



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD
ANIMAL

“Uso de *Bacillus subtilis* como probiótico y de un complejo enzimático basado en amilasas, proteasas y xilanasas en pollos de engorda alimentados con dietas sorgo + soya.”

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA:
ITZEL CRISTINA BAUTISTA BORJAS

TUTORES PRINCIPALES
ERNESTO ÁVILA GONZÁLEZ (FMVZ-UNAM)
JUAN CARLOS DEL RÍO GARCÍA (FES CUAUTITLÁN-UNAM)
GABRIELA GUADALUPE GÓMEZ VERDUZCO (FMVZ-UNAM)



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIAS

A mi amada UNAM, por abrigarme una vez más bajo sus alas.

A mis padres, por el apoyo incondicional que siempre he recibido de ustedes.

A Alex y Adrián, por enseñarme día con día el significado de hermandad.

A mis amigos de toda la vida, Ana Méndez y Oscar Hernández, por el consejo certero, el abrazo incondicional y las sonrisas sinceras.

A mis amigos, Sarahí Ramírez, David Ramos, Rebeca Anaya, Arturo Montes, Valentín de la Cruz, porque empezamos como compañeros y terminamos como buenos amigos, gracias por darme esa oportunidad y enriquecer mi existencia.

AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Avícola y al personal por las facilidades para la elaboración del experimento de tesis.

A CONACYT, por el apoyo económico brindado para la realización de este trabajo.

Al Departamento de Patología y al Departamento de Medicina y Zootecnia de aves, de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM por abrir sus puertas y permitirme trabajar en sus aulas.

Al laboratorio Dupont Animal Nutrition, por todo el apoyo recibido y por brindarme una experiencia inigualable.

A mi tutor, Dr. Ernesto Ávila González, por brindarme la confianza y la oportunidad de aprender de usted, como académico y como persona.

Al comité tutor, Dr. Juan Carlos Del Río y Dra. Gabriela Gómez, por sus valiosos consejos para culminar este trabajo.

A los sinodales, Dr. Antonio Díaz, Dr. Benjamín Fuente, Dra. Irma Tejada, Dr. Mauricio Trujillo, por sus invaluable consejos que, sin duda, enriquecieron sobremanera este trabajo.

Al M. en C. Aaron López, por toda la ayuda que recibí de tu parte, así como por tus valiosos consejos.

A Lázaro Herrera y los chicos de servicio social que siempre estuvieron presentes y dispuestos a ayudarme.

A Sarahí, David, Arty, Rebe, Mota, Martín, José, Jimmy, no sé que hubiera sido de mí sin su ayuda para la toma y procesamiento de muestras. Mil gracias!

A Mireya Juárez, por caer del cielo y sentarte a mi lado en ese curso de estadística, así como por compartir tu conocimiento y amistad conmigo.

A Victor Petrone, porque después de un tiempo uno llega a comprender que tus regaños son muestra de afecto... Espero! Gracias por compartir tu conocimiento y brindarme confianza.

A Rafael Hernández, por enseñarme tantas cosas en tan poco tiempo... y lo que falta!

RESUMEN

Con el objetivo de evaluar los parámetros productivos, morfometría y microbiología intestinal e inmunidad humoral en pollos de engorda alimentados con dietas basadas en sorgo + soya y adicionadas con un complejo enzimático (amilasas, proteasas y xilanasas) y un probiótico (*Bacillus subtilis*), se realizó un estudio con 780 pollos de un día de edad distribuidos en un diseño completamente al azar, con un arreglo factorial 2x3. El primer factor fueron las dietas (Basal positiva + y basal negativa -) y el segundo factor los aditivos (Testigo, Probiótico, Probiótico+enzimas). Se tomaron muestras de duodeno, yeyuno e íleon y se midió la longitud de vellosidades, espesor de lámina propia, y profundidad de criptas. Se determinaron los títulos de anticuerpos séricos a la enfermedad de Newcastle e IgA secretora en duodeno. Se realizó el conteo de coliformes totales en intestino. En el factor dietas, se observó 7% más ($p<0.05$) peso corporal, 8% más de ganancia de peso, 8 puntos menos de índice de conversión y 2% más de rendimiento en canal en los animales que consumieron la dieta Basal positiva (+), la cual tenía mayor contenido de energía metabolizable, proteína y aminoácidos esenciales. En el factor aditivos, se observó 1.6% más ($p<0.05$) peso corporal y ganancia de peso en los pollos adicionados con Probióticos y Probióticos+enzimas. En duodeno se apreció que la lámina propia fue 28% más delgada ($p<0.05$) con el consumo de los aditivos; con la dieta Basal positiva (+), las vellosidades fueron 6.5% más largas. Se encontró interacción Dietas x Aditivos en yeyuno e íleon ($p<0.05$). No se observó diferencia estadística ($p>0.05$) en la inmunidad humoral. En los pollos que consumieron la dieta Basal negativa (-), así como Probióticos solos o en combinación con enzimas disminuyeron ($p<0.05$) los conteos de coliformes totales. Se concluye de la información obtenida, que el complejo enzimático a base de (amilasas, proteasas y xilanasas) y el probiótico (*Bacillus subtilis*) mejoran el valor alimenticio de dietas sorgo + soya para pollos de engorda.

Palabras Clave: amilasas, proteasas, xilanasas, *Bacillus subtilis*, sorgo, soya

ABSTRACT

In order to evaluate performance, intestinal morphometric and microbiology and humoral immunity in chicks fed diets based on sorghum + soybean and supplemented with a probiotic (*Bacillus subtilis*) and a multi-enzyme complex (amylase, protease and xylanase), the present study was conducted. Seven hundred and eighty one day old broiler chickens were distributed in a completely randomized design with a 2x3 factorial arrangement. One factor was the diets (Basal positive and Basal negative) and the second factor was the use of additives (Control, Probiotic, Probiotic +enzymes). Samples were taken from duodenum, jejunum and ileum and were measured the length of villi, lamina propria thickness, mucosal thickness and depth crypts. Serum antibody titers to Newcastle disease and IgAs in duodenum were determined and intestinal total coliform count was measured. In factor diets, in animals fed the Basal positive (+) diet 7% higher ($p < 0.05$) body weight, 8% higher body weight gain, 8 points lower feed conversion rate and 2% heavier carcass yield was observed. In factor additives, 1.6% higher ($p < 0.05$) body weight and weight gain was observed in chickens fed with Probiotics alone or in combination with enzymes. No statistical difference was observed ($p > 0.05$) in humoral immunity. In duodenum, the lamina propria was 28% thinner ($p < 0.05$) with the addition of additives; chickens fed with Basal positive (+) diet, had 6.5% longer villi. Interaction between Diets x Additives was observed in jejunum and ileum ($p < 0.05$). No statistical difference ($p > 0.05$) was observed in humoral immunity. In chicks fed the Basal negative (-) diet and probiotics alone or in combination with enzymes decreased ($p < 0.05$) total coliform counts. It is concluded from the data obtained that the enzyme complex containing amylases, proteases and xylanases and the probiotic based in *Bacillus subtilis* improve the nutritional value of sorghum + soybean diets for broilers.

Keywords: amylase, protease, xylanase, sorghum, soybean meal

ÍNDICE	PÁGINA
1. Introducción	1
1.1 Avicultura en México	1
1.2 Sistema digestivo de las aves	2
1.3 Probióticos	3
1.3.1 Género <i>Bacillus spp</i>	5
1.3.2 Cinética de tránsito	5
1.3.3 Mecanismos de probiosis	6
1.3.4 Uso de probióticos del género <i>Bacillus spp.</i> en pollo de engorda	7
1.4 Enzimas exógenas	8
1.4.1 Enzimas exógenas en cereales no viscosos	9
1.4.2 Amilasas	10
1.4.3 Xilanasas	10
1.4.4 Proteasas	11
1.4.5 Uso de enzimas exógenas en pollo de engorda	12
1.5 Justificación	14
1.6 Objetivo general	15
1.6.1 Objetivos particulares	15
1.7. Hipótesis	16
2. Material y Métodos	17
2.1 Diseño de tratamientos	17
2.2 Dietas	18
2.3 Parámetros productivos	21
2.4 Análisis histológicos	21
2.5 Inmunidad humoral	23
2.6 Conteos de coliformes totales	23
2.7 Análisis estadístico	24
3. Resultados	25
3.1 Parámetros productivos	25
3.2 Análisis histológicos	28
3.3 Inmunidad humoral	42
3.4 Conteos de coliformes totales	43
4. Discusión	44
4.1 Parámetros productivos	44
4.2 Análisis histológicos	47
4.3 Inmunidad humoral	50
4.4 Conteos de coliformes totales	51
5. Conclusiones	53
6. Referencias	54
7. Anexos	65

ÍNDICE DE CUADROS	PÁGINA
Cuadro 1. Composición y análisis calculado de dietas sorgo + soya en iniciación de los pollos adicionados con <i>Bacillus subtilis</i> y un complejo enzimático.	19
Cuadro 2. Composición y análisis calculado de dietas sorgo + soya en finalización de los pollos adicionados con <i>Bacillus subtilis</i> y un complejo enzimático.	20
Cuadro 3. Variables productivas de pollos alimentados con dietas sorgo + soya, adicionados con <i>B. subtilis</i> y un complejo enzimático, de 1- 21 días de edad.	25
Cuadro 4. Comportamiento productivo de pollos alimentados con dietas sorgo + soya, adicionados con <i>B. subtilis</i> y un complejo enzimático, de 22- 42 días de edad.	26
Cuadro 5. Resultados globales de los pollos alimentados con dietas sorgo + soya, adicionados con <i>B. subtilis</i> y un complejo enzimático, de 1- 42 días de edad.	27
Cuadro 6. Cambios histológicos en duodeno de pollos alimentados con dietas sorgo + soya, <i>B. subtilis</i> y un complejo enzimático, a los 21 y 42 días de edad.	28
Cuadro 7. Análisis histológicos en yeyuno de pollos alimentados con dietas sorgo + soya, <i>B. subtilis</i> y un complejo enzimático, a los 21 y 42 días de edad.	30
Cuadro 8. Cambios histológicos en íleon de pollos alimentados con dietas sorgo + soya, <i>B. subtilis</i> y un complejo enzimático, a los 21 y 42 días de edad.	36
Cuadro 9. Respuesta inmune humoral en pollos alimentados con dietas sorgo + soya, <i>B. subtilis</i> y un complejo enzimático, a los 21 y 42 días de edad.	42

