alimenticio no digerible que estimula selectivamente el crecimiento de algunas bacterias del colon. También se definen como ingredientes no digeribles pero si fermentables de la dieta, que producen efectos benéficos estimulando de manera selectiva el crecimiento y la actividad de varios tipos de bacterias en el colon, las que a su vez tienen la propiedad de elevar el potencial de salud del huésped (De las Cagigas y Blanco, 2002).

Los oligosacáridos no digestibles y los fructo-oligosacáridos son considerados como prebióticos y los de mayor importancia, ya que se consideran como estimulantes del crecimiento de bifidobacterias y lactobacilos, pero no así para el crecimiento de organismos nocivos como clostridios y coliformes. Los lactobacilos y bifidobacterias utilizan los oligosacáridos y los fructo-oligosacáridos que llegan al colon para producir ácidos grasos y liberar minerales que pueden ser aprovechados por el hospedero (Figueroa *et al.*, 2006).

De todos los prebióticos disponibles, de los únicos que hay estudios para ser clasificados como alimentos funcionales son las fructanas tipo inulina, las cuales son unidas por enlaces β para limitar su digestión por las enzimas intestinales y las fructo-oligosacaridasas. Ambas sustancias se encuentran en el trigo, cebolla, achicoria, ajo, alcachofas y plátanos (Quera *et al.*, 2005).

También se encuentran otros prebióticos, como los subproductos del trigo que tienen altas cantidades de oligofructosa (salvado 0.40%, germen 0.47% y acemite 0.51%); además, se encuentran en la pasta de cacahuete (0.24%), harina de alfalfa (0.22%), cebada (0.19%) y trigo integral (0.14%). Por otro lado, los derivados sintéticos de la lactosa, como la lactulosa (4-0- β -galactopiranosil-D-fructosa) y el lactinol (4-0- β -galactopiranosil-D-glucitol), también entran en este grupo, y son conocidos como galacto-oligosacáridos. Los dos tipos de disacáridos no son absorbidos en el intestino y

son fermentados por la microflora del colon; por lo tanto, disminuyen poblaciones de *Bacteroides*, *Clostridium*, coliformes y *Eubacterium*, y aumenta la población de *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* y *Streptococcus* (Figuroa *et al.*, 2006).

Los fructo-oligosacáridos son carbohidratos de reserva y pueden ser sintetizados a partir de sacarosa. Las bifidobacterias son capaces de digerirlos ya que producen la enzima β -fructofuranosidasa. Estos carbohidratos no pueden ser digeridos porque tienen enlaces β 2-1; esta característica los define como oligosacáridos no digestibles. Por lo mismo, al tener estos enlaces, no son capaces de difundir a través de la mucosa intestinal y son resistentes a la hidrólisis enzimática del intestino, por lo que todos los oligosacáridos no digestibles pueden hacer la función de sustratos para la fermentación bacteriana y aportar energía para el crecimiento microbiano (Figuroa *et al.*, 2006).

En este sentido, se ha demostrado que la proliferación de determinadas bacterias mediante la fermentación de carbohidratos no digeribles puede inhibir la colonización del intestino por patógenos, ejerciendo un efecto protector frente a diversas alteraciones intestinales (Del Moral *et al.*, 2003).

Entre los mecanismos de acción, se pueden destacar las siguientes (Cepero, 2006):

- Sustrato para la microbiota benéfica: los microbios del aparato digestivo son sensibles a los sustratos que llegan vía alimento.
- Bloqueo de bacterias patógenas: ciertos prebióticos se unen y secuestran algunas bacterias potencialmente patógenas, que poseen fimbrias en su superficie capaces de unirse a determinados receptores compuestos por carbohidratos y presentes en la superficie de los enterocitos.
- Producción de sustancias antimicrobianas: los oligosacáridos indigestibles para el animal son fermentados por la microflora y convertidos en ácidos grasos volátiles (ácidos acético, propiónico y butírico) lactato y gases; así, la mejora de la flora intestinal se debe tanto al incremento de las especies benéficas como a la producción

de sustancias antimicrobianas y la acidificación del medio intestinal, con lo que se consigue una reducción directa del crecimiento de patógenos.

- Efecto sobre la mucosa intestinal: los enterocitos tienen un ciclo continuo de proliferación a partir de la maduración y la migración de las células de la cripta intestinal; la ingestión de toxinas o la producción de amonio por la flora intestinal aceleran su descamación, lo que requiere un gasto extra de energía y proteína para el crecimiento y desarrollo de este tejido.

- Estimulación de la respuesta inmune: los microorganismos modulan la respuesta inmune, actuando sobre uno o más de los componentes implicados en la respuesta inmunitaria mediada por citoquinas.

Patterson y Burkholder (2003) mencionan que los prebióticos deben tener las siguientes características:

- No ser absorbidos ni hidrolizados por las enzimas o los tejidos digestivos.
- Que sirvan para enriquecer selectivamente a las bacterias benéficas.
- Que alteren positivamente la microbiota intestinal así como su actividad.

2.3.2.3. Simbióticos

El término simbiótico es usado cuando un mismo producto contiene PRO y prebióticos (Schrezenmeir y De Vrese, 2001), lo cual beneficia al huésped mediante el aumento de la supervivencia e implantación de microorganismos vivos agregados en la dieta en el sistema digestivo (De las Cagigas y Blanco, 2002). Este conjunto es benéfico para el hospedero debido a que las bacterias no patógenas se establecen en el tubo digestivo por la estimulación selectiva de su crecimiento y por la activación del metabolismo de estas bacterias (Figuroa *et al.*, 2006).

La combinación de PRO y prebióticos en una simbiosis ha sido poco estudiada. Se ha descrito un efecto sinérgico entre ambos; es decir, los prebióticos pueden estimular el crecimiento de cepas específicas y, por tanto, contribuir a la proliferación

de una microflora bacteriana con efectos benéficos para la salud del hospedero (De las Cagigas y Blanco, 2002).

2.3.3. Probióticos de la especie *Enterococcus faecium*

Los *Enterococcus spp.* son cocos gram-positivos que no forman endosporas. Son anaerobios facultativos, quimiorganótrofos con metabolismo de tipo fermentativo, y mesófilos. El *Enterococcus faecium* forma parejas o cadenas muy cortas de células; se diferencian de otras especies del género por su capacidad de fermentar arabinosa, melobiosa, rafinosa, sacarosa, celobiosa, galactosa, glucosa y maltosa, con capacidad para producir ácidos a partir del glicerol, y posee actividad a la β -galactosidasa. Puede crecer entre 10 y 45 °C y suele tener su óptimo crecimiento entre 37 y 40 °C, que corresponde a la temperatura intestinal. Además, puede soportar el estrés por sales biliares (puede soportar el estrés en medios hasta con 40% de sales biliares) y sal. Existen dos características que explican el uso de este microorganismo como PRO en la alimentación animal (Medel *et al.*, 2007):

- 1) La capacidad de producir altas concentraciones de ácido láctico.
- 2) La relación habitual de este microorganismo con la flora intestinal.

El *Enterococcus faecium* es capaz de producir grandes cantidades de ácido láctico (L-láctico) a partir de fuentes de carbono fermentables. El ácido láctico es el único producto de fermentación (fermentación homoláctica) y el isómero producido, al contrario de la forma D-láctico, es asimilado por el animal como ácido graso volátil, además de ser un metabolito que contribuye al establecimiento de rangos de pH intestinal que previenen la explosión poblacional de flora potencialmente patógena. El ácido láctico tiene efectos bactericidas y bacteriostáticos en función del pH ambiental, lo que contribuye a mantener el equilibrio poblacional en el intestino de animales sanos. *Enterococcus faecium* es una especie habitual en el tracto digestivo de animales y contribuye al establecimiento de la flora intestinal apropiada en animales sanos. Favorece, entre otros factores, la expansión de la flora ácido-láctica endógena. Es

capaz de adherirse a los enterocitos y puede crecer en el tracto intestinal. La habilidad para que la población inicial PRO aumente en el tracto intestinal resulta muy útil para evitar los problemas clínicos y productivos debido al asentamiento de la flora potencialmente patógena en animales jóvenes que carecen de una flora intestinal madura (Medel *et al.*, 2007).

La presencia de estos PRO restringe la proliferación de flora potencialmente patógena, como *Clostridium*, *Salmonella*, *Campylobacter* o *E. coli* hemorrágicos. Esta propiedad se debe a diversas razones: exclusión competitiva por ocupación del espacio y consumo de nutrientes; síntesis de ácido láctico y en ciertas ocasiones, a la capacidad de síntesis de bacteriocinas, péptidos de pequeño tamaño molecular capaces de inhibir selectivamente el crecimiento de ciertas cepas de especies sensibles. La capacidad de producción de bacteriocinas es una de las novedades de interés para la aplicación de PRO basados en *Enterococcus faecium* en alimentación animal. Al contrario de los PRO esporulados, los *Enterococcus* y el resto de PRO basados en bacterias incapaces de esporular o en levaduras son muy sensibles a las temperaturas altas en los rangos de trabajo habitual en alimentación animal, como las que se observan durante la peletización. Para evitar la pérdida de viabilidad de estos PRO durante el proceso, los fabricantes de este tipo de microorganismos suelen ofrecer productos con la sustancia activa protegida mediante distintos sistemas con el fin de aumentar el rango de temperatura permisible o limitar la sensibilidad celular al estrés térmico (Medel *et al.*, 2007).

En general, estos productos contienen PRO encapsulados en distintas formas: proteínas, carbohidratos o con capas exteriores de células inviables que protegen al núcleo activo del efecto térmico. Adicionalmente, están disponibles otro tipo de productos capaces de ser administrados al alimento o a los animales sin necesidad de tratamientos térmicos: productos para la administración post-granulación o para el uso en líquidos o agua de bebida. Todas las cepas de *Enterococcus faecium* autorizadas por la Unión Europea han superado con éxito los exámenes relacionados con la presencia de determinantes de virulencia o factores genéticos transmisibles de

resistencia a antibióticos, especialmente la resistencia a vancomicina; de esta manera se garantiza la bioseguridad completa de estas cepas (Medel *et al.*, 2007).

Los productos con cepas del género *Enterococcus* son las más abundantes dentro de los aditivos autorizados para la alimentación animal. La especie representada es siempre *Enterococcus faecium*, sin presencia de otras especies del género. La mayor parte de los aditivos se recomiendan para su uso en diferentes categorías de porcinos y aves. Además de los productos que se componen de un sólo microorganismo como sustancia activa, existen mezclas de microorganismos (dos cepas de *Enterococcus faecium* juntas o combinadas con cepas de *Lactobacillus*; Medel *et al.*, 2007).

Cuadro 3. Cepas de PRO de *Enterococcus faecium* autorizadas en la Unión Europea.

Cepa	Especies de destino			
	Porcino	Aves	Vacuno	Otros
<i>Enterococcus faecium</i> NCIMB 10415	x	x	x	Perros Gatos
<i>E. faecium</i> DSM 10663/NCIMB 10415	x	x	x	Perros
<i>E. faecium</i> NCIMB 11181	x	x	x	
<i>E. faecium</i> CECT 4515	x	x		
<i>E. faecium</i> DSM 7134	x	x		
<i>E. faecium</i> DSM 7134	x		x	
<i>E. faecium</i> ATCC 53519		x		
<i>E. faecium</i> ATCC 55593				

Tomado de (Medel *et al.*, 2007).

2.3.3.1. Características y uso de una cepa de *Enterococcus faecium*

La cepa CECT 4515 está registrada en la Unión Europea con el número 18, y fue obtenida mediante un estricto control de fermentación, secado y liofilizado de una cepa benéfica, no manipulada genéticamente y no toxigénica de *Enterococcus faecium*, registrada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) del Departamento de

Microbiología de la Facultad de Biología, en la Universidad de Valencia, con el número CECT 4515 (Norel, 2005). Esta cepa se obtuvo del contenido ileal de animales sanos. Las células de *Enterococcus faecium* CECT 4515 tienen en general forma esférica, presentándose principalmente en parejas y en cadenas cortas. Es una bacteria gram-positiva, inmóvil, mesófila y no esporulada. Está compuesta únicamente de células vegetativas liofilizadas, en una concentración mínima garantizada de 10^9 UFC g^{-1} . Este producto, mediante su adecuada protección, se encuentra termoestabilizado, lo que le permite mantener su viabilidad a temperaturas y tiempos habituales de granulación. Su presentación como producto liofilizado incrementa aun más esta termorresistencia, y garantiza un período de viabilidad de 12 meses (Norel, 2005). Está recomendada para animales no rumiantes (Cuadro 4).

Cuadro 4. *Enterococcus faecium* CECT 4515 está recomendado para la alimentación de las siguientes especies animales y etapas:

Especie animal	Etapas	Dosis (UFC Kg alimento ⁻¹)
Cerdos	Preiniciación e iniciación	1 – 1.5 Kg × 10 ⁹
Aves	Crecimiento y finalización	0.5 – 1 kg × 10 ⁹

UFC = Unidades formadores de colonias

Debido a que la *Enterococcus faecium* no es absorbida por los animales, no requiere periodo de retirada ya que no deja residuos en los productos de origen animal. Asimismo, como se encuentra de forma natural en el aparato digestivo de diferentes especies animales, una vez excretado no presenta riesgos para el medio ambiente (Norel, 2005).

2.3.3.2. Uso de *Enterococcus faecium* en la alimentación animal

La investigación realizada por muchos investigadores avala la eficacia de los PRO como aditivos promotores de la productividad animal; sin embargo, cabe destacar la amplia variabilidad que se da en los resultados, probablemente debido a los

mecanismos de acción de los mismos. Su efecto será diferente y puede estar en función de los siguientes factores (Medel *et al.*, 2007):

- Microorganismo o cepa.
- Dosis.
- Supervivencia del microorganismo (proceso de producción del alimento en el ambiente del mismo o proceso de producción).
- Microbiota presente en el animal al momento de iniciar el tratamiento.
- Tipo de dieta (digestibilidad, sustrato).
- Estado inmunológico de los animales.
- Condiciones ambientales (estrés, frío, calor, etc.).
- Interacciones con otros aditivos (antibióticos, ácidos orgánicos, etc.).
- Estado fisiológico en que se encuentre el animal a tratar (lechones, reproductoras, engorda).