Cuadro 10. Conteos de coliformes totales en el contenido de íleon de pollos de engorda alimentados con dietas sorgo + soya, *B. subtilis* y un complejo enzimático, al día 42 de edad. 43

ÍNDICE DE FIGURAS	PÁGINA
Figura 1. Vellosidades intestinales aptas para realizar las mediciones.	22
Figura 2. Vellosidades intestinales no aptas para mediciones.	22
Figura 3. Ilustración de las vellosidades duodenales al día 21 de edad.	29
Figura 4. Cortes histológicos de las vellosidades duodenales al día 42 de edad.	29
Figura 5. Interacción Dieta x Aditivos en la longitud de vellosidades, en yeyuno al día 21 de edad.	31
Figura 6. Efecto gráfico de interacción Dieta x Aditivos en el espesor de lámina propia, en yeyuno al día 21 de edad.	32
Figura 7. Interacción en la profundidad de criptas, en yeyuno al día 21 de edad.	33
Figura 8. Efectos de interacción Dieta x Aditivos en la profundidad de criptas, en yeyuno al día 21 de edad.	34
Figura 9. Cortes histológicos de las vellosidades de yeyuno al día 21 de edad	35
Figura 10. Ilustración de las vellosidades de yeyuno al día 42 de edad.	35
Figura 11. Interacción Dieta x Aditivos en la longitud de vellosidades, en íleon al día 21 de edad.	37
Figura 12. Efecto de interacción Dieta x Aditivos en el espesor de lámina propia en íleon al día 21 de edad.	38
Figura 13. Gráfica de interacción Dieta x Aditivos en la profundidad de criptas en íleon al día 21 de edad.	38
Figura 14. Interacción Dieta x Aditivos en la longitud de vellosidades en íleon al día 42 de edad.	39

Figura 15. Efecto de interacción Dieta x Aditivos en la profundidad de criptas en íleon al día 42 de edad.	40
Figura 16. Cortes histológicos de las vellosidades de íleon al día 21 de edad.	40
Figura 17. Ilustración de las vellosidades de íleon al día 42 de edad.	41

1. INTRODUCCIÓN

La carne de pollo, integrante de la canasta básica, es una de las principales carnes que son consumidas en México y constituye una parte importante en la alimentación como fuente de proteínas. Existen diversos elementos que han favorecido el incremento en el consumo de esta carne en el país, según la Unión Nacional de Avicultores (UNA), los factores que favorecen el consumo de la carne de pollo son: la versatilidad que tiene este alimento al permitir diferentes formas de preparación, el cambio en los hábitos alimenticios debido a que existe la tendencia de consumo hacia carnes blancas (de bajo contenido graso) y el incremento de restaurantes de comida rápida. Otro factor importante, que influye en el consumo de la carne de pollo, está en función de su precio, pues resulta altamente competitivo con respecto al precio de otros cárnicos (cerdo y res), por lo que se convierte en un producto con mayor accesibilidad para personas de cualquier estrato social.¹

1.1 Avicultura en México

En México una de las actividades ganaderas con mayor desarrollo en los últimos años es la avicultura, ya que de 1997 a 2011 presentó una tasa media de crecimiento anual de 5.2% y en 2012 representó el 63 % de la producción pecuaria nacional. El volumen de la producción de carne de pollo en 2012 fue de 2,791,639 toneladas, con un valor de 76,096,680 de pesos², con lo cual mantiene el primer lugar dentro de la producción de carne en el ámbito nacional, mismo que ocupa desde 1997, año en que rebasó a la carne de bovino con un 7.6% más en niveles de producción.¹ De la misma manera, el consumo per-cápita de la carne de pollo aumentó de 15.83 Kg en 1994 a 25.70 Kg durante el año 2012.³ En 2012, la producción de huevo fue de 2,318,261 toneladas con un valor de producción de 38,166,797 de pesos² y se tuvo un consumo per cápita de 20.8 Kg.³

1.2 Sistema digestivo de las aves

El concepto empleado anteriormente de definir al sistema digestivo como meramente metabólico ha evolucionado, esto debido a que también desarrolla otras funciones distintas a la digestión, absorción y metabolismo de nutrientes. El tubo digestivo representa un punto de reunión para expertos en disciplinas como la clínica, zootecnia, nutrición, inmunología y bioquímica. Por lo tanto es necesario lograr un conocimiento más profundo de su estructura, composición, funcionamiento e interacciones.⁴ La salud del sistema digestivo y la nutrición están íntimamente ligadas; por ejemplo, una lesión intestinal afectará el proceso digestivo, así como una pobre calidad de los nutrientes en la dieta ocasionará una menor productividad.⁵ El tracto gastrointestinal de las aves se puede subdividir en secciones anatómicas (pico, esófago, inglubis, proventrículo, ventrículo, intestino delgado, intestino grueso y ciegos). De todas las secciones anatómicas, el intestino delgado es el que se involucra más críticamente en los procesos de digestión y absorción de los nutrientes de la dieta. El intestino grueso y ciegos son regiones muy importantes de colonización microbiana.⁶ El epitelio intestinal se puede dividir a su vez en 5 regiones principales: la capa de células epiteliales que forman las microvellosidades y vellosidades, lámina propia, lámina *muscularis mucosae*, el tejido linfoide asociado a intestino (GALT, por sus siglas en inglés) o sistema inmune intestinal y la capa muscular.^{6,7} El epitelio intestinal es la primera línea de defensa natural contra microorganismos invasores, cuya integridad favorece la absorción de nutrientes y evita el establecimiento de agentes patógenos.⁷

Por otra parte, la microbiota intestinal se define como la mezcla compleja de poblaciones bacterianas, que colonizan un área determinada del tracto gastrointestinal en animales que no han sido afectados por intervención médica, experimental o enfermedad.⁸ La composición dietaria y la microflora, así como la interacción entre ambas, puede afectar el desarrollo intestinal y la arquitectura de la mucosa.⁹ La microflora intestinal puede ser regulada de varias maneras, y a su

vez, la microbiota puede regular la fisiología y nutrición del animal. La elección de los nutrientes dietarios puede afectar dramáticamente el perfil microbiano en el intestino, lo mismo sucede con el uso de aditivos, como son antibióticos, prebióticos, probióticos, o enzimas exógenas.¹⁰

Las principales funciones de los probióticos incluyen: 1) favorecer el desarrollo de una microbiota saludable/ predominio de bacterias benéficas, 2) reducción/ prevención de la colonización por microorganismos patógenos, 3) mejora de la inmunidad mucosa, 4) incrementar la capacidad digestiva, 5) aumentar la maduración e integridad del tejido intestinal.^{8,9} Las enzimas exógenas, a su vez, afectan la microbiota intestinal al incrementar la digestión de los ingredientes dietarios y de esta manera remover los sustratos fermentables por ciertas bacterias. De esta manera no solo se reducen las poblaciones bacterianas si no que también se modifica la diversidad de dichas poblaciones.¹¹

Los mecanismos de acción de los probióticos y enzimas exógenas, se describen con más detalle a continuación.

1.3 Probióticos

El interés en la microbiología intestinal y el uso dietético de probióticos floreció en los años 1800 y principios de 1900. Entre 1907-1908, Elias Metchnikoff estableció las bases de lo que ahora conocemos como microorganismos probióticos o microorganismos de alimentación directa (DFM, por sus siglas en inglés); él propuso que las bacterias intestinales eran dañinas y que el consumo de bacterias ácido lácticas contenidas en lácteos fermentados tenían un efecto positivo en la salud.^{12,13}

El tracto gastrointestinal está más densamente poblado con microorganismos que cualquier otro órgano. Los microorganismos dominantes, en términos numéricos, son anaerobios, incluyendo bacteroides, bifidobacterias, eubacterias, estreptococos, lactobacilos y enterobacterias. El equilibrio de la microbiota es frágil

y se puede afectar por diversos factores, tales como la dieta, medicación, edad, ambiente y estrés.¹⁴ Como ya se mencionó, los nutrientes contenidos en la dieta pueden influenciar la composición de la microbiota, pues para que una especie microbiana particular se establezca es necesario que encuentre los nutrientes adecuados y espacio en el cual vivir.¹⁵

Las bacterias que se encuentran de manera natural en el intestino se denominan “autóctonas”, estas colonizan el intestino como resultado de la exposición ambiental y alimentación; las bacterias “alóctonas” se introducen al tracto digestivo como suplementos dietarios a través del alimento o agua de bebida.¹⁶

Los probióticos se definen como suplementos alimenticios basados en microorganismos vivos que afectan de manera benéfica el organismo animal, al mejorar su balance intestinal.¹⁷ Estos caen en dos amplias clasificaciones, los usados en la alimentación humana y los usados en la alimentación animal; estos últimos son considerados alternativas al uso de antibióticos, de ahí que sean empleados como promotores del crecimiento. No existe una clase universal de bacterias probióticas; se utilizan bacterias autóctonas, como es el caso de las bacterias ácido lácticas (por ejemplo, *Lactobacillus spp.*) y bacterias alóctonas, como las bacterias formadoras de esporas (Por ejemplo, el género *Bacillus spp.*).¹⁸

En producción animal, uno de los principales intereses es la relación entre nutrición y salud intestinal. En animales monogástricos la digestión, absorción y barrera intestinal se deben optimizar para ocupar la mínima cantidad de nutrientes utilizados en respuestas inmunológicas e inflamatorias y así lograr el máximo desempeño productivo.¹³ Una microbiota estable es esencial para que un animal resista a las infecciones, particularmente en el intestino, este fenómeno se ha descrito como antagonismo bacteriano, interferencia bacterial, resistencia a la colonización o exclusión competitiva.¹⁹ Esto se logra con el uso de probióticos, el cual se ha establecido en el sector avícola debido a su potencial para reducir la

presentación de enfermedades entéricas y la subsecuente contaminación de los productos avícolas.¹²

1.3.1 Género *Bacillus* spp

Las especies del género *Bacillus* son bacterias saprófitas Gram-positivas, encontradas comúnmente en el suelo, agua, polvo o aire. Al considerarse alóctonas, estas entran al tracto gastrointestinal en asociación con el alimento.¹⁸ Son bacterias formadoras de esporas, producidas para sobrevivir en condiciones ambientales extremas. La esporulación se produce al haber una disminución de nutrientes en la vecindad de las bacterias, las cuales entonces sufren un proceso irreversible de desarrollo que da como resultado la formación de una spora 8 horas después.²⁰ La spora contiene en el centro un cromosoma condensado inactivo rodeado de capas ricas en peptidoglicano que forman el córtex y una o más capas de material proteínico referido como la envoltura de la spora.²¹ Estas capas protegen a la spora de radiación ultravioleta, calor extremo (80-85 °C), exposición a solventes, peróxido de hidrógeno y enzimas (lisozima). La spora por sí misma se encuentra deshidratada y si se expone a los nutrientes apropiados, esta germina en cuestión de minutos, dando paso nuevamente a la célula vegetativa.²² Algunas ventajas de los probióticos basados en esporas bacterianas son su resistencia al calor, lo que permite su almacenamiento a temperatura ambiente y en forma deshidratada; de la misma manera son capaces de alcanzar el intestino delgado y sobrevivir al pH ácido del estómago.²³

1.3.2 Cinética de tránsito

En humanos, con bacterias del género *B. stearothermophilus* y *B. polyfermenticus* se ha visto excreción de esporas por 10 y 14 días respectivamente, después de que se administra la última dosis.¹⁸ Con el uso de *Bacillus cereus* en pollo de engorda se ha visto germinación en todos los segmentos intestinales, con mayores unidades formadoras de colonias en yeyuno; la germinación se detectó desde 30 minutos posteriores a la inoculación.²⁴ En modelos murinos, con el uso

de *B. subtilis* se ha visto germinación dentro de las tres horas posteriores a la ingesta de las esporas, así como replicación de las células vegetativas una vez germinadas, al detectarse hasta 6 veces más esporas de las inoculadas inicialmente.²⁵ La célula vegetativa es sensible a las condiciones del estómago y tracto gastrointestinal; las esporas, por otra parte, son resistentes a las condiciones antes mencionadas.¹⁸

1.3.3 Mecanismos de Probiosis

Los mecanismos de probiosis propuestos incluyen la inhibición de patógenos debido a la competencia por sustratos, producción de compuestos tóxicos que crean un ambiente desfavorable (sustancias inhibitorias con efecto antibiótico, ácidos grasos volátiles que favorecen la disminución del pH, enzimas), competencia por sitios de unión en el epitelio intestinal y estimulación del sistema inmunológico.¹²

-Exclusión competitiva y competición por nutrientes. Se han propuesto numerosos mecanismos de exclusión competitiva, incluyendo competencia por los sitios receptores en la mucosa del hospedero, producción de ácidos grasos volátiles y competencia por nutrientes esenciales.¹⁸

-Síntesis de antimicrobianos. Esta se considera uno de los principales mecanismos de probiosis, terapia de interferencia microbiana, que inhibe patógenos en el tracto gastrointestinal. *Bacillus subtilis* sintetiza una amplia gama de metabolitos, entre ellas natocinasas que es una proteasa de serina con acción fibrinolítica, aminocoumacina A que es un antibiótico con actividad contra *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium*, *Shigella flexneri*, *Camphylobacter jejuni* y *Helicobacter pylori*, e isocoumarina que es una proteasa.^{18,22}

-Estimulación inmunológica. Varias especies de *Bacillus*, *B. subtilis* en particular ha mostrado ser de gran importancia en el desarrollo del tejido linfoide asociado a intestino (TLAI), en donde el proceso de esporulación es clave en el mecanismo

de inmunoestimulación.^{22,26} Se ha visto que posterior a la administración oral de *B. subtilis*, las esporas se diseminan a las placas de Peyer y linfonodos mesentéricos, en donde pueden estimular la proliferación de células dentro de los centros germinativos de dichos tejidos. A su vez, las esporas son capaces de inducir la producción de citocinas TNF- α , IFN- γ , IL-1 α , IL-5 e IL-6 en linfonodos mesentéricos^{18,27}; los títulos de IgA secretora e IgG sistémica también se ven incrementados.²⁸ El componente de peptidoglicano de la fase vegetativa de la bacteria ha mostrado estimular la proliferación de linfocitos CD4+ y CD8+.¹⁸

1.3.4 Uso de probióticos del género *Bacillus spp.* en pollo de engorda

Fritts *et al.* (2000)²⁹ reportaron que la inclusión de *B. subtilis* en dietas maíz + pasta de soya como ingredientes principales, en pollo de engorda de la estirpe Cobb 500, mejoró el peso corporal, mejoró el índice de conversión a los 42 días y tuvo un efecto favorable en la calidad microbiológica de las canales, al disminuir los conteos de *Salmonella spp.*, *Escherichia coli* y *Campylobacter jejuni*. Cortés *et al.* (2000)³⁰ adicionaron *Bacillus toyoi* en dietas para pollos de engorda de la estirpe Arbor Acres, con sorgo + pasta de soya como ingredientes principales y encontraron un aumento en la ganancia de peso a los 49 días, así como una disminución significativa en la mortalidad ocasionada por síndrome ascítico. La Ragione *et al.* (2001)³¹ y La Ragione y Woodward (2003)³² observaron que la administración de *B. subtilis* en pollitos Leghorn libres de patógenos específicos, de un día de edad, disminuyó la colonización intestinal, así como de hígado y bazo por *Salmonella enteritidis* (S1400 nap^l), *Clostridium perfringens* cepa FDOO 385 y *E. coli* O78:K80 respectivamente. Khaksefidi y Ghoorchi (2006)³³ observaron que en dietas para pollos de engorda de la estirpe Ross, con maíz + pasta de soya como ingredientes principales, la adición de *B. subtilis* mejoró la ganancia de peso y disminuyó la conversión alimenticia a los 1-21 y 22-42 días de edad. Teo y Tan (2007)³⁴ adicionaron *B. subtilis* en dietas con maíz + pasta de soya como ingredientes principales, en pollos de la estirpe Ross y a los 42 días de edad observaron disminución en el índice de conversión respecto a los pollos que no

fueron adicionados y no observaron diferencia respecto a los adicionados con bacitracina de zinc como promotor de crecimiento; también observaron que con la inclusión de *B. subtilis* en la dieta, hubo una disminución en la colonización por *Clostridium spp* y *E. coli* en intestino. Molnar *et al.* (2011)³⁵ observaron que la inclusión de *B. subtilis* en dietas con maíz + pasta de soya como ingredientes principales, en pollos de engorda de 42 días de edad, mejoraron la ganancia de peso, índice de conversión, el porcentaje de pechuga, los títulos de anticuerpos a la vacunación contra la enfermedad de Newcastle y disminuyeron los conteos de *E. coli* en íleon. Sen *et al.* (2012)³⁶ adicionaron *B. subtilis* a dietas basadas en maíz + pasta de soya, en pollos de engorda de la estirpe Ross de 35 días de edad y observaron mayor ganancia de peso, consumo de alimento, menor índice de conversión, mejora en la retención de energía bruta y proteína cruda, disminución en los conteos cecales de *Clostridium spp* y coliformes y mayor altura en las vellosidades intestinales de duodeno e íleon. Amerah *et al.* (2013)³⁷ adicionaron *B. subtilis* a dietas basadas en maíz + pasta de soya, en pollos de engorda de la estirpe Ross y observaron un menor índice de conversión y mayor secreción de Ig A secretora duodenal en los animales que fueron adicionados con el probiótico.