Díaz (2006) menciona que una vez que el PRO *Enterococcus faecium* es ingerido por el animal, la membrana plasmática celular, compuesta por una capa externa de polisacáridos superpuestos, lo protegen frente a la acción de los ácidos estomacales y biliares. Al llegar al intestino y encontrarse ya en su forma vegetativa activa, se produce una rápida proliferación, siendo uno de los microorganismos de mayor capacidad de multiplicación (Cuadro 5), llegando a duplicar sus poblaciones en menos de 20 minutos.

Según Díaz (2006), *Enterococcus faecium* actúa de la siguiente manera:

- a) La rápida capacidad de multiplicación y de adherencia a las paredes de la mucosa intestinal, provocando el llamado efecto barrera, es decir, impide la fijación de enterobacterias sobre los receptores epiteliales de la mucosa,

preservando su integridad; de esta forma, las enterobacterias permanecen en suspensión y son eliminadas a través de las heces.

Cuadro 5. Tiempo de duplicación de diferentes microorganismos y *E. faecium*.

Microorganismo	Tiempo de duplicación (minutos)
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	64
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	40
<i>Streptococcus thermophilus</i>	46
<i>Enterococcus faecium</i>	19
<i>Escherichia coli</i>	18 – 20
<i>Bacillus subtilis</i>	60
<i>Sacharomyces cerevisiae</i>	200

Tomado de: Díaz (2006).

- b) Una vez formada la barrera intestinal, las poblaciones de *Enterococcus spp.* que han proliferado inician su actividad metabólica, empleando como sustrato nutrientes fácilmente fermentables y aquellos componentes de la dieta no digeribles por el animal, produciendo AGVs que serán absorbidos como fuente de energía; entre ellos se da una importante producción de ácido L-láctico. La producción de ácido láctico provoca una reducción del pH a nivel intestinal, mayor cuanto mayor sea la proliferación, que inhibe el crecimiento de bacterias patógenas, ya que tienen su óptimo crecimiento a pH neutro, e incrementa el crecimiento de las bacterias lácticas que precisan rangos de pH ácidos para su óptimo desarrollo. Además, el ácido láctico presenta un importante efecto bacteriostático, ya que este penetra sin disociar a través de la membrana de las bacterias patógenas, y en el interior de las mismas se produce la disociación; una vez disociado en el interior de la célula, el lactato disminuye la síntesis proteica endógena, y el protón reduce el pH intracelular incrementando las necesidades energéticas del organismo patógeno para mantener su

metabolismo; por tanto inhibe el crecimiento de microorganismos patógenos en el animal.

- c) Uno de los resultados más importantes es el desplazamiento de la flora intestinal hacia grupos bacterianos acidófilos y productores de ácido láctico. Como consecuencia de la reducción del pH a nivel intestinal, se produce un incremento en la producción de pepsina endógena que, asociada a la alta capacidad de producción de proteasas por la flora ácido láctica (*Enterococcus faecium*), mejora la digestibilidad de la proteína alimentaria y reduce la excreción de nitrógeno en heces. Junto con la proteasa, las bacterias ácido lácticas presentan capacidad productora de otros tipos de enzimas como amilasas, maltasas y disacaridasas, relacionadas con el metabolismo energético tanto del animal como de la flora intestinal. Si la digestibilidad del almidón por el animal es baja, se produce un incremento del mismo a nivel cecal, siendo empleado como sustrato por los microorganismos patógenos; cuando el nivel de almidón como sustrato se reduce, las bacterias ácido lácticas son capaces de emplear otros carbohidratos como fuente energética (oligosacáridos) que las poblaciones patógenas no metabolizan.

Los beneficios de *Enterococcus faecium* sobre la salud intestinal en lechones, se pueden observar en las pruebas realizadas para la obtención del registro definitivo en la Unión Europea. Analizados los resultados del conjunto de experimentos con lechones destetados a las 3-4 semanas hasta las 8-10 semanas de vida, comparando dietas estándar frente a la misma dieta con la inclusión de 1 kg por tonelada de *Enterococcus faecium* CECT 4515 en alimento para lechones, se obtuvieron diferencias significativas ($P=0.0285$) para la ganancia de peso (390 g vs 418 g) con incrementos del 7%, y tendencia ($P= 0.1$) en la conversión alimenticia (1.60 vs 1.55), reduciendo el consumo de alimento por kg de ganancia en más de 3% (Cuadro 6).

Cuadro 6. Parámetros productivos en lechones de 26 a 62 días de edad alimentados con *Enterococcus faecium*.

Tratamiento	GDP, g	COA d ⁻¹ g	CA, g g ⁻¹
T1 testigo	390 b	622	1.60 x
T2 <i>E. faecium</i> 1000 ppm	418 a	646	1.55 y

Tomado de Díaz (2006).

En otra investigación, Díaz (2007) analizó y comparó los efectos de la inclusión de ZnO con el PRO *Enterococcus faecium* CECT 4515, sobre las variables productivas y su repercusión en la flora intestinal. Encontró que la adición de PRO a las dietas no mostró diferencias en los parámetros productivos, ni en la consistencia de las heces como valoración de la diarrea, frente al empleo de ZnO. Además, no se observó efecto inhibitorio del ZnO sobre la flora láctica en lechones, ni sobre la estabilidad intestinal del PRO en lechones a nivel intestinal. Por tanto, la adición de este producto en dietas para lechones puede realizarse independientemente de que el alimento incluya o no ZnO. Sin embargo, sí se observa una mejora en la salud intestinal al incrementar el nivel de flora láctica y reducirse la incidencia de *E. coli*, con la inclusión del PRO en la dieta, especialmente a nivel ileal.

III. JUSTIFICACIÓN

Actualmente se requiere evitar el uso de antibióticos como promotores del crecimiento en cerdos, por lo que es necesaria la búsqueda de alternativas que mantengan o mejoren las variables productivas y hacer más rentable la producción porcícola.

Una manera de atacar esto es maximizar la eficiencia de utilización del alimento. Con el uso de dietas con baja proteína se puede minimizar el costo de producción y obtener el mismo rendimiento productivo y, además, se reduce la excreción de compuestos nitrogenados al medio ambiente, problema que en la actualidad es de preocupación para todo el mundo.

Por lo tanto, con esta investigación se pretende dar a conocer el uso de PRO como alternativa a los antibióticos como promotores de crecimiento, y por otro lado demostrar que el uso de dietas con baja proteína es una alternativa viable para usarlo en las explotaciones, disminuyendo los costos de alimentación, manteniendo la misma producción y reduciendo la contaminación del medio ambiente.

IV. OBJETIVO

Evaluar el efecto del PRO *Enterococcus faecium* adicionado a dietas estándar y con baja proteína sobre el comportamiento productivo, las características de la canal, la concentración de urea en plasma, y concentración de la población microbiana total y de *Enterococcus faecium* en heces de cerdos en iniciación, crecimiento y finalización alimentados con dietas a base de sorgo-pasta de soya.

V. HIPÓTESIS

El uso del PRO *Enterococcus faecium* en la alimentación de los cerdos maximiza la digestión del alimento y la inmunidad; con esto se mejora la velocidad de crecimiento y se reduce la mortalidad en los cerdos, por lo tanto, el comportamiento productivo aumenta.

Agregar PRO a dietas sorgo-pasta de soya con baja proteína adicionada con AA sintéticos mejora la respuesta productiva de cerdos en engorda y mantiene las características de la canal, en comparación con cerdos alimentados con proteína estándar.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

Esta investigación se realizó en las instalaciones de la Unidad Porcina de la Granja Experimental del Colegio de Postgraduados, localizada en el municipio de Tecámac, Estado de México, ubicado entre los 19° 56' de latitud norte y 98° 56' de longitud oeste, y a una altitud de 2260 msnm. El clima es seco, semiárido con régimen de lluvias en verano, con temperatura media anual de 14.59 °C y precipitación anual de 549.88 mm (García, 1988). Los experimentos se realizaron en los meses de noviembre y diciembre de 2008, y enero y febrero de 2009.

6.1. Tratamientos evaluados

Las dietas (tratamientos) evaluadas consistieron en dos niveles de proteína (estándar y con baja proteína) por cada etapa de desarrollo, con y sin PRO (Cuadro 7). Las dietas estándar y con baja proteína fueron formuladas con base a sorgo-pasta de soya, y fueron obtenidas en investigaciones anteriores para cerdos en iniciación (Trujillo *et al.*, 2007), crecimiento (Martínez *et al.*, 2009) y finalización (Figuroa *et al.*, 2008). Las dietas con baja proteína se adicionaron con AA sintéticos (L-Lisina-HCL, DL-Metionina, L-Triptófano y L-Treonina) hasta alcanzar los niveles recomendados por el NRC (1998) de la dieta estándar; el nivel de energía (3.265 Mcal kg⁻¹) se mantuvo constante para todos los tratamientos y etapas (Cuadros 8, 9 y 10). El antibiótico solo se adicionó a las dietas en iniciación y a los tratamientos que no tenían probiótico.

6.2. Variables evaluadas

Se evaluó la respuesta productiva (ganancia diaria de peso, GDP; consumo de alimento, COA; conversión alimenticia, CA; y ganancia de carne magra, GCM), las características de la canal (área del músculo *longissimus*, AML; grasa dorsal, GD; porcentaje de carne magra en la canal, %CM), la concentración de urea en plasma, y la concentración de microorganismos totales y del PRO en heces.

6.3. Material experimental y manejo de los animales

Se utilizaron 36 cerdos (machos castrados) híbridos (Landrace×Yorkshire×Duroc), con peso promedio inicial de 11.10±0.51. Los animales se alojaron en corrales individuales de 1.2×1.5 m, con piso de concreto, equipados con comedero tipo tolva y bebedero de chupón. Los corrales se encuentran en dos salas similares con capacidad para 20 corrales individuales cada una. Para cada tratamiento se utilizaron nueve repeticiones, un animal por repetición. El alimento y el agua se ofrecieron *ad libitum* y durante todo el experimento se estuvo pendiente de la limpieza de los corrales y la inspección del estado de salud de los animales.

Cuadro 7. Niveles de proteína cruda (%PC), energía metabolizable y de PRO en las tres etapas.

Tratamientos Iniciación	T1	T2	T3	T4
EM, Mcal kg ⁻¹	3.265	3.265	3.265	3.265
PC, % *	20.5	20.5	16.0	16.0
<i>Enterococcus faecium</i> kg ton ⁻¹	0.0	1.0	0.0	1.0
Tratamientos Crecimiento				
EM, Mcal kg ⁻¹	3.265	3.265	3.265	3.265
PC, % **	16.0	16.0	14.5	14.5
<i>Enterococcus faecium</i> kg ton ⁻¹	0.0	1.0	0.0	1.0
Tratamientos finalización				
EM, Mcal kg ⁻¹	3.265	3.265	3.265	3.265
PC, % ***	14.0	14.0	12.5	12.5
<i>Enterococcus faecium</i> kg ton ⁻¹	0.0	1.0	0.0	1.0

*Nivel de proteína con los cuales no se ve afectado el comportamiento productivo para cerdos en iniciación (Trujillo *et al.*, 2007).

** Nivel de proteína con los cuales no se ve afectado el comportamiento productivo para cerdos en crecimiento (Martínez *et al.*, 2009).

***Nivel de proteína utilizado por Figueroa *et al.* (2008) para cerdos en finalización.

Cuadro 8. Composición (%) de las dietas experimentales utilizadas en iniciación.

INICIACION					
Tratamiento	T1	T2	T3	T4	
Ingrediente, %	Estándar		Baja proteína		
Sorgo	62.52	62.52	75.68	75.735	
Pasta de soya	33.31	33.31	18.96	18.91	
Aceite crudo de soya	1.415	1.415	1.61	1.61	
L-Lisina HCl	0.075	0.075	0.51	0.51	
DL-Metionina	0.02	0.02	0.145	0.150	
L-Triptófano	--	--	0.065	0.065	
L-Treonina	--	--	0.18	0.18	
Premezcla vitamínica ^a	0.125	0.125	0.125	0.125	
Premezcla micromineral ^b	0.125	0.125	0.125	0.125	
Carbonato de calcio	0.865	0.865	0.90	0.895	
Ortofosfato	1.10	1.10	1.25	1.245	
Sal	0.350	0.350	0.350	0.350	
Probiótico <i>Enterococcus faecium</i>	--	0.10	--	0.10	
Antibiótico (oxitetraciclina)	0.10	--	0.10	--	
TOTAL	100.00	100.00	100.00	100.00	
Análisis Calculado (%)					NRC ^c
EM, Mcal kg ⁻¹	3.265	3.265	3.265	3.265	3.265
PC	20.5	20.5	16.0	16.0	20.9
Calcio	0.70	0.70	0.70	0.70	0.70
Fósforo total	0.60	0.60	0.60	0.60	0.60
Fósforo disponible	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32
Lisina	1.02	1.02	1.02	1.02	1.02
Treonina	0.63	0.63	0.63	0.63	0.63
Triptófano	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18
Metionina + Cistina	0.58	0.58	0.58	0.58	0.58
Arginina	0.42	0.42	0.42	0.42	0.42
Histidina	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32
Isoleucina	0.55	0.55	0.55	0.55	0.55
Leucina	1.02	1.02	1.02	1.02	1.02
Valina	0.69	0.69	0.69	0.69	0.69
Fenilalanina + Tirosina	0.95	0.95	0.95	0.95	0.95
Análisis determinado (%)					
PC	21.24	21.24	16.12	16.12	
Calcio	0.77	0.77	0.70	0.70	
Fósforo total	0.46	0.46	0.35	0.35	
Costo dieta, \$ kg⁻¹ ^d	4.13	4.13	4.32	4.32	

^aProporcionó por kg de alimento: vit. A, 15,000 UI; vit. D₃, 2,500 UI; vit. E, 37.5 UI; vit. K, 2.5 mg; tiamina, 2.25 mg; riboflavina, 6.25 mg; niacina, 50 mg; piridoxina, 2.5 mg; cianocobalamina, 0.0375 mg; biotina, 0.13 mg; cloruro de colina, 563 mg; ácido pantoténico, 20 mg; ácido fólico, 1.25 mg.

^bAportó por kg de alimento: Fe, 150 mg; Zn, 150 mg; Mn, 150 mg; Cu, 10 mg; Se, 0.15 mg; I, 0.9 mg; Cr, 0.2 mg.

^cRecomendación de nutrientes sugerida para la etapa de iniciación (10 – 20 kg de peso vivo) por el NRC (1998).

^dCalculado con base a los precios de los ingredientes vigentes en octubre-diciembre de 2008.

Cuadro 9. Composición (%) de las dietas experimentales utilizadas en crecimiento.

CRECIMIENTO					
Tratamiento	T1	T2	T3	T4	
Ingrediente, %	Estándar		Baja proteína		
Sorgo	75.545	75.385	81.10	80.935	
Pasta de soya	21.30	21.30	15.25	15.25	
Aceite crudo de soya	0.78	0.84	0.86	0.925	
L-Lisina HCl	0.205	0.205	0.385	0.385	
DL-Metionina	0.01	0.01	0.065	0.065	
L-Triptófano	--	--	0.03	0.03	
L-Treonina	0.015	0.015	0.09	0.09	
Premezcla vitamínica ^a	0.125	0.125	0.125	0.125	
Premezcla micromineral ^b	0.125	0.125	0.125	0.125	
Carbonato de calcio	0.91	0.91	0.92	0.92	
Ortofosfato	0.735	0.735	0.80	0.80	
Sal	0.25	0.25	0.25	0.25	
Probiótico <i>Enterococcus faecium</i>	--	0.10	--	0.10	
Antibiótico (oxitetraciclina)	--	--	--	--	
TOTAL	100.00	100.00	100.00	100.00	
Análisis Calculado (%)					NRC^c
EM, Mcal kg ⁻¹	3.265	3.265	3.265	3.265	3.265
PC	16.0	16.0	14.5	14.5	18.0
Calcio	0.60	0.60	0.60	0.60	0.60
Fósforo total	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
Fósforo disponible	0.23	0.23	0.23	0.23	0.23
Lisina	0.83	0.83	0.83	0.83	0.83
Treonina	0.52	0.52	0.52	0.52	0.52
Triptófano	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15
Metionina + Cistina	0.47	0.47	0.47	0.47	0.47
Arginina	0.33	0.33	0.33	0.33	0.33
Histidina	0.26	0.26	0.26	0.26	0.26
Isoleucina	0.45	0.45	0.45	0.45	0.45
Leucina	0.83	0.83	0.83	0.83	0.83
Valina	0.56	0.56	0.56	0.56	0.56
Fenilalanina + Tirosina	0.78	0.78	0.78	0.78	0.78
Análisis determinado (%)					
PC	16.21	16.21	14.20	14.20	
Calcio	0.65	0.65	0.60	0.60	
Fósforo total	0.32	0.32	0.37	0.37	
Costo dieta, \$ kg^{-1d}	3.57	3.70	3.65	3.78	

^aProporcionó por kg de alimento: vit. A, 15,000 UI; vit. D₃, 2,500 UI; vit. E, 37.5 UI; vit. K, 2.5 mg; tiamina, 2.25 mg; riboflavina, 6.25 mg; niacina, 50 mg; piridoxina, 2.5 mg; cianocobalamina, 0.0375 mg; biotina, 0.13 mg; cloruro de colina, 563 mg; ácido pantoténico, 20 mg; ácido fólico, 1.25 mg.

^bAportó por kg de alimento: Fe, 150 mg; Zn, 150 mg; Mn, 150 mg; Cu, 10 mg; Se, 0.15 mg; I, 0.9 mg; Cr, 0.2 mg.

^cRecomendación de nutrientes sugerida para la etapa de crecimiento (20 - 50 kg de peso vivo) por el NRC (1998).

^dCalculado con base a los precios de los ingredientes vigentes en octubre-diciembre de 2008.

Cuadro 10. Composición (%) de las dietas experimentales utilizadas en finalización.

FINALIZACION					
Tratamiento	T1	T2	T3	T4	
Ingrediente, %	Estándar		Baja proteína		
Sorgo	83.55	83.39	87.96	87.795	
Pasta de soya	14.0	14.0	9.25	9.25	
Aceite crudo de soya	0.355	0.415	0.40	0.46	
L-Lisina HCl	0.205	0.205	0.345	0.345	
DL-Metionina	--	--	0.035	0.035	
L-Triptófano	--	--	0.015	0.02	
L-Treonina	0.01	0.01	0.07	0.07	
Premezcla vitamínica ^a	0.125	0.125	0.125	0.125	
Premezcla micromineral ^b	0.125	0.125	0.125	0.125	
Carbonato de calcio	0.78	0.78	0.80	0.80	
Ortofosfato	0.60	0.60	0.625	0.625	
Sal	0.25	0.25	0.25	0.25	
Probiótico <i>Enterococcus faecium</i>	--	0.10	--	0.10	
Antibiótico (oxitetraciclina)	--	--	--	--	
TOTAL	100.00	100.00	100.00	100.00	
Análisis Calculado (%)					NRC ^c
EM, Mcal kg ⁻¹	3.265	3.65	3.265	3.265	3.265
PC	14.0	14.0	12.5	12.5	15.5
Calcio	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
Fósforo total	0.45	0.45	0.45	0.45	0.45
Fósforo disponible	0.19	0.19	0.19	0.19	0.19
Lisina	0.66	0.66	0.66	0.66	0.66
Treonina	0.43	0.43	0.43	0.43	0.43
Triptófano	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12
Metionina + Cistina	0.39	0.39	0.39	0.39	0.39
Arginina	0.24	0.24	0.24	0.24	0.24
Histidina	0.21	0.21	0.21	0.21	0.21
Isoleucina	0.37	0.37	0.37	0.37	0.37
Leucina	0.67	0.67	0.67	0.67	0.67
Valina	0.45	0.45	0.45	0.45	0.45
Fenilalanina + Tirosina	0.63	0.63	0.63	0.63	0.63
Análisis determinado (%)					
PC	13.90	13.90	12.60	12.60	
Calcio	0.71	0.71	0.74	0.74	
Fósforo total	0.33	0.33	0.32	0.32	
Costo dieta, \$ kg⁻¹ ^d	3.26	3.38	3.29	3.43	

^aProporcionó por kg de alimento: vit. A, 15,000 UI; vit. D₃, 2,500 UI; vit. E, 37.5 UI; vit. K, 2.5 mg; tiamina, 2.25 mg; riboflavina, 6.25 mg; niacina, 50 mg; piridoxina, 2.5 mg; cianocobalamina, 0.0375 mg; biotina, 0.13 mg; cloruro de colina, 563 mg; ácido pantoténico, 20 mg; ácido fólico, 1.25 mg.

^bAportó por kg de alimento: Fe, 150 mg; Zn, 150 mg; Mn, 150 mg; Cu, 10 mg; Se, 0.15 mg; I, 0.9 mg; Cr, 0.2 mg.

^cRecomendación de nutrientes sugerida para la etapa de finalización (50 - 85 kg de peso vivo) por el NRC (1998).

^dCalculado con base a los precios de los ingredientes vigentes en octubre-diciembre de 2008.

Se midió semanalmente el cambio de peso de los cerdos y el consumo de alimento, para estimar la ganancia diaria de peso y la conversión alimenticia. Para determinar la concentración de urea en plasma, se tomaron muestras de sangre en el día inicial y final de cada etapa por medio de punción en la vena cava utilizando tubos vacutainer con heparina; las muestras se colocaron en hielo hasta que fueron centrifugadas a 2500 rpm (1286 g) durante 20 minutos para separar el plasma y las células sanguíneas. Una vez centrifugado, el sobrenadante se transfirió a tubos de polipropileno y se mantuvieron a -20 °C hasta realizar las determinaciones de urea.

También el primero y el último día de cada etapa se midieron la grasa dorsal y el área del músculo *longissimus* a nivel de la décima costilla utilizando un ultrasonido de tiempo real Sonovet 600 con transductor abdominal de 3.5 MHz (Medison, Inc., Cypress, California, USA). Esta última información sirvió para estimar la ganancia de carne magra y el porcentaje de carne magra en la canal utilizando la ecuación del NPPC (1991), junto con el peso inicial y el peso final de cada etapa. Para complementar el muestreo también se obtuvieron muestras de heces en estos mismos tiempos, tomando una muestra de aproximadamente 100 g directamente del ano del cerdo mediante la técnica de estimulación anal. Las muestras se colocaron en hielo y posteriormente se conservaron en congelación a -20 °C hasta realizar la medición de la concentración de microorganismos viables.

6.4. Análisis de laboratorio

En el Laboratorio de Nutrición Animal del Programa de Ganadería del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, se determinó lo siguiente en las dietas: proteína cruda por el método de Kjeldahl (AOAC, 1990); calcio por medio de espectrofotometría de absorción atómica y fósforo por medio de espectrofotometría de absorción de rayos UV, siguiendo las metodologías de Fick *et al.*, (1979). La determinación de la concentración de urea en plasma se realizó por espectrofotometría de absorción de rayos UV, de acuerdo a la metodología de Chaney y Marbach (1962).

6.4.1. Análisis microbiológico

La determinación de microorganismos en heces se realizó en el laboratorio de Microbiología del Rumen del Programa de Ganadería, Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo.

La técnica utilizada para determinar la concentración de *Enterococcus faecium* en heces fue por conteo de bacterias viables, y para la determinación de la concentración total de bacterias en heces fue por conteo directo.

1) Técnica de conteo de bacterias viables

Equipo:

- Campana de Gauss de flujo laminar, Modelo 32204/32205 Tipo A/B3.
- Agitador Vortex Modelo G-560. VWR Scientific Products.
- 150 Tubos de ensaye de 18*150 mm Pirex No. 9820.
- 2 Vaso de precipitados de 100 ml Kimax No. 14000.
- Pipetas de 10 ml Kimax® No.51
- Probetas de 50 ml
- 150 Puntas azules
- Autoclave Tuttnaver/Brinkmann® mod-2540 E.
- Cajas petri de 100*15 mm.
- Rastrillos
- Báscula Equipar ITEM No. E12140.
- Gradilla metálica.
- Tapones de hule No.1.
- Estufa Rioson® mod-tc-62.
- Contador de colonias BG Lab.
- Matraz Erlenmeyer de 500 mL Kimax®.

Reactivos:

- 250 ml de solución mineral 1 (Cobos *et al.*, 2007)
- 250 ml de solución mineral 2. (Bryant, 1972; Cobos *et al.*, 2007)
- Muestras de heces.
- Agar selectivo 17185 m-Enterococcus Agar.
- Agua destilada

Preparación de la solución mineral:

- Se prepararon 4.5 litros de solución mineral para hacer las diluciones, se utilizó 1.5 litros por cada etapa
- Para preparar 1.5 litros de solución, se utilizó 1.35 litros de agua destilada, y se le agregaron 75 ml de solución mineral 1, más 75 ml de solución mineral 2 y se agitó.

Metodología:

- Preparar una solución acuosa de 15 gr de Agar selectivo m-Enterococcus Agar por cada litro de agua destilada, se pusieron aproximadamente 15 ml en cada caja de petri y se pusieron a incubar por 24 horas a 38 °C.
- Preparar una solución mineral, con 90 ml de agua destilada, 5 ml de solución mineral 1 más 5 ml de solución mineral 2 por cada 100 ml de solución mineral.
- Se esterilizó en autoclave todo el material a utilizar junto con la solución mineral, a 121 °C, 15 PSI durante 20 minutos.
- Para hacer todo el proceso de dilución y sembrado de muestras, se realizaron en la campana de Gauss, como medio estéril para que los medios no se contaminen.
- Se pusieron las heces a descongelar, posteriormente se pesó 1 g de cada muestra de heces, se pusieron en un tubo de ensayo y se le agregaron 9 ml de la solución mineral, se agitaron con la ayuda del Vortex, se dejaron sedimentar por 15 minutos, pero cada 5 minutos se agitó con el Vortex. Una vez teniendo la primera solución, se tomó 1 ml y se diluyó en otros 9 ml de solución mineral, y así sucesivamente hasta tener 5 diluciones.
- Después se tomaron 0.2 ml de la última dilución con las puntas azules y se sembraron en la caja de petri para hacer una homogenización con la ayuda del rastrillo.
- Se hicieron los sembrados de todas las muestras y se incubaron por 72 horas a 38 °C.
- Después de este tiempo, se realizó el conteo de las colonias de cada caja de petri, con el contador de colonias.

- Una vez teniendo el número de colonias se hizo el cálculo de la concentración de colonias de cada muestra.

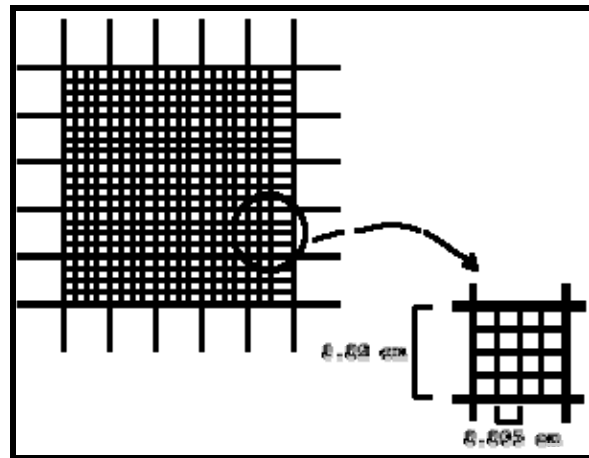
2) Técnica de conteo directo

Se utilizaron los mismos reactivos, equipos y la solución mineral tal como se utilizaron en la técnica de conteo de bacterias viables.

Metodología:

- a) Se preparó una solución mineral, con 90 ml de agua destilada, 5 ml de solución mineral 1 más 5 ml de solución mineral 2 por cada 100 ml de solución mineral.
- b) Se esterilizó en autoclave todo el material a utilizar junto con la solución mineral, a 121 °C, 15 PSI durante 20 minutos.
- c) Para hacer todo el proceso de dilución y sembrado de muestras, se realizaron en la campana de Gauss, como medio estéril para que los medios no se contaminen.
- d) Se pusieron las heces a descongelar, posteriormente se pesó 0.1 g de cada muestra de heces, se pusieron en un tubo de ensaye y se agregaron 5 ml de la solución mineral, se agitaron con la ayuda del Vortex, se dejaron sedimentar por 15 minutos, pero cada 5 minutos se agitaron con el Vortex. Una vez teniendo la primera solución, se tomó 1 ml y se diluyó en otros 4 ml de solución mineral quedando las 2 diluciones.
- e) Después se tomó 0.1 ml aproximadamente de la última dilución y se colocó en la cámara Petroff-Hauser, se colocó el cubreobjetos y se agregó la solución en el borde del cubreobjetos, rellenando la cámara de recuento por capilaridad; se añadió aceite de inmersión y se observó al microscopio a 100x. El conteo se realizó de manera directa en las 4 esquinas de la cuadrícula pequeña de la cámara (Figura 2).
- f) Una vez teniendo el número de colonias se hizo el cálculo de la concentración de bacterias por g de heces de cada tratamiento.