1.4 Enzimas exógenas

En la producción avícola el alimento representa el rubro más importante de los costos de producción, con oportunidades de modificación gracias al uso de la tecnología disponible; de la misma manera, las prácticas de alimentación se reflejan de manera contundente sobre los parámetros productivos.⁵ El rendimiento de los animales depende de la digestibilidad de los nutrientes contenidos en los alimentos y el grado de absorción y utilización de los mismos. Existen nutrientes en los alimentos que no pueden ser digeridos ni absorbidos por las aves, de la misma manera, existen diferentes factores que pueden llegar a interferir con la digestibilidad, absorción y utilización de los mismos.³⁸ La mayoría de los

ingredientes vegetales usados en las raciones para aves contienen compuestos que pueden tener efectos antinutricionales (taninos, fitatos, polisacáridos no amiláceos) y afectar el rendimiento del animal, sin embargo, la mayor parte de dichos compuestos son potencialmente susceptibles a la modificación enzimática.³⁹

El uso de enzimas en el sector pecuario es una herramienta que permite el mejor uso de los ingredientes contenidos en la dieta, contribuyendo a aumentar la digestibilidad de la materia prima.⁴⁰ Estas se introdujeron en el sector avícola desde los 80's, enfocando principalmente su uso en granos viscosos (trigo y cebada) con un alto contenido de fibra soluble, lo cual afectaba los parámetros productivos de las aves. Las primeras en introducirse al mercado fueron las xilanasas y β -glucanasas, que resolvieron satisfactoriamente los problemas relacionados con el uso de dichos granos. En los 90's se introdujeron al mercado las fitasas, que aportaban el beneficio adicional de reducir la excreción de fósforo, disminuyendo de esta manera el costo ecológico de la producción en aves y cerdos.⁴¹ El uso de enzimas en cereales no viscosos (maíz, sorgo), se introdujo a finales de los 90's, consistiendo en complejos multienzimático basados en una combinación de amilasas, proteasas y xilanasas.⁴²

1.4.1 Enzimas exógenas en cereales no viscosos

Las enzimas se clasifican de acuerdo al sustrato que degradan. De manera general, existen cuatro tipos de enzimas que se emplean en las dietas para aves: las enzimas para degradar fibra, proteolíticas, amilasas y fitasas.^{41,43} La suplementación con enzimas se ha vuelto una práctica común en la elaboración de dietas para aves y cerdos, como una manera de mejorar la utilización de nutrientes y la eficiencia productiva, aunados a estos beneficios, se ha mostrado que las enzimas también tienen influencia en el ecosistema microbiano intestinal, dirigiéndolo a un estado más saludable, al favorecer el desarrollo de microbiota benéfica como *Lactobacillus spp.*⁴⁴

1.4.2 Amilasas

El grado de digestibilidad del almidón en ingredientes vegetales varía de acuerdo a la cantidad de almidones resistentes, tamaño de los gránulos de almidón, así como composición y encapsulación de los mismos, tal variabilidad se debe a diversos factores tales como las diferencias genéticas de las plantas, condiciones de cultivo, manejo, secado, almacenaje, y procesos de elaboración del alimento. Las amilasas degradan el almidón en los granos haciendo más disponibles dichos nutrientes para el animal.⁴¹ El maíz ha sido visto como un estándar de oro de materias primas, al considerar que tiene una digestibilidad de alrededor del 95%; sin embargo, diversos estudios han demostrado que en pollos de engorda de 4-21 días de edad, la digestibilidad del almidón en íleon raramente excede el 85%.⁴³ De la misma manera, se ha reportado que la secreción neta diaria de amilasa en el duodeno es baja a los 4 días de edad e incrementa conforme avanza la edad del ave. La adición de amilasas a las dietas para aves, puede ayudar a exponer y digerir el almidón de manera más rápida en el intestino delgado y como consecuencia llevar a una mejora en el crecimiento.⁴⁵

1.4.3 Xilanasas

Todos los ingredientes vegetales contienen fibra, existen dos tipos principales de fibra, la soluble y la insoluble. La fibra puede actuar de muchas formas como un antinutriente; en el caso de la fibra insoluble esta puede atrapar partículas de almidón y proteína en la fibra insoluble de las paredes celulares de los cereales. Debido a que las aves no poseen enzimas para digerir dicha fibra, los nutrientes quedan inaccesibles para los animales. Por su parte, la fibra soluble se disuelve en el intestino de los animales formando geles viscosos que atrapan los nutrientes, disminuyendo la digestión y tránsito intestinal. Más aún, la fibra puede atrapar agua y nutrientes solubles, así como disminuir el vaciado gástrico con la consecuente disminución en el consumo de alimento y crecimiento corporal.⁴¹ La fibra insoluble es una compleja mezcla de polisacáridos que se encuentra

predominantemente en las paredes celulares de las plantas y está formada por polisacáridos no amiláceos (PNA) -de naturaleza distinta al almidón- y lignina. Los PNA son polímeros de monosacáridos unidos por medio de enlaces glucosídicos. En los granos de cereales, la cascarilla (pericarpo y testa) está compuesta por PNA insolubles y lignina, de ahí que la celulosa y hemicelulosa están presentes en el endospermo y en las paredes celulares primarias de cereales, en una proporción de 35%-50% de celulosa, 25%-30% de hemicelulosa y 10-25% de lignina.⁴⁶⁻⁴⁸ Las xilanasas desdoblan los arabinoxilanos, prevalentes en granos de cereales y sus subproductos, liberando partículas de almidón y proteína que pudieran estar atrapadas y xilooligosacáridos de diversos tamaños.⁴⁸

1.4.4 Proteasas

Distintos ingredientes contribuyen con el contenido de proteína en la dieta de los animales, por lo que existe gran variabilidad en la calidad y disponibilidad de la proteína en las dietas formuladas para monogástricos.⁴³ Las semillas, en particular las de leguminosas como la soya, contienen altas concentraciones de proteínas de almacenaje, generadas por la planta para proveerle una fuente de nitrógeno durante la germinación. Estas proteínas de almacenaje pueden unirse a los almidones disminuyendo su disponibilidad para ser digeridas y absorbidas; aunado a ello, las semillas de leguminosas también contienen factores antinutricionales como los inhibidores de tripsinas que pueden inhibir la digestión al bloquear a la enzima tripsina y las lectinas que son proteínas ligadoras de almidón, lo que también reduce su digestibilidad. Las proteasas son enzimas degradadoras de proteína empleadas en dietas de aves y cerdos, al añadirlas a las dietas se pueden neutralizar los efectos negativos de los factores antinutricionales proteínicos contenidos en las leguminosas y romper las proteínas de almacenaje, lo que hará más disponibles los nutrientes para su digestión y absorción.⁴¹

1.4.5 Uso de enzimas exógenas en pollo de engorda

Ritz *et al.* (1995)⁴⁹ utilizaron pavitos hasta las 5 semanas de edad y adicionaron amilasa o xilanas a las dietas; ellos observaron un incremento en el peso corporal, consumo de alimento, eficiencia alimenticia y mayor longitud de vellosidades yeyuno e íleon en los pavos a los que se adicionó amilasa en la dieta. Mahagna *et al.* (1995)⁵⁰ utilizaron dietas basadas en sorgo + pasta de soya y adicionaron amilasa y proteasa en las dietas de pollos de engorda de 14 días de edad, ellos observaron un menor peso en intestino delgado, una disminución de las enzimas pancreáticas quimiotripsina, tripsina y amilasa y mejora en la digestibilidad de aminoácidos. Douglas y Parsons (2000)⁵¹ emplearon un producto comercial que contenía 2000 U/g de amilasa, 800 U/g de xilanas y 6000 U/g de proteasa en dietas con maíz + pasta de soya como ingredientes principales, ellos observaron un aumento en la energía digestible ileal con la inclusión del complejo enzimático. Café *et al.* (2002)⁵² emplearon un producto que contenía amilasas, xilanasas y proteasas en dietas con maíz + pasta de soya como ingredientes principales en pollos de engorda de la estirpe Cobb 500, ellos observaron mayor peso corporal en los pollos que consumieron las dietas adicionadas con el complejo enzimático, así como menor mortalidad acumulada. Gracia *et al.* (2003)⁵³ adicionaron 1720 U de alfa-amilasa/ Kg de alimento a dietas para pollos de la estirpe Cobb 500, basadas en maíz + pasta de soya y observaron mayor ganancia de peso, menor índice de conversión, un aumento en la digestibilidad ileal del almidón y una disminución en el peso del páncreas en los pollos que consumieron las dietas en las que se usó la enzima. Onderci *et al.* (2006)⁵⁴ emplearon amilasas microbianas en dietas para pollos de engorda de la estirpe Cobb 500, basadas en maíz + pasta de soya, y observaron mejor ganancia de peso, consumo de alimento, conversión alimenticia, disminución en el peso del páncreas, mayor altura y ancho de vellosidades, mejor digestión de la materia orgánica y materia seca en los pollos que fueron adicionados con amilasa microbiana en el agua de bebida.

Cowieson *et al.* (2006)^{55,56} agregaron un producto comercial que contenía 300 U/g de xilanasas, 400 U/Kg de α -amilasa, 4000 U/Kg de proteasa y 500 U/Kg de fitasa a dietas basadas en maíz + pasta de soya, en pollos de engorda de la estirpe Ross 308, ellos observaron que en pollos que consumieron la dieta adicionada con el producto enzimático presentaron mejor digestibilidad de nutrientes en dietas sin reducción de nutrientes y mayor digestibilidad de fósforo, calcio, sodio, materia seca y grasa; también observaron mejora en el índice de conversión. Liu *et al.* (2011)⁵⁷ adicionaron diferentes niveles de una xilanasas (0, 1200, 2400 y 3600 U/Kg) comercial en dietas basadas en maíz-pasta de soya- granos secos de destilería con solubles de maíz (DDGS), en pollos de la estirpe Cobb 500, ellos observaron que con la inclusión de xilanasas aumentó el coeficiente de digestibilidad aparente de la hemicelulosa en un 20% y el coeficiente de digestibilidad ileal de la materia seca, proteína cruda y hemicelulosa. Barekatin *et al.* (2012)⁵⁸ adicionaron xilanasas a dietas basadas en maíz-pasta de soya-DDGS de sorgo para pollos de la estirpe Cobb 500, observaron mejor índice de conversión y una mejora parcial en la digestión de proteína. Odetallah *et al.* (2003)⁵⁹ emplearon una queratinasa con actividad de 300 000 U/g en dietas maíz + pasta de soya en pollos de engorda y observaron una disminución en la viscosidad intestinal de yeyuno, mayor ganancia de peso y menor conversión alimenticia cuando la queratinasa se agregaba desde el día uno de edad. Ghazi *et al.* (2003)⁶⁰ emplearon dos tipos de proteasas, solas o en combinación con una α -galactosidasa y observaron mayores valores de energía metabolizable verdadera, digestión verdadera del nitrógeno, mayor ganancia de peso y menor conversión alimenticia en los pollos cuyas dietas fueron adicionados con enzimas.

El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar dos aditivos comerciales nuevos en México, un probiótico que contiene esporas de tres cepas de *B. subtilis* y un complejo enzimático que contiene xilanasas, amilasas y proteasas, en dietas con sorgo + pasta de soya como ingredientes principales.

1.5 JUSTIFICACIÓN

Existe poca información acerca del efecto de la combinación de probióticos que contienen *Bacillus subtilis* y complejos de enzimas exógenas. Como ya se mencionó, el uso eficaz de ambos aditivos es dependiente del sustrato de la dieta. En México gran parte de la formulación de alimentos balanceados para aves es en base a sorgo + pasta de soya⁶¹, por lo que es necesario generar y analizar datos de respuesta de dichos aditivos en pollos de engorda alimentados con dietas basadas en sorgo + pasta de soya como ingredientes principales.

1.6 OBJETIVO GENERAL

Analizar el efecto de un complejo enzimático que consiste de amilasas, proteasas y xilanasas y un probiótico que consiste en tres cepas de *Bacillus subtilis*, en pollos de engorda alimentados bajo dos dietas con distinta densidad de nutrientes.

1.6.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar los parámetros productivos; consumo de alimento, ganancia de peso, índice de conversión, rendimiento en canal y amarilleamiento en canal fría, en los pollos de engorda alimentados con dos dietas en base a sorgo + soya, un complejo multienzimático y un probiótico.
- Medir la longitud de vellosidades, espesor de lámina propia y profundidad de las criptas de los pollos de engorda con dos dietas en base a sorgo + soya, un complejo multienzimático y un probiótico.
- Cuantificar los títulos de anticuerpos a la enfermedad de Newcastle e IgA secretora intestinal en los pollos de engorda alimentados con dos dietas en base a sorgo + soya, un complejo multienzimático y un probiótico.
- Determinar los cambios ocurridos en la microbiota intestinal de los pollos de engorda con dos dietas en base a sorgo + soya, un complejo multienzimático y un probiótico.

1.7 HIPÓTESIS

- El uso del probiótico y del complejo enzimático en la dieta de los pollos de engorda mejora las variables productivas.
- La altura de la vellosidad, espesor de lámina propia y profundidad de criptas se afectan con la adición del probiótico y el complejo multienzimático a las dietas de los pollos de engorda.
- Los títulos de anticuerpos a la enfermedad de Newcastle e Ig A secretora intestinal son afectados en los pollos de engorda a los cuales se añadió el probiótico y el complejo multienzimático
- Los conteos de coliformes totales disminuyen en los animales suplementados con el probiótico y el complejo multienzimático a las dietas de los pollos de engorda.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

El experimento se realizó en las instalaciones del Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Avícola (CEIEPAv) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), ubicado en la calle Manuel M. López s/n, colonia Zapotitlán, delegación Tláhuac en México, Distrito Federal entre los paralelos 19° 15´ latitud Oeste, a una altura de 2,240 msnm. El clima es templado húmedo, con una temperatura media anual de 16.8° C y una precipitación pluvial anual de 550.1 mm.⁶²

Las pruebas de laboratorio se realizaron en el Departamento de Medicina y Zootecnia de Aves y el análisis histológico en el Departamento de Patología, de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM. Estos se localizan en Av. Universidad 3000 Col. UNAM, CU Delegación Coyoacán 04510, México Distrito Federal.

2.1 Diseño de tratamientos

Los procedimientos de manejo realizados en las aves del presente experimento, fueron aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales Experimentales (CICUAE-FMVZ-UNAM).

Se utilizaron 780 pollitos de la estirpe Ross 308[®] de un día de edad con un peso promedio de 44.5 ± 0.8 g, provenientes de una incubadora comercial, las cuales se distribuyeron en un diseño completamente al azar con un arreglo factorial 2x3. Los factores fueron las dietas (Basal positivo + y Basal negativo -) y los aditivos (Testigo (T), Probiótico (P) y Probiótico+enzimas (P+E)). Se tuvieron 6 tratamientos, con 5 réplicas por tratamiento de 26 animales cada una, los cuales estuvieron conformados de la siguiente forma: 1) Basal positivo (+), 2) como 1 + probiótico, 3) como 2 + enzimas, 4) Basal negativo (-), 5) como 4 + probiótico y 6) como 5 + enzimas. Las aves fueron alojadas en piso, en corrales de 3 m² con cama de viruta de madera de 8 cm de espesor, en casetas de ambiente natural,

por un periodo de 42 días. La densidad fue de 8.6 pollos/m² por corral. Como fuente de calor artificial se utilizaron criadoras convencionales de gas; la temperatura de recepción fue de 30°C y fue disminuida hasta llegar a los 20°C a los 28 días de edad. El alimento y el agua fueron suministrados *ad libitum*. Al día 10 se aplicó la vacunación Newcastle + influenza (Newcastle cepa La Sota[®] y Newcastle Plus emulsionada[®], Laboratorios Avilab) a los pollos de todos los tratamientos.

2.2 Dietas

Se formularon dietas de inicio (1-21 días de edad) y finalización (22-42 días de edad), las cuales fueron calculadas con el paquete computacional NUTRION[®]. Se utilizaron dos dietas basales con sorgo + soya como ingredientes principales, ambas bajas en energía metabolizable. La dieta basal positiva fue una dieta tipo comercial con nutrientes que cubrieron las necesidades de las aves; la dieta basal negativa fue reducida en nutrientes (-85 Kcal EM/ Kg y -1.5% de proteína y aminoácidos esenciales).

Se adicionaron dos productos comerciales a las dietas basales de los tratamientos Probiótico y Probiótico +enzimas, un producto probiótico que contiene tres cepas de *B. subtilis* (Enviva PRO 202 GT[®], Dupont, Animal Nutrition. 1.5×10^5 ufc/g) a razón de 1 Kg de probiótico/ tonelada de alimento. A los tratamientos Probiótico +enzimas, además del probiótico, se les adicionó un complejo enzimático que contiene xilanasas (4000 u/g derivados de *Trichoderma longibrachiatum*), proteasas (8000 u/g derivados de *B. subtilis*) y amilasas (400 u/g derivados de *Bacillus licheniformis*) (Aextra XAP[®], Dupont, Animal Nutrition) a razón de 500g/tonelada de alimento. Se realizó un análisis en los laboratorios DuPont Nutrition & Health (W227 N752 Westmound Dr. #4, Waukesha WI, USA) para determinar el contenido de *B. subtilis* y amilasas en las dietas. En las dietas de inicio, se tuvo un promedio de 5.2×10^5 ufc/g de *B. subtilis* y en las dietas de finalización un promedio de 3.2×10^4 ufc/g de *B. subtilis*. El promedio del contenido de amilasas en las dietas de iniciación fue 215 U/Kg y en las dietas de finalización

de 210 U/Kg. Las dietas empleadas para iniciación, de 1-21 días y finalización, de 22-42 días de edad se muestran en los Cuadros 1 y 2, respectivamente.

Cuadro 1. Composición y análisis calculado de dietas sorgo + soya en iniciación de los pollos adicionados con *Bacillus subtilis* y un complejo enzimático.

Ingredientes	Dieta Basal + (Kg)	Dieta Basal – (Kg)
Sorgo	580.09	608.86
Pasta Soya	302.75	290.46
Granos Secos de Destilería con Solubles de maíz	50.00	50.00
Aceite vegetal	20.91	4.08
Ortofosfato de calcio	18.47	18.46
Carbonato de calcio	15.35	15.39
Sal	4.35	4.35
DL-Metionina 98	2.86	2.89
L-Lisina HCl	2.07	2.36
Premezcla de vitaminas*	1.00	1.00
Cloruro de colina, 60%	1.00	1.00
Premezcla de minerales **	0.5	0.5
Nicarbazina	0.5	0.5
Antioxidante†	0.15	0.15
Total	1000	1000.0
Análisis Calculado		
Energía metabolizable, Kcal/Kg	2950	2860
Proteína cruda, %	21.00	20.68
Lisina, %	1.20	1.19
Met+Cist, %	0.93	0.92
Calcio Total, %	1.00	1.00
Fósforo disponible, %	0.50	0.50
Sodio, %	0.18	0.18

* Núcleo comercial que aporta: Vit. A 12,000,000 UI, Vit. D3 2,500,000 UIP, Vit. E 15,000 UI, Vit K3 2,000 mg/Kg, Vit. B₁ 2,250 mg/Kg, Vit. B₂ 7,500 mg/Kg, Vit. B₃ 45,000 mg/Kg, Vit B₅ 12,500mg/Kg, Vit. B₆ 3,500, Vit. B₁₂ 20mg/Kg, Ácido fólico 1,500 mg/kg, Biotina 125 mg/kg

** Núcleo comercial que aporta: Yodo 300 mg/Kg, Hierro 50,000 mg/Kg, Manganeso 110,000 mg/Kg, Cobalto 200 mg/Kg, Cobre 12,000 mg/Kg, Selenio 200 mg/Kg, Zinc 50,000 mg/Kg

† BHT y BHQ

Cuadro 2. Composición y análisis calculado de dietas sorgo + soya en finalización de los pollos adicionados con *Bacillus subtilis* y un complejo enzimático.