Figura 2. Cuadrícula de la cámara de Petroff-Hauser, usada para el conteo directo de bacterias.



6.5. Análisis estadístico y diseño experimental

El diseño utilizado fue completamente al azar con arreglo factorial 2x2, con 9 repeticiones por tratamiento, en donde el factor A fue el nivel de proteína en la dieta (estándar o baja proteína) y el factor B fue el nivel de adición de PRO (con y sin). Se utilizó el mismo diseño para las tres etapas.

Para el caso de los análisis microbiológicos también se realizó el análisis estadístico bajo este mismo diseño. Para la realización del análisis estadístico los datos de las UFC y de la concentración de bacterias g^{-1} en *Enterococcus spp.* fueron convertidos a logaritmo base 10.

El análisis de varianza se realizó utilizando el procedimiento GLM de SAS (1998), utilizando el diseño mencionado anteriormente; cada cerdo fue considerado como una unidad experimental. Cuando se observaron diferencias significativas entre tratamientos, se realizó una comparación de medias mediante la prueba de Tukey. En caso de que el peso inicial presentara efecto significativo, este se utilizó como covariable y los promedios se obtuvieron mediante el procedimiento *lsmeans* de SAS.

Modelo del diseño completamente al azar:

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + (AB)_{ij} + E_{ijk}$$

Donde:

Y_{ijk} = Variable de respuesta

μ = Media general

A_i = Efecto del factor A al nivel i (dieta estándar y dietas bajas en proteína).

B_j = Efecto del factor B al nivel j (nivel de adición de probiótico).

$(AB)_{ij}$ = Efecto de la interacción AB al nivel i, j.

E_{ijk} = Error experimental

VII. RESULTADOS

Los resultados obtenidos se presentan por etapa de crecimiento de los cerdos en experimentación.

7.1. Iniciación

Los resultados de las variables evaluadas durante la fase de iniciación se presentan en los cuadros 11 y 12. No se observaron diferencias entre tratamientos ($P>0.05$) para la GDP, COA, CA, PI y PF por el efecto del PRO o por la interacción PC×PRO, pero sí se observó una tendencia ($P=0.07$) a reducirse la GCM por efecto de la adición del PRO. Por otro lado, al realizar la comparación de medias tampoco se observaron diferencias ($P>0.05$) por el nivel de PC.

En cuanto a las características de la canal, sólo se observó un efecto negativo de la adición del PRO a la dieta sobre el AMLF ($P\leq 0.05$), ya que esta variable disminuyó en cerdos alimentados con dieta adicionada con el probiótico (Cuadro 12).

La concentración de urea en plasma fue afectada por el nivel de proteína de la dieta ($P\leq 0.01$), observándose una reducción de 48.91% en las dietas con 16.0% de PC comparadas con las dietas que contenían 20.5% de PC. En cuanto al nivel del PRO, no se observó efecto de la adición del probiótico sobre la concentración de urea en plasma ($P>0.05$).

7.2. Crecimiento

En los cuadros 13 y 14 se presentan los resultados de las variables evaluadas en cerdos en crecimiento. El comportamiento productivo no fue afectado por el nivel del PRO en la dieta o por la interacción PC×PRO ($P>0.05$); sin embargo, se observó una tendencia ($P=0.07$) a incrementar el COA por la interacción PC×PRO.

En las características de la canal sólo se observaron tendencias ($P=0.06$) por parte del AMLF a incrementar por la adición del PRO y por efecto de la PC, no así por la interacción PC×PRO ($P>0.05$).

La concentración de urea en plasma mostró diferencias ($P\leq 0.01$) por efecto del nivel de PC en la dieta. El nivel de PC produjo una disminución de 18.96% en las dietas con 14.5% de PC comparadas con las dietas que contenían 16.0% de PC. El nivel de PRO en la dieta no afectó la concentración de urea en plasma ($P>0.05$).

7.3. Finalización

En esta etapa no se observaron efectos ($P>0.05$) de la adición del PRO en la dieta o por la interacción de PC×PRO sobre el comportamiento productivo o las características de la canal (Cuadros 15 y 16).

La concentración de urea en plasma sólo fue diferente ($P\leq 0.01$) por el nivel de PC en la dieta, ya que se observó una reducción de 21.59% en las dietas con 12.5% de PC comparadas con las dietas que contenían 14.0%. El nivel del PRO no afectó ($P>0.05$) la concentración de urea en plasma.

7.4. Concentración de bacterias de *Enterococcus spp.* y totales en heces

Se determinó la concentración de bacterias con base al número de colonias (UFC g^{-1}) contadas para cada muestra y se analizaron estadísticamente por cada etapa.

7.4.1. Iniciación

De acuerdo a los resultados obtenidos en esta etapa (cuadro 17) para la determinación de la concentración de *Enterococcus spp.*, se observaron diferencias significativas ($P\leq 0.05$) en los tratamientos 3 y 4 ($P=0.03$) y una tendencia a ser diferente entre los tratamientos 1 y 4 ($P=0.09$). Del mismo modo, la tendencia ($P=0.09$)

indica que es mayor la concentración de bacterias en el tratamiento 4, al cual se le adicionó PRO, esto sin tomar en cuenta los niveles de proteína en la dieta.

7.4.2. Crecimiento

En esta etapa también se observaron diferencias significativas ($P \leq 0.05$) entre los tratamientos 1 y 2 ($P \leq 0.01$), 1 y 4 ($P \leq 0.01$), y entre los tratamientos 2 y 3 ($P \leq 0.01$), y 3 y 4 ($P = 0.02$), con lo que se confirma lo encontrado en la etapa de iniciación, que a medida que se le agrega PRO a las dietas, varía la concentración de bacterias del mismo género.

7.4.3. Finalización

En la etapa de finalización se observaron diferencias significativas ($P \leq 0.05$) entre los tratamientos 2 y 3 ($P = 0.03$), 3 y 4 ($P = 0.03$), y tendencias a la significancia entre los tratamientos 1 y 2 ($P = 0.08$), y 1 y 4 ($P = 0.06$), similar a lo encontrado en las etapas previas.

Para hacer la comparación de la concentración de bacterias totales y concentración de bacterias de *Enterococcus spp.* totales en las heces por etapa productiva, se determinó la cantidad total de bacterias y se calculó el % de *Enterococcus spp.* con respecto a la cantidad total (Cuadro 20).

El % de bacterias *Enterococcus spp.* es pequeño en comparación con la concentración total de microorganismos encontrados en las heces, lo que indica que la flora microbiana se compone de varios géneros de bacterias con altas concentraciones.

VIII. DISCUSIÓN

8.1. Iniciación

Los resultados obtenidos indican que al reducir en cuatro unidades porcentuales la PC, con o sin adición de PRO en dietas con base sorgo-pasta de soya, no se disminuye el comportamiento productivo de los cerdos, comparado con aquellos alimentados con dietas con niveles recomendados para esta etapa. Según Trujillo *et al.* (2007), es posible mantener un rendimiento productivo aceptable reduciendo hasta más de 6 unidades porcentuales la PC en dietas con base en sorgo-pasta de soya. Brudevold y Southern (1994) concluyeron que cuando se reduce la cantidad de proteína en dietas para cerdos en la etapa de iniciación y se adicionan lisina, metionina, treonina, triptófano, histidina, isoleucina, y valina, se obtiene un comportamiento productivo similar al de los cerdos que son alimentados con dietas con 19 y 21% de PC. Estos resultados son parecidos a los que obtuvieron Le Bellego y Noblet (2002) que alimentaron cerdos de 12 a 27 kg por 22 días con dietas a base de trigo-maíz-cebada con 5.5 unidades porcentuales menos de PC, adicionando lisina, metionina, treonina, triptófano, valina e isoleucina, y no observaron diferencias en la GDP; lo mismo ocurrió con un experimento que realizó Mavromichalis *et al.* (1998) al disminuir en 5.7 unidades porcentuales la PC en dietas a base de maíz-pasta de soya adicionadas con lisina, metionina, treonina, triptófano y valina, ya que no encontraron diferencias en la GDP, COA y CA en los cerdos alimentados con este tipo de dieta comparados con cerdos alimentados con dietas estándar.

En este experimento, el nivel del PRO en la dieta no afectó el comportamiento productivo ($P > 0.05$); sólo hubo una tendencia ($P = 0.07$) en GCM, lo cual coincide con el trabajo realizado por Díaz (2006) en el cual no encontró diferencias en los parámetros productivos en cerdos en iniciación alimentados con el PRO *Enterococcus faecium*. Ambos trabajos difieren de los resultados reportados por Norel (2005) en el cual encontró diferencias significativas ($P \leq 0.05$) al alimentar lechones postdestete con el mismo PRO por tres semanas y aumentó la GDP en 9.6% y mejoró de CA de 5%. En cuanto a las características de la canal, no hubo diferencias significativas, sólo el AMLF

presentó efecto ($P \leq 0.05$) con una disminución en el tratamiento que no contenía PRO. Lo mismo encontraron Trujillo *et al.* (2007) en cuanto a las características de la canal. Tampoco se observaron diferencias por la interacción de PC×PRO entre los tratamientos.

En cuanto al nivel de urea en plasma, se observó una reducción muy marcada al disminuir 4 unidades porcentuales la PC en las dietas, bajando este metabolito en 48.91% en la dieta con 16% de PC, independientemente de la adición de PRO. Resultados similares obtuvieron Trujillo *et al.* (2007), quienes observaron una reducción lineal de la urea en plasma al disminuir 6 unidades porcentuales la PC en dietas sorgo-pasta de soya. Le Bellego y Noblet (2002) encontraron una disminución de 42% en la excreción de nitrógeno al reducir la proteína en 5.5 unidades porcentuales, lo cual sugiere una mejor utilización del nitrógeno en DBP suplementadas con AA sintéticos; esto indica que existe una mejor utilización del nitrógeno: seguramente con 16% de PC se da el balance óptimo entre aminoácidos para tener un óptimo crecimiento en los cerdos en esta etapa (Trujillo *et al.*, 2007).

8.2. Crecimiento

Cuando se disminuyó la PC de 16.0 a 14.5% no se observaron diferencias significativas en el comportamiento productivo con o sin inclusión de PRO en la dieta. Resultados similares encontraron Tuitoek *et al.* (1997) cuando alimentaron cerdos de 20 a 55 kg de peso, con dietas reducidas en 3.6 unidades porcentuales de PC y no encontraron diferencias significativas en las variables productivas.

En otro experimento, Hansen *et al.* (1993) mencionan que alimentar cerdos de 20 a 50 kg con dietas que contengan 14.0% de PC y la adecuada adición de AA sintéticos se obtienen resultados similares a los encontrados con dietas estándar; por lo tanto, estos autores recomiendan un mínimo de 14.0% PC en dietas sorgo-pasta de soya adicionadas con lisina y treonina para cerdos en crecimiento para obtener una respuesta productiva máxima. Martínez *et al.* (2009) también realizaron un trabajo en cerdas en crecimiento y afirman que en esta etapa sólo se puede disminuir la cantidad de PC en 1.5 unidades porcentuales en dietas sorgo-pasta de soya, ya que si la

reducción es de más de 4.5 puntos porcentuales, se afecta negativamente el comportamiento productivo. Esta respuesta sugiere que mayor reducción en la proteína de la dieta incrementa el número de aminoácidos limitantes (Hansen *et al.*, 1993; Figueroa *et al.*, 2003) por lo que se deben considerar otros AA esenciales (valina, isoleucina, histidina) y no esenciales, e incluso otros nutrimentos (Gómez *et al.*, 2002). Sin embargo, otros investigadores reportan que la respuesta productiva no se afecta disminuyendo hasta 4 unidades porcentuales la PC en dietas a base de maíz-pasta de soya (Kerr *et al.*, 2003) o sorgo-pasta de soya (Figueroa *et al.*, 2004).

Según los resultados obtenidos en este trabajo, no hubo efecto del PRO; sólo una tendencia ($P= 0.07$) a incrementar el COA por la interacción PC×PRO. Chiquieri *et al.* (2006) también reportan que no hay efectos sobre el COA, GDP y CA en cerdos en crecimiento y en finalización alimentados con *Saccharomyces cerevisiae* como PRO. Figueroa *et al.* (2003) mencionan que se puede disminuir cinco puntos porcentuales la PC en dietas a base de maíz-pasta de soya, de 16.0 a 11.0% de PC, con adición de AA sintéticos para cerdos en crecimiento, y que no hubo diferencias en la respuesta productiva comparada con cerdos alimentados con dietas estándar, lo cual es similar a los resultados obtenidos en este experimento.

Con respecto a las características de la canal, no se vieron afectadas por factores en estudio, lo cual coincide con lo encontrado por Figueroa *et al.* (2002); sin embargo, algunos resultados difieren de estos, en los cuales al reducir la PC de 3.6 a 5 puntos porcentuales, se incrementó la cantidad de grasa en esta etapa, debido a que existe una mayor retención de energía en forma de grasa con el uso de dietas bajas en proteína (Le Bellego *et al.*, 2001; Gómez *et al.*, 2002)

Como ya se ha mencionado, cuando se reduce la cantidad de PC en la dieta la concentración de urea en plasma también disminuye (Figueroa *et al.*, 2002). En esta investigación, la concentración de urea se redujo, lo que indica que la eficiencia en la utilización de nitrógeno aumenta al reducir la proteína de la dieta, siempre y cuando se agreguen AA sintéticos para no afectar la síntesis de proteína o provocar desequilibrios entre AA (Zervas y Zijlstra, 2002).

8.3. Finalización

En la etapa de finalización ni la respuesta productiva ni las características de la canal fueron afectadas por el nivel de PC en la dieta; se mantuvo el mismo resultado bajando 1.5 unidades porcentuales la concentración de PC (de 14 a 12.5%) en la dieta, lo cual coincide con lo encontrado por Figueroa *et al.* (2004) al disminuir 4 unidades porcentuales la PC en la dieta (de 13.8 a 9.8%) y no encontraron diferencias significativas en GD, AML y PCM de los cerdos, lo que significa que al menos se mantiene la calidad de la canal al reducir la PC en la dieta. Que las características de la canal no presentaran diferencias significativas en este experimento, coincide con lo encontrado por Ward y Southern (1995) donde no se vio afectada la GDF al disminuir la PC en 4 unidades porcentuales en la dieta y adicionar AA sintéticos.

Otros autores mencionan lo contrario, como Tuitoek *et al.* (1997), quienes dicen que existe una tendencia al incremento en la retención de energía en forma de grasa al reducir en más de 3 unidades porcentuales la PC en la dieta. Kerr *et al.* (1995) reportan que la GD tiende a aumentar cuando los cerdos son alimentados con dietas bajas en PC suplementadas con AA sintéticos. Esto se puede explicar ya que disminuye aun más el contenido de aminoácidos esenciales en la dieta. Resultados similares obtuvieron Knowles *et al.* (1998) para la respuesta productiva. Ward y Southern (1995) afirman que al utilizar DBP sólo se puede reducir un 4 unidades porcentuales la PC en la dieta, ya que si la reducción es mayor se provocan deficiencias de AA y otros nutrientes, lo cual de alguna manera limita la respuesta productiva de los cerdos. En otro experimento Figueroa *et al.* (2008) demostraron que la proteína cruda puede reducirse de 14.0% a 12.5%, y adicionando AA sintéticos no se ve afectado el rendimiento de los cerdos en finalización.

El PRO no influyó en la respuesta productiva, ya que no se observaron diferencias significativas, lo cual difiere de lo que encontraron Jeresiunas *et al.* (2006), un aumento de 6% en el peso vivo al alimentar cerdos en finalización con dietas adicionadas con *Enterococcus faecium*.

La disminución de la concentración de urea en plasma en este experimento es muy notoria debido a la cantidad de PC reducida en la dieta, lo cual coincide con otros

resultados en los cuales se ha reducido la proteína de la dieta y se han adicionado AA sintéticos (Knowles *et al.*, 1998; Ward y Southern, 1995). Una menor concentración de urea en plasma indica que los excesos de AA se reducen y que la proteína de la dieta es utilizada con mayor eficiencia (Coma *et al.*, 1995) y pueden tener la misma retención de nitrógeno que los cerdos que consumen dietas estándar, si la disminución de la proteína es adecuada se puede reducir hasta 10% la excreción de nitrógeno por cada unidad porcentual de disminución de la proteína de la dieta (Ferket *et al.*, 2002), con lo cual se contribuye a la reducción de la contaminación ambiental.

El NRC (1998) menciona que una mejora en la eficiencia alimenticia del 0.1% se refleja en una reducción del 3% de N en heces de cerdos en finalización; Bridges *et al.* (1994) afirman que la excreción de N al medio ambiente se reduce desde 30 a 40% al reducir 4 unidades porcentuales la PC en dietas a base de maíz-pasta de soya suplementados con AA sintéticos. Por otro lado, Kerr y Easter (1995) dicen que al disminuir una unidad porcentual de PC en la dieta suplementada con AA sintéticos, el N fecal y urinario disminuye 8% aproximadamente, que se refleja de 30 a 50% menor olor en las explotaciones; Kerr *et al.* (1995) mencionan que por cada unidad disminuida de PC en las dietas se produce una reducción entre 8.5 y 12.5% en la excreción de N; si tomamos en cuenta lo que estos investigadores afirman, estaríamos hablando de disminuir en promedio 10% la excreción de N por cada unidad porcentual de PC en las dietas para cerdos.

La producción intensiva de cerdos contribuye a la emisión de partículas finas de polvo y de gases como el amoníaco, el metano y otros compuestos volátiles, que contienen N y/o azufre que dan lugar a malos olores (Hartog y Sijtsma, 2007). Al hacer un buen balance de AA se va a mejorar la respuesta productiva, por que se va a requerir de menor cantidad de energía para la síntesis de urea necesaria para eliminar el N que se degrada del exceso de AA en dietas estándar (Gómez *et al.*, 2002); las emisiones excesivas de N, ya sea en forma de N inmovilizado como de amoníaco también van a afectar la calidad del agua, y han sido responsabilizadas de la lluvia ácida (Hartog y Sijtsma, 2007). Por lo tanto, el uso de DBP es una alternativa para disminuir en gran cantidad el exceso de N en el medio ambiente, cosa que en esta

investigación se está realizando y contribuyendo a la disminución de la contaminación del medio ambiente.

8.4. Análisis microbiológico

De acuerdo a los resultados obtenidos, las concentraciones de bacterias en heces por efecto de *Enterococcus spp.* varían de acuerdo a las características de la cepa y de algunos factores externos de la granja. Al nacimiento el lechón está libre de bacterias, pero una vez que nace su aparato digestivo se contamina, lo que empieza a la hora del amamantamiento haciéndolo funcional. En el caso de la bacteria *Enterococcus faecium*, esta es una bacteria que pertenece a la microflora normal del tracto gastrointestinal de los cerdos. Vahjen *et al.* (2006) confirmaron que la bacteria *Enterococcus faecium* se trasfiere al lechón al momento de la lactancia por acción de la microbiota fecal de la cerda; esto ocurre de manera natural. Sin embargo, Macha *et al.* (2004), aseguran que sólo aumenta la concentración de *Enterococcus spp.* al momento de la lactancia, ya que una vez que el lechón comienza a ingerir alimento sólido (postdeste), esta concentración disminuye.

En cerdos en iniciación encontró un promedio de 105 y 194 UFC g⁻¹ de heces, para los tratamientos 2 y 4 respectivamente, que fueron los tratamientos en los cuales se les adicionó la cepa de *Enterococcus faecium*, lo cual coincide con lo que encontró Macha *et al.* (2004), quienes encontraron de 103 a 105 UFC g⁻¹ en promedio en heces agregando el mismo PRO. En cuanto a la concentración de bacterias del género *Enterococcus spp.*, se encontraron 4.4×10^7 en esta etapa de crecimiento, lo cual es cercano a lo encontrado por Vahjen *et al.* (2006) al reportar 3.3×10^7 en lechones.

Se observó que la concentración de *Enterococcus faecium* de los cerdos en crecimiento disminuyó y en finalización aumentó de nuevo la concentración en los tratamientos con PRO, esto quizá por la adición constante de la cepa de este producto en el alimento. Resultados similares se han encontrado en cerdos alimentados con galacto-oligosacáridos como prebiótico (Tzortzis *et al.*, 2005), y la concentración de bacterias se mantiene en intestino delgado, ciego y colon, predominando

bifidobacterias, lactobacilos, Bacteroides, y Clostridium. Según Robinson *et al.* (1981), el ciego y colon son las partes del tracto gastrointestinal donde se concentra la cantidad de bacterias representativas normales del cerdo.

En cuanto a la concentración total de bacterias, se encontraron 1.42×10^{11} , 2.38×10^{11} y 2.37×10^{11} en iniciación, crecimiento y finalización, respectivamente, mismas que pueden variar de acuerdo al manejo y factores externos de la granja. Roura (2001) reporta concentraciones promedio en la flora intestinal en mamíferos no rumiantes de 10^{11} a 10^{14} microorganismos vivos por mL de sustrato. Salanitro *et al.* (1977) encontraron concentraciones de bacterias fecales en cerdos adultos desde 4.48×10^{10} a 7.40×10^{10} por g de muestra en base húmeda (muestras frescas); además, los lograron identificar y lo que predomina en 90% son bacterias gram-positivas, anaerobios facultativos, principalmente estreptococos, *Eubacterium spp.*, *Clostridium spp.* y *Propionibacterium acnes*; el resto se compone de bacterias del género *Treponema*, *Selenomonas*, *Lactobacillus*, *Veillonella*, *Bacteroides*, y *E. coli*. En general se reportan aproximadamente 400 especies de bacterias que conforman la microbiota gastrointestinal de los cerdos (Berg, 1995; Broom *et al.*, 2006).

IX. CONCLUSIONES

La adición del probiótico *Enterococcus faecium* a dietas sorgo-pasta de soya, estándar y con baja proteína, no tuvo efecto sobre las variables productivas, las características de la canal, y la concentración de urea en plasma de cerdos en iniciación, crecimiento y finalización.

La disminución de la proteína en las dietas no afectó negativamente el comportamiento productivo y las características de la canal, por lo que al reducir la proteína cruda en dietas de iniciación, crecimiento y finalización, a 16.0, 14.5 y 12.5%, respectivamente, no incrementa el contenido de grasa en la canal ni se afecta el área del músculo *longissimus*. Por lo tanto, el uso de DBP es viable al obtener el mismo rendimiento productivo con menor cantidad de PC en las dietas, lo que implica una disminución de los costos de alimentación por el precio de la PC y una menor contaminación al ambiente por desperdicios de N. La concentración de urea en plasma disminuye al reducir la cantidad de proteína en la dieta en todas las etapas del experimento.

La concentración de bacterias del género *Enterococcus spp.* en heces fue mayor en los tratamientos que se les adicionó el PRO, con lo que se confirma que el PRO estaba viable y realizó su efecto al pasar por el tracto gastrointestinal. Sin embargo, los resultados son variables por la adición de PRO en las dietas en cerdos, por lo que se recomienda analizar su efecto a nivel de intestino, ver si realmente reduce la concentración de patógenos, y por ADN comprobar que se trata de la cepa del PRO que se adicionó en la dieta; además, agregar cantidades mayores de PRO ton^{-1} de alimento, para ver si con un aumento en la dosis se obtiene un mayor efecto sobre las variables productivas.

X. LITERATURA CITADA

- Amores, R., A. Calvo, J. R. Maestre, y D. Martínez-Hernández. 2004. Probióticos. Rev. Esp. Quimioterap. 17 (2): 131-139.
- AOAC. 1990. Official methods of analysis. 15th ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA. pp. 37-38.
- Apajalahti, J., A. Kettunen, and H. Graham. 2004. Characteristics of the gastrointestinal microbial communities, with special reference to the chicken. World's J. Poultry Sci. 60:223-232.
- Baker, D. H. 1996. Advances in amino acid nutrition and metabolism of swine and poultry. In: Nutrient management of food animals to enhance and protect the environment. Ed. E.T. Kornegay. Lewis Publishers, Boca Ratón, Florida. Pp. 41-53.
- Belén, S. R. M., M. S. Monereo, y B. B. Molina. 2003. Alimentos funcionales y nutrición óptima. ¿Cerca o lejos? Rev. Española de Salud Pública 77 (3): 20.
- Berg, R. D. 1995. Bacterial translocation from the gastrointestinal tract. Trends in Microbiology 3: 149-154.
- Borbolla, S. A. G. 2008. Alternativas a los costos de alimentación: áreas para mejorar. Departamento Técnico Geneticporc México SA de CV. Disponible en: <http://www.porcicultura.com/articulos/?seccion=ver&categoria=nutricion&nda=nut052>
Consultada en Abril de 2009.
- Bryant, M. P. 1972. Commentary on the Hungate technique for culture of anaerobic bacteria. Am. J. Clin. Nutr. 25: 1324-1328.
- Bridges, T. C., L. W. Turner, G. L. Cromwell, and J. L. Pierce. 1995. Modelling the effects of diet formulation on nitrogen and phosphorus excretion in swine waste. Applied Engineering in Agriculture 11(5): 731-739.
- Broom, L. J., H. M. Millar, K. G. Kerr, and J. S. Knapp. 2006. Effects of zinc oxide and *Enterococcus faecium* SF68 dietary supplementation on the performance, intestinal microbiota and immune status of weaned piglets. Research in Veterinary Science 80: 45-54.

- Brudevold, A. B., and L. L. Southern. 1994. Low-protein, crystalline amino acid supplemented, sorghum-soybean meal diets for the 10- to 20-kilogram pig. *J. Anim. Sci.* 72: 638-647.
- Cabrera, C. Y. y F. A. Fadragas. 2005. Probióticos y salud: una reflexión necesaria. *Rev. Cubana Med. Gen. Integr.* 21: 3-4.
- Caja, G., E. González, C. Flores, M. D. Carro y E. Albanell. 2003. Alternativas a los antibióticos de uso alimentario en rumiantes: prebióticos, enzimas y ácidos orgánicos. XIX Curso de Especialización FEDNA. Madrid España. Pag. 183-212.
- Canibe, N., L. L. Mikkelsen, O. Hojberg y B. B. Jensen. 2003 Alimentos líquidos fermentados en postdestete: una alternativa a los antibióticos promotores del crecimiento. Jornadas de Alimentación Líquida del Ganado Porcino: N. Canibe, DIAS, Dinamarca. 11 pp.
- Cerero, B. R. 2006. Retirada de los antibióticos promotores de crecimiento en la Unión Europea: causas y consecuencias. Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos. Facultad de Veterinaria. Universidad de Zaragoza. 46 pp.
- Chaney, A. L., and E. P. Marbach. 1962. Modified reagents for determination of urea and ammonia. *Clin. Chem.* 8: 130-132.
- Chen, H. Y., P. S. Miller, A. J. Lewis, C. K. Wolverton, and W. W. Stroup. 1995. Changes in plasma urea concentration can be used to determine protein requirements of two populations of pigs with different protein accretion rates. *J. Anim. Sci.* 73: 2631-2639.
- Chiquieri, J. M. S., R. T. R. N. Soares, J. C. D. Souza, V. L. Hurtado Nery, R. A. Ferreira y B. G. Ventura. 2006. Probiótico y prebiótico en la alimentación de cerdos en crecimiento y terminación. *Arch. Zootec.* 55 (211): 305-308.
- Close, W. H. 2000. Producing pigs without antibiotic growth promoters. *Advances in Pork Production* 11: 47-56.
- Cobos, M. A., M. Perez-Sato, J. Piloni-Martini, S. S. González, and J. R. Bárcena. 2007. Evaluation of diets containing shrimp shell waste and an inoculum of

- Streptococcus milleri* on rumen bacteria and performance of lambs. Anim. Feed Sci. Technol. 132: 324-330.
- Coma, J., D. Carrion, and D. R. Zimmerman. 1995. Use of plasma urea nitrogen as a rapid response criterion to determine the lysine requirement of pigs. J. Anim. Sci. 73: 472-481.
- Cousins, B. W., T. D. Tanksley Jr., D. A. Knabe, and T. Zebrowska. 1981. Nutrient digestibility and performance of pigs fed sorghums varying in tannin concentration. J. Anim. Sci. 53:1524-1537.
- Cuarón, J. A. 1999. Proteína y aminoácidos para cerdos en crecimiento y acabado. En: El Foro-99. Watt Publishing Co. Miami, Florida. pp. 119-127.
- De las Cagigas, A. L., y A. J. Blanco. 2002. Prebióticos y probióticos, una relación beneficiosa. Revista Cubana Aliment. Nutr. 16(1): 63-68.
- Del Moral, A. M., M. J. Moreno-Aliaga y H. A. J. Martínez. 2003. Efecto de los prebióticos sobre el metabolismo lipídico. Nutr. Hosp. 18: 181-188.
- Díaz, D. 2006. El papel de Fecinor en la colonización y regeneración de la flora intestinal del lechón. Product Manager, Biotechnology Division Norel & Nature. España. Disponible en:
http://www.engormix.com/s_articles_view.asp?art=1030&AREA=POR-165 Consultada en marzo de 2009.
- Díaz, D. 2007. Variación de la flora intestinal y efecto sobre el blandeo de FECINOR (*E. faecium* CECT 4515) y OZN en lechones. Product Manager, Biotechnology División Norel & Nature. España. Disponible en:
http://www.engormix.com/variacion_flora_intestinal_efecto_s_articulos_1637_POR.htm Consultada en marzo de 2009.
- Dritz, S. S., M. D. Tokach, R. D. Goodband, and J. L. Nelssen. 1997. Feed additive guidelines for swine. Kansas State University. 348 p.
- Eggum, B. O. 1970. Blood urea measurement as a technique for assessing protein quality. Br. J. Nutr. 24: 983-988.
- Emmert, J. L., and D. H. Baker. 1997. Use of the ideal protein concept for precision formulation of amino acid levels in broiler diets. J. Appl. Poultry Res. 6: 462-470.

- FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. 2002. Integración por zonas de la ganadería y de la agricultura especializadas (AWI): opciones para el manejo de efluentes de granjas porcícolas de la zona centro de México. Reporte de la iniciativa de la ganadería, el medio ambiente y el desarrollo (LEAD). 253 pp. Disponible en: <http://www.fao.org/WAIRDOCS/LEAD/X6372S/x6372s00.htm#Contents> Consultada en Abril de 2009.
- Ferket, P. R., E. Van Heugten, T. A. T. G. Van Kempen, and R. Angel. 2002. Nutritional strategies to reduce environmental emissions from nonruminants. *J. Anim. Sci.* 80: E168-E182.
- Ferrer, L. B., y S. J. Dalmau. 2001. Alimentos funcionales: probióticos. *Act. Pediatr. Esp.* (59): 150-155.
- Fick, K. A., L. R. McDowell, P. H. Miles, N. S. Wilkinson, J. D. Funk, J. H. Conrad y R. Valdivia. 1979. Métodos de análisis de minerales para tejidos de plantas y animales. 2da. ed. Departamento de Ciencia Animal. Universidad de Florida. Gainesville, Florida, E.E.U.U. pp. 601-701.
- Figueroa, J. L., A. J. Lewis, P. S. Miller, R. L. Fischer, R. S. Gómez, and R. M. Diedrichsen. 2002. Nitrogen metabolism and growth performance of gilts fed standard corn-soybean meal diets or low-crude protein, amino acid-supplemented diets. *J. Anim. Sci.* 80: 2911-2919.
- Figueroa, J. L., A. J. Lewis, P. S. Miller, R. L. Fischer, and R. M. Diedrichsen. 2003. Growth, carcass traits, and plasma amino acid concentrations of gilts fed low-protein diets supplemented with amino acids including histidine, isoleucine, and valine. *J. Anim. Sci.* 81: 1529-1537.
- Figueroa, J. L., M. Cervantes, M. Cuca y M. Méndez. 2004. Respuesta de cerdos en crecimiento y finalización a dietas con baja proteína y energía. *Agrociencia* 38: 383-394.
- Figueroa, J. L., E. E. Chi, M. Cervantes, y I. A. Domínguez. 2006. Alimentos funcionales para cerdos al destete. *Vet. Mex.* 37: 117-136.
- Figueroa, J. L., M. Martínez, J. E. Trujillo, V. Zamora, J. L. Cordero, and M. T. Sánchez-Torres. 2008. Plasma urea nitrogen concentration and growth performance of

- finishing pigs fed sorghum-soybean meal, low-protein diets. J. Appl. Anim. Res. 33: 7-12.
- Fuller, R. 1989. Probiotics in man and animal. Journal of Applied Bacteriology 66: 365-378.
- Gallardo, N. J. L. 2006. Situación actual y perspectiva de la situación actual de carne de porcino en México 2006. Coordinación General de Ganadería. SAGARPA. Disponible en: <http://www.sagarpa.gob.mx/ganaderia/estudio/sitpor06.pdf> Consulta realizada 13 de Marzo 2009.
- García, E. 1988. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen (para adaptarla a las condiciones de la República Mexicana). 4^a ed. México, D.F. 217 p.
- Gibson, G. R., and M. B. Roberfroid. 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. J. Nutr. 125: 1402-1412.
- Gómez, R. S., A. J. Lewis, P. S. Miller, and H. Y. Chen. 2002. Growth performance, diet apparent digestibility, and plasma metabolite concentrations of barrows fed corn-soybean meal diets or low-protein, amino acid-supplemented diets at different feeding levels. J. Anim. Sci. 80: 644-653.
- Guarner, F., and G. J. Schaafsma. 1998. Probiotics. Int. J. Food Microbiol. 39: 237-238.
- Gutiérrez, C. L., R. L. García, O. F. Vázquez, H. K. Preciado, G. R. Figueroa y F. Y. López. 2008. Lisina total, digestible y reactiva digestible en harina de pescado. Revista Científica FCV- LUZ VIII (2): 218-224.
- Hansen, J. A., D A. Knabe, and K. G. Burgoon. 1993. Amino acid supplementation of low-protein, sorghum-soybean meal diets for 20- to 50-kilogram swine. J. Anim. Sci. 71: 442-451.
- Hartog, L., y R. Sijtsma. 2007. Estrategias nutricionales para reducir la contaminación ambiental en la producción de cerdos. XXIII curso de especialización FEDNA. Madrid, España. 24 p.
- Havenaar, R., and J. H. S. Huis in't Veld. 1992. Probiotics: general view. In J. B. J. Wood, Lactic acid bacteria in health and disease. London. Elsevier. pp. 151-170.
- Jeresiunas, A., J. Kulpys, and S. Rolandas. 2006. The influence of probiotic *Enterococcus faecium* on pigs fattening. Veterinarija ir Zootechnika. T. 35 (57).

- Jin, L. Z., Y. W. Ho, N. Abdullah, and S. Jalaludin. 1997. Probiotics in poultry: modes of action. *WPSA J.* 53(4): 351-368.
- Just, A. 1982. The net energy value of crude (catabolized) protein for growth in pigs. *Livest. Prod. Sci.* 9: 349-360.
- Kerr, B. J., J. T. Yen, J. A. Nienaber, and R. A. Easter. 2003. Influences of dietary protein level, amino acid supplementation and environmental temperature on performance, body composition, organ weights and total heat production of growing pigs. *J. Anim. Sci.* 81: 1998-2007.
- Kerr, B. J., F. K. McKeith, and R. A. Easter. 1995. Effect of performance and carcass characteristics of nursery to finisher pigs fed reduced crude protein, amino acid-supplemented diets. *J. Anim. Sci.* 73: 433-440.
- Kerr, B. J., and R. A. Easter. 1995. Effect of feeding reduced protein amino acid-supplemented diets on nitrogen and energy balance in grower pigs. *J. Anim. Sci.* 73: 3000-3008.
- Klaenhammer, T. R. 2000. Probiotic bacteria: today and tomorrow. *J. Nutr.* 130: 415S-416S.
- Knowles, T. A., L. L. Southern, T. D. Bidner, B. J. Kerr, and K. G. Friesen. 1998. Effect of dietary fiber or fat in low-crude protein, crystalline amino acid-supplemented diets for finishing pigs. *J. Anim. Sci.* 76: 2818-2832.
- Le Bellego, L., J. Van Milgen, S. Dubois, and J. Noblet. 2001. Energy utilization of low-protein diets in growing pigs. *J. Anim. Sci.* 79: 1259-1271.
- Le Bellego, L., and J. Noblet. 2002. Performance and utilization of dietary energy and amino acids in piglets fed low protein diets. *Livest. Prod. Sci.* 76 (1-2): 45-58.
- Leclercq, B. 2000. El concepto de proteína ideal y el uso de aminoácidos sintéticos: estudio comparativo entre pollos y cerdos. XIV curso de especialización avances en nutrición y alimentación animal. Barcelona España 13 p.
- Li, D. F., J. L. Nelssen, P. G. Reddy, F. Blecha, J. D. Hancock, D. L. Allee, R. D. Goodband, and R. D. Klemm. 1990. Transient hypersensitivity to soybean meal in the early-weaned pig. *J. Anim. Sci.* 68: 1790-1799.

- Lázaro, D. C., C. F. Carcelén, A. M. Torres, y G. M. Ara. 2005. Efecto de probióticos en el alimento de marranas sobre los parámetros productivos de lechones. *Rev. Inv. Vet. Perú* 16 (2): 97-102.
- Lilly, D. M., and R. H. Stillwell. 1965. Probiotics: growth promoting factors produced by microorganisms. *Science* 147: 747-748.
- Lin, F. D., D. A. Knabe, and T. D. Tanksley, Jr. 1987. Apparent digestibility of amino acids, gross energy and starch in corn, sorghum, wheat, barley, oat groats and wheat middlings for growing pigs. *J. Anim. Sci.* 64: 1655-1665.
- Lordelo, M. M., A. M. Gaspar, L. Le Bellego, and J. P. D. Freire. 2008. Isoleucine and valine supplementation of a low-protein, corn-wheat-soybean meal-based diet for piglets: growth performance and nitrogen balance. *J. Anim. Sci.* 86: 2936-2941.
- López-Brea, M., y D. Domingo. 2007. Antibioticoterapia con probióticos. *Rev. Quim. Quimioterap.* 20 (2): 170-181.
- Macha, M., D. Taras, W. Vahjen, B. Arini, and O. Simon. 2004. Specific enumeration of the probiotic strain *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 in the intestinal tract and in faeces of piglets and sows. *Archives of Animal Nutrition* 58(6): 443 – 452.
- Mack, D. R., S. Michail, S. Wei, L. McDougall, and M. A. Hollingsworth. 1999. Probiotics inhibit enteropathogenic *E. coli* adherente in vitro by inducing intestinal mucin gene expression. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.* 276: 941-950.
- Manzanares, W., M. Alonso, and A. Biestro. 2006. Probiotics, prebiotics and synbiotics in critically ill patients. *Rev. Bras. Nutr. Clin.* 21(2): 155-162.
- Marteau, P. R., M. De Vrese, C. J. Cellier, and J. Schrezenmeir. 2001. Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics. *Am. J. Clin. Nutr.* 73: 430S-436S.
- Martin, S. A., and D. J. Nisbet. 1992. Effect of direct-fed microbials on rumen microbial fermentation. *J. Dairy Sci.* 75: 1736-1744.
- Martínez-Cóccera, C., y P. M. Mesa Del Castillo. 2005. Probióticos: ¿fantasía o realidad? *An. Med. Interna.* 22: 53-54.
- Martínez, M., J. L. Figueroa, J. E. Trujillo, V. Zamora, J. L. Cordero, M. T. Sánchez y L. Reyna. 2009. Respuesta productiva y concentración de urea en plasma de

- cerdos en crecimiento alimentados con dietas sorgo-pasta de soya con baja proteína. *Vet. Mex.* 40(1): 27-38.
- Marquina, D., y A. Santos. 2001. Probióticos, prebióticos y salud. *Sociedad Española de Microbiología. Actualidad.* 32: 24-26.
- Mavromichalis, I., D. M. Webel, J. L. Emmert, R. L. Moser, and D. H. Baker. 1998. Limiting order of amino acids in a low-protein, corn-soybean meal-whey-based diet for nursery pigs. *J. Anim. Sci.* 76: 2833-2837.
- Mavromichalis, I. 2009. Low protein diets. Your portal on global pig nutrition. <http://www.pigprogress.net/weblog/nutrition/low-protein-diets-id2562.html>
Consultado en marzo de 2009.
- Medel, P., M. I. Gracia, A. Espinel, O. S. Martín, E. García y R. Bremmers. 2007. Conociendo los probióticos: uso en monogástricos. *Norel Nature Nutrición S.A.* Madrid España. 135 pp.
- Mejía, S. W., G. J. Rubio, M. D. Calatayud, C. A. Rodríguez y M. A. Quintero. 2007. Evaluación de dos probióticos sobre parámetros productivos en lechones lactantes. *Zootecnia Trop.* 24(4): 301-306.
- Moore, P. R., A. Evenson, T. D. Luckey, E. McCoy, C. A. Elvehjen, and E. B. Hart. 1946. Use of sulfasuxidine, streptothricin and streptomycin in nutritional studies with the chick. *J. Bio. Chem.* 165: 437-441.
- Nes, I. F., B. S. Diep, and L. S. Havarstein. 1996. Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 70: 113-128.
- Noblet, J., H. Fortune, X. S. Shi, and S. Dubois. 1994. Prediction of net energy value of feeds for growing pigs. *J. Anim. Sci.* 72: 344-354.
- Norel Nature Nutrition. 2005. Descripción de producto FECINOR (*Enterococcus faecium*). Technical Dossier. Madrid España. 34 pp.
- NPPC (National Pork Producers Council). 1991. Procedures to evaluate market hogs. 3rd ed. National Pork Producers Council. Des Moines. Iowa, U.S.A. 16 p.
- NRC (National Research Council). 1998. Nutrient Requirements of Swine. 10th ed. National Academy Press. Washington, DC. pp: 110-123.
- Nurmi, E., and M. Rantala. 1973. New aspects of *Salmonella* infection in broiler production. *Nature* 241: 210-211.