Ingredientes	Dieta Basal + (Kg)	Dieta Basal – (Kg)
Sorgo	609.25	638.11
Pasta Soya	254.38	242.12
Granos Secos de Destilería con Solubles de maíz	50.00	50.00
Aceite vegetal	40.30	23.43
Ortofosfato de calcio	16.35	16.34
Carbonato de calcio	13.92	13.96
Cloruro de colina 60%	0.80	5.33
Sal	3.85	3.85
DL-Metionina 98	2.31	2.33
L-Lisina HCl	1.22	1.51
Premezcla de vitaminas*	1.00	1.00
Premezcla de minerales **	0.50	0.80
Pigmento amarillo [†]	5.33	0.50
Salinomicina	0.50	0.50
Antioxidante [‡]	0.10	0.10
L-Treonina	0.19	0.12
Total	1000	1000
Análisis Calculado		
Energía metabolizable, Kcal/Kg	3100	3015
Proteína cruda, %	19.00	18.68
Lisina, %	1.00	0.99
Met+Cist, %	0.82	0.81
Calcio Total, %	0.90	0.90
Fósforo disponible,%	0.45	0.45
Sodio,%	0.16	0.16

* Núcleo comercial que aporta: Vit. A 12,000,000 UI, Vit. D3 2,500,000 UIP, Vit. E 15,000 UI, Vit K3 2,000 mg/Kg, Vit. B₁ 2,250 mg/Kg, Vit. B₂ 7,500 mg/Kg, Vit. B₃ 45,000 mg/Kg, Vit B₅ 12,500mg/Kg, Vit. B₆ 3,500, Vit. B₁₂ 20mg/Kg, Ácido fólico 1,500 mg/Kg, Biotina 125 mg/Kg

** Núcleo comercial que aporta: Yodo 300 mg/Kg, Hierro 50,000 mg/Kg, Manganeso 110,000 mg/Kg, Cobalto 200 mg/Kg, Cobre 12,000 mg/Kg, Selenio 200 mg/Kg, Zinc 50,000 mg/Kg

†Xantófilas amarillas de *Tagetes erecta*, 14g/Kg

‡ BHT y BHQ

2.3 Parámetros productivos

Se midió el peso corporal, ganancia de peso, consumo de alimento y conversión alimenticia de los días 1-21, 22-42 y 1-42, así como el amarilleamiento en canal fría.⁶³ Al día 42 se sacrificaron 72 pollos, 12 pollos por tratamiento, y se midió el rendimiento en canal tipo supermercado o mercado público eviscerado.⁶⁴

2.4 Análisis histológicos

Al día 21 y al término del experimento, de cada tratamiento se sacrificó un animal por réplica (5 pollos en total) y se retiró el tracto digestivo desde el final del ventrículo hasta el íleon. Se obtuvieron muestras de aproximadamente 2 cm. de largo del asa descendente del duodeno, un segundo segmento de la misma longitud en yeyuno, de 1cm posterior al remanente de Meckel y en íleon un tercer segmento de la misma longitud, de 1 cm anterior al inicio de los ciegos. Las muestras se fijaron en formalina amortiguada al 10% por un periodo mínimo de 24 horas; posteriormente se procesaron mediante técnicas histológicas de rutina, inclusión en parafina, cortes de 4 µm y tinción con hematoxilina – eosina.⁶⁵

Se obtuvo el promedio 5 vellosidades por corte; se midió el largo de vellosidades, espesor de lámina propia, espesor de mucosa y tamaño de criptas, las cuales se seleccionaron de manera aleatoria. El largo de la vellosidad (LV) se midió de la punta de la vellosidad hasta la base de la misma, el espesor de lámina propia (ELP) se midió de la base de la vellosidad hasta la parte superior de la capa muscular de la mucosa.⁶⁶ Las mediciones se realizaron con un microscopio óptico (Carl Zeiss® Stándar 25), con los objetivos de 2.5 X y 10 X, auxiliados con un software computacional (Axiovisio versión 4.8®).

Las mediciones fueron realizadas en vellosidades íntegras tal como se muestra en la Figura 1. Las flechas muestran vellosidades íntegras, con una orientación correcta para realizar las mediciones.

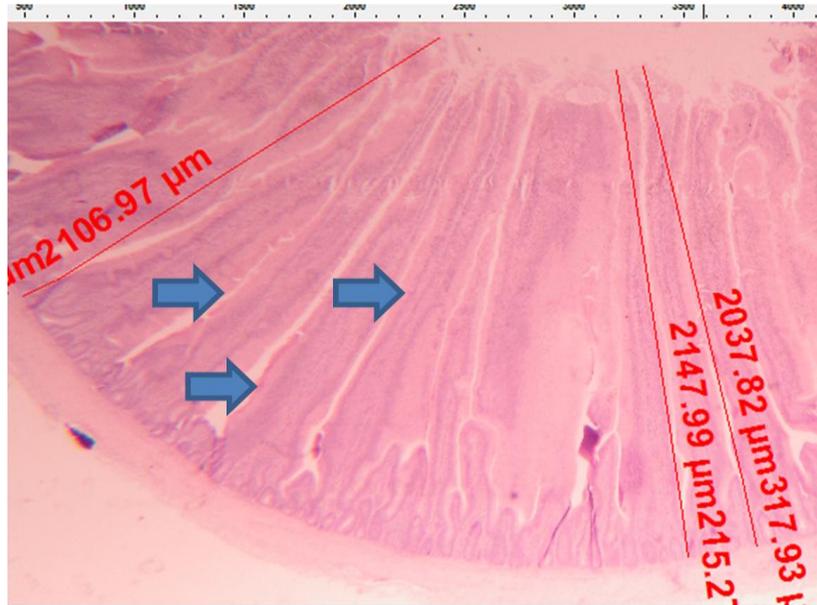


Figura 1. Vellosidades intestinales aptas para realizar las mediciones.

Las vellosidades que presentaron ruptura, doblamiento o que no presentaban una delimitación clara fueron descartadas, tal como se muestra en la Figura 2.

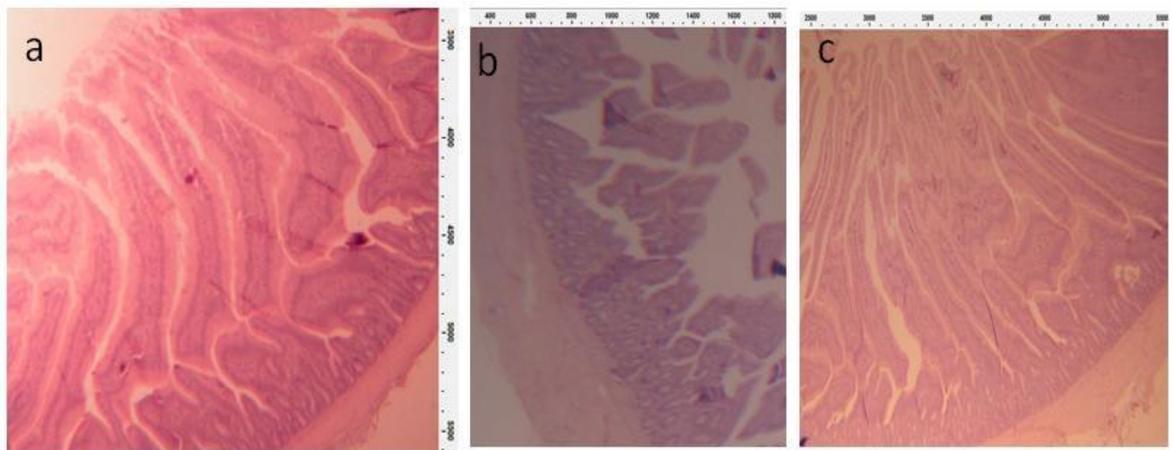


Figura 2. Vellosidades intestinales no aptas para mediciones. a) Vellosidades dobladas. b) vellosidades rotas. c) vellosidades sin un límite definido.

2.5 Inmunidad humoral

Determinación de título de anticuerpos a la enfermedad de Newcastle. A los 10 días de edad, los pollos fueron inmunizados contra la enfermedad de Newcastle. A los días 21 y 42 de edad se tomaron muestras sanguíneas de 5 aves por tratamiento y se obtuvo el suero para posteriormente determinar el título de anticuerpos séricos a la enfermedad de Newcastle mediante la prueba de inhibición de la hemoaglutinación.⁶⁷

Determinación de IgA secretora. Para evaluar la respuesta de anticuerpos en intestino, de cada tratamiento se seleccionó un pollo por réplica (en total 5 pollos por tratamiento) y se sacrificaron. Se tomaron 10 cm de duodeno para posteriormente realizar lavados con 10 mL de PBS frío y estéril, pasando tres veces el PBS a través del lumen intestinal, la solución se recolectó y se congeló a -20 °C, hasta su posterior evaluación con la prueba de ELISA. Para realizar la técnica de ELISA se siguió el procedimiento descrito previamente por Gómez *et al.* (2009)⁴. La técnica de ELISA se muestra en el Anexo 1.

2.6 Conteos de coliformes totales

Para realizar el conteo de coliformes totales, en el muestreo realizado al día 42 se colectaron muestras de contenido de íleon de un pollo por cada repetición (en total 5 pollos por tratamiento) y se colocó un gramo del contenido en 9 mL de PBS estéril, se homogeneizaron en un vórtex y se procedió a hacer diluciones decuples seriadas hasta la dilución -6. Una vez realizadas las diluciones se colocó un mililitro de cada dilución en cajas de petri estériles y se vertieron 20 mL de agar de bilis y rojo violeta (Agar de bilis y rojo violeta, Dibico[®] Lote 9665121) en cada caja de petri, las cuales fueron incubadas a 36°C por 48 horas para posteriormente llevar a cabo el conteo de colonias.⁶⁸

2.7 Análisis estadístico

Previo al análisis estadístico, se realizaron las pruebas de Shapiro-Wilk para verificar normalidad y de Levene para verificar homocedasticidad en las variables evaluadas. Los resultados de las variables productivas, morfometría intestinal, conteos de coliformes y anticuerpos se analizaron mediante un diseño completamente al azar, con arreglo factorial 2x3, conforme al siguiente modelo:⁶⁹

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \epsilon_{ijk}$$

i= 1,2
j= 1,2,3
k=1, 2, 3, 4 y 5

En donde:

Y_{ij} = Variables de respuesta (variables productivas, morfometría intestinal, conteos de coliformes y anticuerpos).