- Olivera, C. M. 2008. Alimentos funcionales en Argentina. 1^{er} Foro FANUS. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires. Argentina. 10 p.
- Panetta, D. M., W. J. Powers, H. Xin, B. J. Kerr, and K. J. Stalder. 2006. Nitrogen excretion and ammonia emissions from pigs fed modified diets. *J. Environ. Qual.* 35: 1297–1308.
- Patterson, J. A., and K. M. Burkholder. 2003. Application of prebiotics and probiotics in poultry production. *Poultry Sci.* 82: 627-631.
- Pérez, E. R. 1999. Porcicultura intensiva y medio ambiente en México: situación actual y perspectivas. *Revista Mundial de Zootecnia* 92-1999/1 ISSN 1014-6954. FAO. Disponible en:
<http://www.fao.org/docrep/x1700t/x1700t00.HTM> Consultada en Abril de 2009.
- Pia, T. M., M. G. Medici, y V. G. De Font. 2005. Alimentos funcionales probióticos. *Revista Química* 1(4): 26-34.
- Quera, P. R., E. Quigley, y S. A. M. Madrid. 2005. El rol de los prebióticos, probióticos y simbióticos en gastroenterología. *Gastroenterología Latinoamericana* 16(3): 218-228.
- Resta-Lenert, S., and K. E. Barrett. 2003. Live probiotics protect intestinal epithelial cells from the effects of infection with enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC). *Gut* 52: 988–997.
- Risley, C. R. 2005. ¿Qué se ha hecho para influenciar la salud y el ambiente intestinal? LUCTA USA. XII Congreso Bienal AMENA. 16 pp.
- Rivera, U. A. 2008. Adición de oligomananos o nucleótidos a dietas con baja proteína para cerdos en finalización. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco. Estado de México. 71 p.
- Robinson, I. M., M. J. Allison, and J. A. Bucklin. 1981. Characterization of the cecal bacteria of normal pigs. *Applied and Environmental Microbiology* 41: 950-955.
- Roura, E., J. Homedes, and K. C. Klasing. 1992. Prevention of immunologic stress contributes to the growth-permitting ability of dietary antibiotics in chicks. *J. Nutr.* 122: 2383-2390.
- Roura, E. 2001. Alternativas a los promotores de crecimiento antibióticos en producción porcina. *Anaporc. Revista de Porcicultura* (207): 53-76.

- Salanitro, J. P., I. G. Blake, and P. A. Muirhead. 1977. Isolation and identification of fecal bacteria from adult swine. *Applied and Environmental Microbiology* 33: 79-84.
- SAS. 1998. The SAS system for Windows V8. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.
- Servin, A. L., and M. H. Coconnier. 2003. Adhesion of probiotic strains to the intestinal mucosa and interaction with pathogens. *Best Practice Research Clinical Gastroenterology* 17: 741–754.
- Sieo, C. C., N. Abdullah, W. S. Tan, and Y. W. Ho. 2005. Influence of β -glucanase-producing *Lactobacillus* strains on intestinal characteristics and feed passage rate of broiler chickens. *Poultry Science* 84: 734–741.
- Schrezenmeir, J., and M. De Vrese. 2001. Probiotics, prebiotics and synbiotics – approaching a definition. *Am. J. Clin. Nutr.* 73: 361S-364S.
- Tannock, G. W., R. Fuller, S. A. Smith, and M. A. Hall. 1990. Plasmid profiling of members of the family *Enterobacteriaceae*, lactobacilli, and bifidobacteria to study the transmission of bacteria from mother to infant. *J. Clin. Microbiol.* 28: 1225-1228.
- Torrallardona, D. 2009. Nuevos requerimientos nutricionales en porcino. Instituto de Investigación y Tecnologías Agroalimentarias. IRTA. España. Disponible en: <http://www.irta.es/xarxatem/requerimientos.htm> Consultada en Abril de 2009.
- Trujillo, J. E., J. L. Figueroa, M. Martínez, V. Zamora, J. L. Cordero, M. T. Sánchez, M. Cuca, y M. Cervantes. 2007. Concentración de urea en plasma y respuesta productiva de cerdos en iniciación alimentados con dietas sorgo-pasta de soya bajas en proteína. *Agrociencia* 41: 597-607.
- Tuitoek, K., L. G. Young, F. M. De Lange, and B. J. Kerr. 1997. The effect of reducing excess dietary amino acids on growing-finishing pig performance: an evaluation of the ideal protein concept. *J. Anim. Sci.* 75: 1575–1583.
- Tzortzis, G., A. K. Goulas, J. M. Gee, and G. R. Gibson. 2005. A novel galactooligosaccharide mixture increases the bifidobacterial population numbers in a continuous *in vitro* fermentation system and in the proximal colonic contents of pigs *in vivo*. *J. Nutr.* 135: 1726–1731.

- Vahjen, W., D. Taras, and O. Simon. 2006. Effect of the probiotic *Enterococcus faecium* NCIMB10415 on cell numbers of total *Enterococcus* spp., *E. faecium* and *E. faecalis* in the intestine of piglets. *Curr. Issues Intestinal Microbiol.* 8: 1–8.
- Ward, T. L., and L. L. Southern. 1995. Sorghum amino acid-supplemented diets for the 50- to 100-kilogram pig. *J. Anim. Sci.* 73: 1746-1753.
- Yen, J. T., J. A. Nienaber, D. A. Hill, and W. G. Pond. 1991. Potential contribution of absorbed volatile fatty acids to whole-animal energy requirement in conscious swine. *J. Anim. Sci.* 69: 2001-2012.
- Zervas, S., and R. T. Zijlstra. 2002. Effects of dietary protein and oat hull fiber on nitrogen excretion patterns and postprandial plasma urea profiles in grower pigs. *J. Anim. Sci.* 80: 3238–3246.

Cuadro 11. Comportamiento productivo de cerdos machos castrados en iniciación, alimentados con dos niveles de proteína y dos niveles de PRO.

TRA	PC	PRO	Comportamiento productivo					
			GDP (kg d ⁻¹)	COA (kg d ⁻¹)	CA	PI (kg)	PF (kg)	GCM (kg d ⁻¹)
1	20.5	0.00	0.56	1.07	1.90	11.08	26.28	0.21
2	20.5	0.10	0.50	0.95	1.94	11.15	24.33	0.17
3	16.0	0.00	0.57	1.11	1.93	11.12	26.41	0.21
4	16.0	0.10	0.57	1.06	1.90	11.04	25.97	0.20
EEM			0.02	0.04	0.09	0.10	0.82	0.01
Efectos principales								
	20.5		0.53	1.01	1.92	11.12	25.31	0.19
	16.0		0.57	1.09	1.92	11.08	26.19	0.20
		0.0	0.57	1.09	1.92	11.10	26.35	0.21
		0.1	0.53	1.00	1.92	11.10	25.15	0.19
Fuente de variación			Valor de P					
PC			0.25	0.19	0.95		0.44	0.27
PRO			0.29	0.13	0.95		0.30	0.07
PC×PRO			0.38	0.47	0.65		0.50	0.19

TRA= Tratamiento, PC= Proteína cruda, PRO= Probiótico, GDP= Ganancia diaria de peso, COA= Consumo de alimento, CA= Conversión alimenticia, PI= Peso inicial, PF= Peso final, GCM= Ganancia de carne magra, EEM= Error estándar de la media.

Cuadro 12. Características de la canal y concentración de urea en plasma en cerdos machos castrados en iniciación, alimentados con dos niveles de proteína y dos niveles de PRO.

TRA	PC	PRO	Características de la canal						UREA (mg dL ⁻¹)
			GDI (mm)	GDF (mm)	AMLI (cm ²)	AMLF (cm ²)	% CMI	% CMF	
1	20.5	0.00	0.14	0.31	4.72	11.03	54.46	45.64	22.91 ^a
2	20.5	0.10	0.15	0.28	4.66	9.28	54.13	45.16	26.81 ^a
3	16.0	0.00	0.15	0.34	4.71	10.92	54.33	45.22	13.61 ^b
4	16.0	0.10	0.13	0.32	4.42	10.43	54.12	45.07	11.80 ^b
EEM			0.01	0.01	0.20	0.45	0.53	0.47	1.98
Efectos principales									
	20.5		0.15	0.30	4.69	10.15	54.29	45.40	24.86 ^a
	16.0		0.14	0.33	4.57	10.67	54.23	45.15	12.70 ^b
		0.0	0.15	0.32	4.72	10.97 ^a	54.39	45.43	18.26
		0.1	0.14	0.30	4.54	9.86 ^b	54.13	45.12	19.30
Fuente de variación			Valor de P						
PC				0.10		0.35		0.64	0.01
PRO				0.27		0.05		0.56	0.60
PC×PRO				1.00		0.27		0.75	0.16

^{a,b}Medias de tratamiento o efecto principal con distinta literal indica diferencias estadísticas (P≤0.05).

TRA= Tratamiento, PC= Proteína cruda, PRO= Probiótico, GDI= Grasa dorsal inicial, GDF= Grasa dorsal final, AMLI= Área del músculo *longissimus* inicial, AMLF= Área del músculo *longissimus* final, CMI= Carne magra inicial, CMF= Carne magra final.

Cuadro 13. Comportamiento productivo en cerdos machos castrados en crecimiento, alimentados con dos niveles de proteína y dos niveles de PRO.

TRA	PC	PRO	Comportamiento productivo					
			GDP (kg d ⁻¹)	COA (kg d ⁻¹)	CA	PI (kg)	PF (kg)	GCM (kg d ⁻¹)
1	16.0	0.00	0.73	1.98	2.70	26.28	52.07	0.24
2	16.0	0.10	0.66	1.73	2.60	24.33	47.77	0.22
3	14.5	0.00	0.72	1.93	2.68	26.41	51.82	0.24
4	14.5	0.10	0.75	2.00	2.67	25.97	52.46	0.25
EEM			0.04	0.08	0.08	0.82	2.18	0.01
Efectos principales								
	16.0		0.70	1.85	2.65	25.31	49.92	0.23
	14.5		0.74	1.97	2.67	26.19	52.14	0.25
		0.0	0.73	1.96	2.69	26.35	51.95	0.24
		0.1	0.71	1.86	2.63	25.15	50.12	0.24
Fuente de variación			Valor de P					
PC			0.31	0.20	0.78		0.32	0.16
PRO			0.63	0.29	0.50		0.41	0.58
PC×PRO			0.20	0.07	0.56		0.27	0.27

TRA= Tratamiento, PC= Proteína cruda, PRO= Probiótico, GDP= Ganancia diaria de peso, COA= Consumo de alimento, CA= Conversión alimenticia, PI= Peso inicial, PF= Peso final, GCM= Ganancia de carne magra, EEM= Error estándar de la media.

Cuadro 14. Características de la canal y concentración de urea en plasma en cerdos machos castrados en crecimiento, alimentados con dos niveles de proteína y dos niveles de PRO.

TRA	PC	PRO	Características de la canal						UREA (mg dL ⁻¹)
			GDI (mm)	GDF (mm)	AMLI (cm ²)	AMLF (cm ²)	% CMI	% (CMF)	
1	16.0	0.00	0.31	0.77	11.03	18.51	45.64	39.59	16.20
2	16.0	0.10	0.28	0.67	9.28	16.09	45.16	39.62	15.45
3	14.5	0.00	0.34	0.80	10.92	19.05	45.22	39.91	11.60
4	14.5	0.10	0.32	0.80	10.43	18.49	45.07	39.43	14.05
EEM			0.01	0.05	0.45	0.69	0.47	0.49	1.15
Efectos principales									
	16.0		0.30	0.72	10.15	17.30	45.40	39.61	15.82 ^a
	14.5		0.33	0.80	10.67	18.77	45.15	39.67	12.82 ^b
		0.0	0.32	0.78	10.97 ^a	18.78	45.43	39.75	13.90
		0.1	0.30	0.73	9.86 ^b	17.29	45.12	39.53	14.75
Fuente de variación			Valor de P						
PC				0.14		0.06		0.89	0.01
PRO				0.30		0.06		0.63	0.44
PC×PRO				0.30		0.24		0.58	0.15

^{a,b}Medias de tratamiento o efecto principal con distinta literal indica diferencias estadísticas (P≤0.05).

TRA= Tratamiento, PC= Proteína cruda, PRO= Probiótico, GDI= Grasa dorsal inicial, GDF= Grasa dorsal final, AMLI= Área del músculo *longissimus* inicial, AMLF= Área del músculo *longissimus* final, CMI= Carne magra inicial, CMF= Carne magra final.

Cuadro 15. Comportamiento productivo en cerdos machos castrados en finalización, alimentados con dos niveles de proteína y dos niveles de PRO.

TRA	PC	PRO	Comportamiento productivo					
			GDP (kg d ⁻¹)	COA (kg d ⁻¹)	CA	PI (kg)	PF (kg)	GCM (kg d ⁻¹)
1	14.0	0.00	0.84	2.83	3.34	52.07	81.66	0.29
2	14.0	0.10	0.85	2.50	2.93	47.77	81.61	0.30
3	12.5	0.00	0.87	2.83	3.25	51.82	82.28	0.29
4	12.5	0.10	0.84	2.73	3.30	52.46	82.00	0.29
EEM			0.05	0.15	0.15	2.18	3.06	0.02
Efectos principales								
	14.0		0.85	2.67	3.15	49.92	81.63	0.30
	12.5		0.85	2.78	3.28	52.14	82.14	0.29
		0.0	0.85	2.83	3.30	51.95	81.97	0.29
		0.1	0.84	2.62	3.13	50.12	81.79	0.29
Fuente de variación			Valor de P					
PC			0.91	0.47	0.34		0.87	0.77
PRO			0.88	0.18	0.21		0.95	0.89
PC×PRO			0.69	0.48	0.13		0.96	0.71

TRA= Tratamiento, PC= Proteína cruda, PRO= Probiótico, GDP= Ganancia diaria de peso, COA= Consumo de alimento, CA= Conversión alimenticia, PI= Peso inicial, PF= Peso final, GCM= Ganancia de carne magra, EEM= Error estándar de la media.

Cuadro 16. Características de la canal y concentración de urea en plasma en cerdos machos castrados en finalización, alimentados con dos niveles de proteína y dos niveles de PRO.

TRA	PC	PRO	Características de la canal						UREA (mg dL ⁻¹)
			GDI (mm)	GDF (mm)	AMLI (cm ²)	AMLF (cm ²)	% CMI	% (CMF)	
1	14.0	0.00	0.77	1.21	18.51	28.02	39.59	38.03	23.55
2	14.0	0.10	0.67	1.21	16.09	27.52	39.35	37.84	21.74
3	12.5	0.00	0.80	1.21	19.05	27.73	39.91	37.85	16.68
4	12.5	0.10	0.80	1.22	18.49	27.05	39.43	37.60	19.07
EEM			0.05	0.08	0.69	1.13	0.43	0.28	1.32
Efectos principales									
	14.0		0.72	1.21	17.30	27.77	39.46	37.93	22.79 ^a
	12.5		0.80	1.21	18.77	27.39	39.67	37.72	17.87 ^b
		0.0	0.78	1.21	18.78	27.88	39.75	37.94	20.11
		0.1	0.73	1.21	17.29	27.28	39.38	37.72	20.55
Fuente de variación					Valor de P				
PC				0.96		0.75		0.47	0.01
PRO				0.93		0.63		0.45	0.82
PC×PRO				0.96		0.93		0.92	0.12

^{a,b}Medias de tratamiento o efecto principal con distinta literal indica diferencias estadísticas (P≤0.05).

TRA= Tratamiento, PC= Proteína cruda, PRO= Probiótico, GDI= Grasa dorsal inicial, GDF= Grasa dorsal final, AMLI= Área del músculo *longissimus* inicial, AMLF= Área del músculo *longissimus* final, CMI= Carne magra inicial, CMF= Carne magra final.

Cuadro 17. Número de unidades formadoras de colonias y concentración de bacterias de muestras en heces de cerdos en etapa de iniciación.

TRAT	UFC g ⁻¹ heces	Conc. Bacterias g ⁻¹ heces	Concentración de bacterias totales en heces g ⁻¹
1	19.00 ^a	9,500,000 ^a	1.59 x 10 ¹¹
2	105.00 ^b	52,500,000 ^b	1.56 x 10 ¹¹
3	33.00 ^a	16,875,000 ^a	1.34 x 10 ¹¹
4	194.25 ^b	97,125,000 ^b	1.21 x10 ¹¹

^{a,b}Medias de tratamiento o efecto principal con distinta literal indica diferencias estadísticas (P≤0.05).

UFC = Unidades formadoras de colonias por gr de heces, CONC = Concentración de bacterias por gr de heces.

Cuadro 18. Número de unidades formadoras de colonias y concentración de bacterias de muestras en heces de cerdos en etapa de crecimiento.

TRAT	UFC g ⁻¹ heces	Conc. Bacterias g ⁻¹ heces	Concentración de bacterias totales en heces g ⁻¹
1	4.00 ^a	2,000,000 ^a	2.09 x 10 ¹¹
2	83.75 ^b	41,875,000 ^b	2.87 x 10 ¹¹
3	6.75 ^a	3,375,000 ^a	2.43 x 10 ¹¹
4	52.75 ^b	26,375,000 ^b	2.12 x 10 ¹¹

^{a,b,c}Medias de tratamiento o efecto principal con distinta literal indica diferencias estadísticas (P≤0.05).

UFC = Unidades formadoras de colonias por g de heces, CONC = Concentración de bacterias por g de heces.

Cuadro 19. Número de unidades formadoras de colonias y concentración de bacterias de muestras en heces de cerdos en etapa de finalización.

TRAT	UFC g ⁻¹ heces	Conc. Bacterias g ⁻¹ heces	Concentración de bacterias totales en heces g ⁻¹
1	29.00 ^a	14,500,000 ^a	1.96 x 10 ¹¹
2	125.50 ^b	62,750,000 ^b	2.75 x 10 ¹¹
3	12.00 ^a	6,000,000 ^a	1.96 x 10 ¹¹
4	111.00 ^b	55,500,000 ^b	2.81 x 10 ¹¹

^{a,b,c}Medias de tratamiento o efecto principal con distinta literal indica diferencias estadísticas (P≤0.05).

UFC = Unidades formadoras de colonias por g de heces, CONC = Concentración de bacterias por g de heces.

Cuadro 20. Concentración total de bacterias y de bacterias viables del género *Enterococcus*.

Etapa	Concentración total	Concentración <i>Enterococcus spp.</i>	% <i>Enterococcus spp.</i> respecto al total
Inicio	1.42×10^{11}	4.4×10^7	3.09
Crecimiento	2.38×10^{11}	1.8×10^7	0.76
Finalización	2.37×10^{11}	3.4×10^7	1.43

XI. ANEXOS

30	2	6	16.0	0.1	28.5	.3	10.51	0.8885	2.1128	2.3778	.8	16.94	59.6	43.8834	37.3166	0.2781
17.66																
31	1	6	16.0	0	25.2	.3	8.25	0.66	1.6042	2.4307	.7	14.95	48.3	42.9872	38.4821	0.2215
8.11																
32	4	8	14.5	0.1	20.7	.3	8.32	0.5657	1.6785	2.9671	.6	14.35	40.5	46.0774	40.4760	0.1958
16.56																
33	4	9	14.5	0.1	22.6	.3	9.81	0.8742	2.3485	2.6862	.7	17.82	53.2	46.7301	39.3237	0.2959
11.11																
34	2	8	16.0	0.1	23.4	.3	9.31	0.7371	1.7842	2.4205	.8	18.08	49.2	45.4631	39.7459	0.2547
17.05																
35	2	5	16.0	0.1	18.3	.2	6.72	0.4285	1.21	2.8233	.5	13.22	33.3	47.0521	42.6671	0.1599
13.95																
36	3	8	14.5	0	23.5	.3	9.86	0.7514	1.9328	2.5722	.6	19.04	49.8	46.1278	41.3334	0.2783
8.98																

PROC PRINT;

PROC GLM;

CLASS CERDO TRAT REP;

MODEL PESOINI GDINI AMLINI GDP CONS CONV GDFIN AMLFIN PESOFIN CMINI CMFIN GCMKG UREA= TRAT REP/SS3;

MEANS TRAT/TUKEY LINES;

LSMEANS TRAT/STDERR PDIFF adjust=tukey;

RUN;

PROC GLM;

CLASS CERDO TRAT REP FACTA FACTB;

MODEL PESOINI GDINI AMLINI GDP CONS CONV GDFIN AMLFIN PESOFIN CMINI CMFIN GCMKG UREA= FACTA FACTB /SS3;

LSMEANS FACTA*FACTB/STDERR PDIFF adjust=tukey;

RUN;

PROC GLM;

CLASS TRAT REP;

MODEL PESOINI GDINI AMLINI GDP CONS CONV GDFIN AMLFIN PESOFIN CMINI CMFIN GCMKG UREA= TRAT/SS3;

LSMEANS TRAT/STDERR PDIFF adjust=tukey;

RUN;

DATA FIN;

INPUT CERDO TRAT REP FACTA FACTB PESOINI GDINI AMLINI GDP CONS CONV GDFIN AMLFIN PESOFIN CMINI CMFIN GCMKG UREA;

CARDS;

1	3	1	12.5	0	63.7	1.1	21.00	0.9257		2.9871	3.2268	1.6	33.10	96.1	37.4947	37.2276	0.3397
18.87																	
2	2	1	14	0.1	51.1	.9	19.36	0.9914		2.8685	2.8933	1.4	30.74	85.8	39.6005	37.9659	0.3525
13.98																	
3	1	2	14	0	54	.7	18.47	0.9428		3.2214	3.4166	1.2	27.62	87	39.5519	37.3569	0.3183
19.01																	
4	4	4	12.5	0.1	51.2	.7	20.13	0.7714		1.86	2.4111	1.0	27.67	78.2	41.1310	38.9947	0.2695
13.26																	
5	3	2	12.5	0	55.8	1.0	21.36	0.8228		2.6442	3.2135	1.4	27.18	84.6	39.3579	36.7704	0.2613
10.79																	
6	1	3	14	0	53.7	.7	19.90	0.9628		3.17	3.2922	1.2	30.65	87.4	40.4441	38.4065	0.3385
23.56																	
7	4	5	12.5	0.1	57.7	1.0	19.79	0.8885		2.7328	3.0755	1.3	28.09	88.8	38.1725	37.0475	0.3106
15.40																	

8	3	3	12.5	0	51.2	.7	19.52	0.8942	2.9557	3.3051	.9	27.90	82.5	40.7575	38.9096	0.3209
18.52																
9	3	5	12.5	0	50.5	.7	16.04	0.8342	2.7585	3.3065	1.0	27.16	79.7	38.7569	38.6109	0.3200
10.84																
10	4	2	12.5	0.1	55.7	.8	19.59	0.8514	2.7042	3.1761	1.3	30.59	85.5	39.3720	38.2646	0.3081
17.06																
.
.
.
.
26	1	7	14	0	59.7	1.0	19.44	0.8657	3.1071	3.5891	1.7	33.39	90	37.6902	37.5616	0.3229
26.05																
27	2	9	14	0.1	40	.5	12.68	0.6657	1.6342	2.4549	.9	20.57	63.3	39.9982	38.2067	0.2338
22.11																
28	1	9	14	0	46.8	.7	17.42	0.6542	2.5357	3.8755	1.0	25.23	69.7	40.4320	39.0845	0.2377
23.41																
29	1	8	14	0	52.8	.8	16.69	0.9685	3.47	3.5825	1.4	26.52	86.7	38.2058	36.3499	0.3240
23.99																
30	2	6	14	0.1	59.6	.8	16.94	0.9714	2.7642	2.8455	1.4	30.10	93.6	37.3166	37.0261	0.3547
21.25																
31	1	6	14	0	48.3	.7	14.95	0.7685	2.2414	2.9163	1.1	23.49	75.2	38.4821	37.2733	0.2697
21.99																
32	4	8	12.5	0.1	40.5	.6	14.35	0.7514	2.9471	3.9220	1.0	19.66	66.8	40.4760	36.8974	0.2358
21.63																
33	4	9	12.5	0.1	53.2	.7	17.82	1.0657	3.1985	3.0013	1.1	27.63	90.5	39.3237	37.3525	0.3681
15.26																
34	2	8	14	0.1	49.2	.8	18.08	0.9085	2.9871	3.2877	1.3	28.56	81	39.7459	37.9793	0.3202
20.04																
35	2	5	14	0.1	33.3	.5	13.22
.																
36	3	8	12.5	0	49.8	.6	19.04	0.9885	3.0557	3.0910	1.1	26.76	84.4	41.3334	37.6143	0.3189
15.69																

```

PROC PRINT;
PROC GLM;
CLASS CERDO TRAT REP FACTA FACTB;
MODEL PESOINI GDINI AMLINI GDP CONS CONV GDFIN AMLFIN PESOFIN CMINI CMFIN GCMKG UREA= FACTA FACTB FACTA*FACTB/SS3;
LSMEANS FACTA*FACTB/STDERR PDIFF adjust=tukey;
RUN;

```

```

PROC GLM;
CLASS TRAT REP;
MODEL PESOINI GDINI AMLINI GDP CONS CONV GDFIN AMLFIN PESOFIN CMINI CMFIN GCMKG UREA= TRAT/SS3;
LSMEANS TRAT/STDERR PDIFF adjust=tukey;
RUN;

```

```

PROC GLM;
CLASS CERDO TRAT REP FACTA FACTB;
MODEL PESOINI GDINI AMLINI GDP CONS CONV GDFIN AMLFIN PESOFIN CMINI CMFIN GCMKG UREA= FACTA FACTB /SS3;
LSMEANS FACTA FACTB/STDERR PDIFF adjust=tukey;
RUN;

```

```

DATA HECES INI;
INPUT CERDO      TRAT REP COLONIAS CONC;
CARDS;
3      1      1      4      400000      2000000
6      1      2      9      900000      4500000
12     1      3      58     5800000     29000000
28     1      4      5      500000      2500000
15     2      1      42     4200000     21000000
27     2      2      125    12500000    62500000
30     2      3      18     1800000      9000000
35     2      4      235    23500000    117500000
1      3      1      377    37700000    188500000
5      3      2      128    12800000    64000000
8      3      3      289    28900000    144500000
24     3      4      240    24000000    120000000
4      4      1      141    14100000    70500000
7      4      2      53     5300000      26500000
33     4      3      180    18000000    90000000
20     4      4      403    40300000    201500000
PROC PRINT;
PROC GLM;
CLASS CERDO TRAT REP;
MODEL COLONIAS CONC=TRAT/SS3;
MEANS TRAT/TUKEY LINES;
LSMEANS TRAT/STDERR PDIFF adjust=tukey;
RUN;

```

```

DATA HECES CRECE;
INPUT CERDO      TRAT REP COLONIAS CONC;
CARDS;
3      1      1      3      300000      1500000
6      1      2      19     1900000      9500000
12     1      3      36     3600000      18000000
29     1      4      12     1200000      6000000
19     2      1      85     8500000      42500000
27     2      2      150    15000000     75000000
30     2      3      39     3900000      19500000
35     2      4      61     6100000      30500000
1      3      1      17     1700000      8500000
5      3      2      6      600000      3000000
8      3      3      70     7000000      35000000
24     3      4      25     2500000      12500000
4      4      1      22     2200000      11000000
21     4      2      23     2300000      11500000
33     4      3      80     8000000      40000000
14     4      4      86     8600000      43000000
PROC PRINT;
PROC GLM;
CLASS CERDO TRAT REP;
MODEL COLONIAS CONC=TRAT/SS3;
MEANS TRAT/TUKEY LINES;
LSMEANS TRAT/STDERR PDIFF adjust=tukey;
RUN;

```

```

DATA HECES FIN;
INPUT CERDO      TRAT REP COLONIAS CONC;
CARDS;
28      1      1      70      7000000      35000000
6       1      2      95      9500000      47500000
12      1      3      18      1800000      9000000
13      1      4      27      2700000      13500000
19      2      1      60      6000000      30000000
27      2      2      62      6200000      31000000
30      2      3      320     32000000     160000000
35      2      4      57      5700000      28500000
23      3      1      21      2100000      10500000
24      3      2      60      6000000      30000000
8       3      3      16      1600000      8000000
9       3      4      13      1300000      6500000
4       4      1     196     19600000     98000000
7       4      2      55      5500000      27500000
33      4      3      88      8800000      44000000
14      4      4     105     10500000     52500000
PROC PRINT;
PROC GLM;
CLASS CERDO TRAT REP;
MODEL COLONIAS CONC=TRAT/SS3;
MEANS TRAT/TUKEY LINES;
LSMEANS TRAT/STDERR PDIFF adjust=tukey;
RUN;

```