μ = Media general.

α_i = Efecto del i-ésimo tratamiento (dietas basales positiva y negativa).

β_j = Efecto del j-ésimo tratamiento (Testigo, Probióticos y Probióticos+enzimas).

$(\alpha\beta)_{ij}$ = Interacción entre el i-ésimo tratamiento y el j-ésimo tratamiento.

ϵ_{ijk} = Error experimental.

Cuando hubo interacción entre factores, se realizaron comparaciones múltiples entre tratamientos mediante la prueba de Tukey. Los resultados de las variables evaluadas se analizaron con ayuda del software computacional SPSS[®], versión 17.0 (23 Agosto 2008; SPSS Inc., 2008). Las variables título de anticuerpos a la enfermedad de Newcastle y coliformes totales en intestino fueron transformadas a logaritmo base 2 y base 10 respectivamente, previo al análisis realizado. Se fijó una significancia de $P < 0.05$.⁶⁹

3. RESULTADOS

En el Anexo 2 se pueden observar los resultados de las pruebas de Shapiro-wilk y Levene que se realizaron a las variables analizadas.

3.1 Parámetros productivos

1-21 días de edad

En el factor aditivos, no se encontró diferencia estadística ($p>0.05$) en la ganancia de peso, peso corporal, consumo de alimento y conversión alimenticia. En el factor dietas, se observó que los pollos que consumieron la dieta Basal positiva (+) tuvieron 7.5% más de peso corporal, 8% más de ganancia de peso y 1.3 puntos menos de conversión alimenticia ($p<0.05$), respecto a los pollos alimentados con la dieta Basal negativa (-). No se observó interacción Dieta x Aditivos ($p>0.05$), como se aprecia en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Variables productivas de los pollos de engorda alimentados con dietas sorgo + soya y adicionados con *B. subtilis* y un complejo enzimático, de 1- 21 días de edad.

	Ganancia de peso, g	Peso corporal, g	Consumo de alimento, g	Índice de conversión, Kg:Kg
Aditivos				
Testigo	708 ±28 ^a	753 ±28 ^a	1108 ±26 ^a	1.566 ±0.065 ^a
Probiótico	712 ±40 ^a	756 ±40 ^a	1126 ±31 ^a	1.585 ±0.087 ^a
Prob.+ enzimas	713 ±39 ^a	757 ±40 ^a	1123 ±33 ^a	1.580 ±0.114 ^a
Dieta				
Basal positiva (+)	740 ±14 ^b	785 ±14 ^b	1119±30 ^a	1.512 ±0.047 ^a
Basal negativa (-)	681 ±20 ^a	726 ±20 ^a	1119±29 ^a	1.643 ±0.067 ^b
Probabilidad				
Aditivos	0.87	0.87	0.42	0.78
Dieta	0.00	0.00	0.94	0.00
Aditivos X Dieta	0.24	0.21	0.17	0.09

Valores± desviación estándar. Distintas literales en cada columna indican diferencia estadística.

22-42 días de edad

En el factor aditivos se observó que los pollos que fueron adicionados con Probióticos y Probióticos + enzimas en la dieta tuvieron 2.3% más ($p < 0.05$) peso corporal. En el factor dietas se observó que los pollos que consumieron la dieta Basal positiva (+) tuvieron 3.4% más ($p < 0.05$) ganancia de peso, 4.7% más peso corporal y medio punto menos de índice de conversión. No se observó interacción Dieta x Aditivos ($p > 0.05$). Los resultados se muestran en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Comportamiento productivo de pollos alimentados con dietas sorgo + soya, adicionados con *B. subtilis* y un complejo enzimático, de 22- 42 días de edad.

	Ganancia de peso, g	Peso corporal, g	Consumo de alimento, g	Índice de conversión, Kg:Kg
		Aditivos		
Testigo	1755 ±49 ^a	2508 ±58 ^a	3501 ±73 ^a	1.995 ±0.045 ^a
Probiótico	1792 ±57 ^a	2549 ±87 ^b	3532 ±69 ^a	1.971 ±0.037 ^a
Prob.+ enzimas	1810 ±55 ^a	2568 ±86 ^b	3543 ±92 ^a	1.957 ±0.051 ^a
		Dieta		
Basal positiva(+)	1817 ±48 ^b	2603 ±56 ^b	3539 ±77 ^a	1.947 ±0.038 ^a
Basal negativa(-)	1754 ±47 ^a	2480 ±41 ^a	3513 ±79 ^a	2.002 ±0.036 ^b
		Probabilidad		
Aditivos	0.06	0.04	0.58	0.14
Dieta	0.00	0.00	0.45	0.00
Aditivos X Dieta	0.86	0.49	0.59	0.71

Valores ± desviación estándar. Distintas literales en cada columna indican diferencia estadística ($p < 0.05$).

1-42 días de edad

Los datos acumulados de todo el ciclo productivo se muestran en el Cuadro 5. En el factor aditivos se observó en promedio 1.6% más ($p < 0.05$) ganancia de peso en los tratamientos que fueron adicionados con Probióticos y Probióticos + enzimas en la dieta. En el factor dietas se observó 4.7% más ($p < 0.05$) ganancia de peso, 2% más de rendimiento en canal y 0.8 puntos menos de índice de conversión en los pollos que consumieron la dieta Basal positiva (+). No se observó interacción Dieta x Aditivos ($p > 0.05$).

Cuadro 5. Resultados globales de los pollos alimentados con dietas sorgo + soya, adicionados con *B. subtilis* y un complejo enzimático, de 1- 42 días de edad.

	Ganancia de peso (g)	Consumo de alimento (g)	Conversión alimenticia (Kg:Kg)	Rendimiento en canal (%)	Amarilleamiento en piel (b*)
Aditivos					
Testigo	2463 ±57 ^a	4610 ±76 ^a	1.871 ±0.041 ^a	80 ±5 ^a	34 ±6 ^a
Probiótico	2505 ±86 ^b	4659 ±77 ^a	1.861 ±0.049 ^a	80 ±3 ^a	35 ±5 ^a
Prob.+ enzimas	2523 ±86 ^b	4666 ±106 ^a	1.850 ±0.058 ^a	80 ±3 ^a	34 ±10 ^a
Dieta					
Basal positiva (+)	2558 ±56 ^b	4658 ±86 ^a	1.821 ±0.031 ^a	81 ±3 ^b	33 ±6 ^a
Basal negativa(-)	2436 ±41 ^a	4632 ±90 ^a	1.901 ±0.021 ^b	79 ±3 ^a	34 ±9 ^a
Probabilidad					
Aditivos	0.04	0.42	0.33	0.88	0.25
Dieta	0.00	0.48	0.00	0.04	0.71
Aditivos X Dieta	0.47	0.68	0.56	0.17	0.39

Valores± desviación estándar. Distintas literales en cada columna indican diferencia estadística ($p < 0.05$).

3.2 Análisis histológicos

Duodeno

Los resultados del análisis histológico en duodeno se muestran en el Cuadro 6. En el factor aditivos, al día 21 se observó diferencia estadística ($p < 0.05$) en el ELP, siendo los tratamientos Probiótico y Probiótico + enzimas quienes presentaron un promedio de 28% menos espesor de lámina propia. Al día 42 el tratamiento Probiótico presentó en promedio criptas 15% más profundas ($p < 0.05$) respecto a los tratamientos Testigo y Probiótico + enzimas. En el factor dietas, al día 21 se observó que los pollos alimentados con la dieta Basal positiva (+) presentaron vellosidades 6.5% más largas ($p < 0.05$) y criptas 9% más profundas ($p < 0.05$) respecto a la dieta Basal negativa (-). Al día 42, los pollos alimentados con la Basal negativa (-) presentaron un ELP 10 % más grueso y criptas 18% menos profundas respecto a los alimentados con la dieta Basal positiva (+). No se observó interacción Dieta x Aditivos ($p > 0.05$).

Cuadro 6. Cambios histológicos en duodeno de pollos alimentados con dietas sorgo+soya, *B. subtilis* y un complejo enzimático, a los 21 y 42 días de edad.

	Duodeno 21 días			Duodeno 42 días		
	LV	ELP	C	LV	ELP	C
	Aditivos (μm)					
Testigo	2076 \pm 147 ^a	300 \pm 44 ^b	133 \pm 11 ^a	2058 \pm 101 ^a	307 \pm 42 ^a	126 \pm 9 ^a
Probiótico	2061 \pm 125 ^a	228 \pm 16 ^a	135 \pm 19 ^a	2017 \pm 231 ^a	320 \pm 44 ^a	143 \pm 28 ^b
Prob.+ Enzimas	2066 \pm 96 ^a	235 \pm 15 ^a	145 \pm 15 ^a	2031 \pm 209 ^a	317 \pm 43 ^a	122 \pm 12 ^a
	Dietas (μm)					
Basal positiva(+)	2137 \pm 119 ^b	245 \pm 32 ^a	144 \pm 20 ^b	2097 \pm 168 ^a	298 \pm 32 ^a	144 \pm 20 ^b
Basal negativa(-)	1998 \pm 75 ^a	263 \pm 51 ^a	131 \pm 6 ^a	1973 \pm 181 ^a	331 \pm 46 ^b	117 \pm 6 ^a
	Probabilidad					
Aditivos	0.94	0.00	0.19	0.88	0.75	0.00
Dieta	0.00	0.07	0.02	0.08	0.04	0.00
AditivosxDieta	0.41	0.09	0.69	0.75	0.78	0.09

Valores \pm desviación estándar. Distintas literales en cada columna indican diferencia estadística ($p < 0.05$). **LV**: longitud de vellosidad, **ELP**: espesor de lámina propia, **C**: profundidad de criptas.

En las Figuras 3 y 4 se pueden observar las vellosidades al día 21 y 42 de edad, por los factores dietas y aditivos.

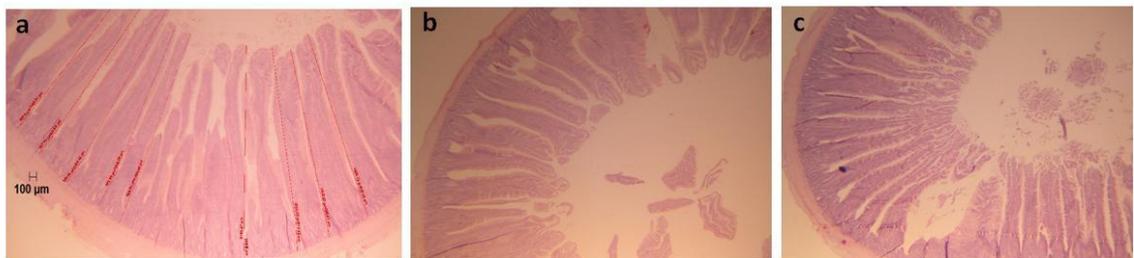


Dieta Basal positiva (+). a) Testigo, b) Probiótico, c) Probiótico + enzimas

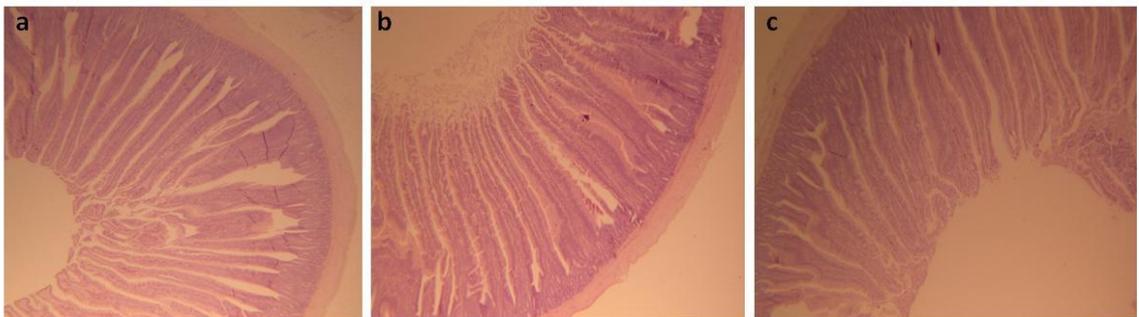


Dieta Basal negativa (-). a) Testigo, b) Probiótico, c) Probiótico + enzimas

Figura 3. Ilustración de las vellosidades duodenales al día 21 de edad.



Dieta Basal positiva (+). a) Testigo, b) Probiótico, c) Probiótico + enzimas



Dieta Basal negativa (-). a) Testigo, b) Probiótico, c) Probiótico + enzimas

Figura 4. Cortes histológicos de las vellosidades duodenales al día 42 de edad.

Yeyuno

En el factor aditivos, a los 21 días se observó que los pollos de los tratamientos Probiótico y Probiótico + enzimas presentaron vellosidades 16% más largas ($p < 0.05$) y criptas 11% más profundas respecto al tratamiento Testigo. Al día 42, se observó que el tratamiento Testigo presentó criptas 10 % más profundas respecto a los tratamientos Probiótico y Probiótico + enzimas. En el factor dietas, al día 21 y 42 se observó que los pollos que consumieron la dieta Basal positiva (+) tuvieron criptas 11% más profundas respecto a los pollos que consumieron la dieta Basal negativa (-).

Se observó interacción Dietas x Aditivos en LV, ELP y C al día 21 y en C al día 42 (Cuadro 7).

Cuadro 7. Análisis histológicos en yeyuno de pollos alimentados con dietas sorgo+soya, *B. subtilis* y un complejo enzimático, a los 21 y 42 días de edad.

	Yeyuno 21 días			Yeyuno 42 días		
	LV	ELP	C	LV	ELP	C
	Aditivos (μm)					
Testigo	1011 \pm 115 ^a	221 \pm 30 ^a	119 \pm 4 ^a	1360 \pm 266 ^a	205 \pm 28 ^a	124 \pm 12 ^b
Probiótico	1196 \pm 154 ^b	193 \pm 33 ^a	139 \pm 22 ^b	1436 \pm 218 ^a	226 \pm 17 ^a	114 \pm 14 ^a
Prob.+ Enzimas	1211 \pm 104 ^b	202 \pm 27 ^a	128 \pm 10 ^{ab}	1435 \pm 162 ^a	222 \pm 28 ^a	111 \pm 9 ^a
	Dietas (μm)					
Basal positiva(+)	1170 \pm 183 ^a	212 \pm 25 ^a	137 \pm 19 ^b	1430 \pm 204 ^a	220 \pm 30 ^a	124 \pm 11 ^b
Basal negativa (-)	1109 \pm 113 ^a	199 \pm 37 ^a	121 \pm 6 ^a	1390 \pm 110 ^a	216 \pm 22 ^a	109 \pm 8 ^a
	Probabilidad					
Aditivos	0.00	0.19	0.00	0.53	0.19	0.00
Dieta	0.12	0.06	0.00	0.53	0.68	0.00
AditivosxDieta	0.00	0.00	0.02	0.64	0.54	0.02

Valores \pm desviación estándar. Distintas literales en cada columna indican diferencia estadística ($p < 0.05$). **LV**: longitud de vellosidad, **ELP**: espesor de lámina propia, **C**: profundidad de criptas.

La interacción Dieta x Aditivos se aprecia en la Figura 5. En la longitud de vellosidades, al día 21 de edad se observa que las vellosidades del tratamiento Testigo en la dieta basal positiva (+) incrementan ($p < 0.05$) con la adición del

probiótico y la combinación del probiótico más las enzimas. No se observa diferencia entre los demás niveles de los factores ($p>0.05$). Si bien numéricamente se observa que las vellosidades son más cortas en la dieta Basal positiva (+), no se encontró diferencia estadística respecto a la dieta Basal negativa (-) ($p>0.05$).

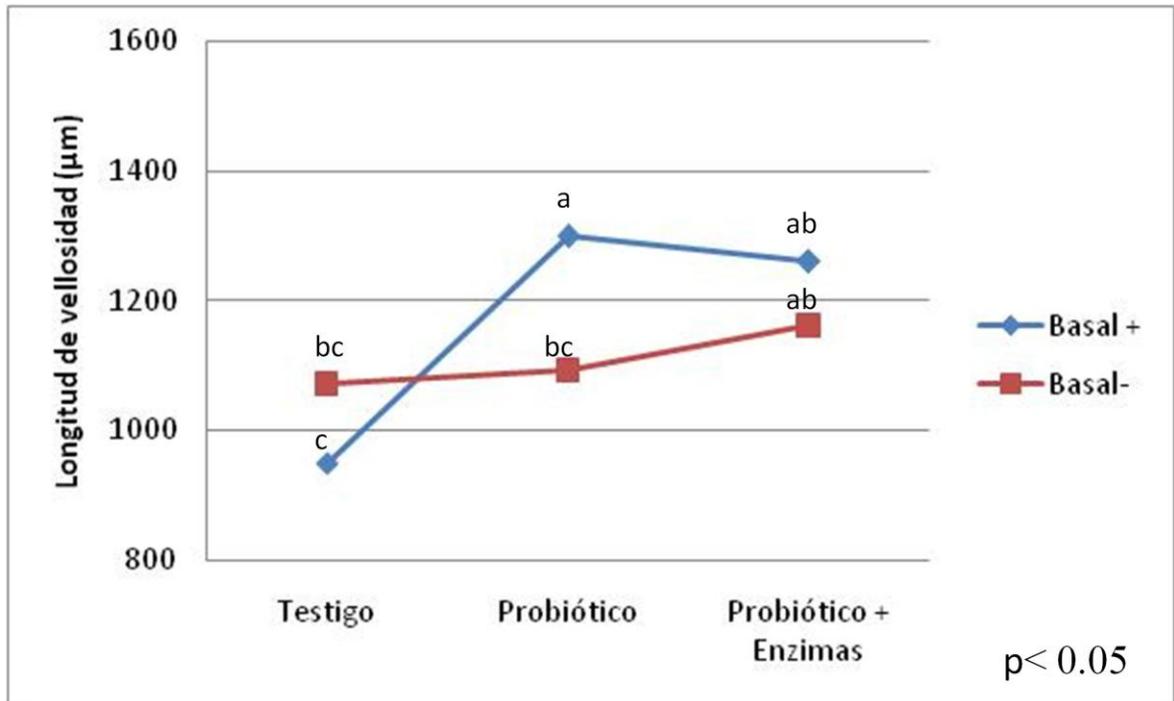


Figura 5. Interacción Dieta x Aditivos en la longitud de vellosidades, en yeyuno al día 21 de edad. Distintas literales indican diferencia estadística significativa ($p<0.05$).

En la Figura 6 se observa la interacción Dieta x Aditivos, en el espesor de lámina propia, al día 21 de edad. En la dieta Basal negativa (-) disminuye el espesor de la lámina propia con la adición del Probiótico ($p<0.05$) respecto al tratamiento Testigo. No se observa diferencia entre los demás niveles de los factores ($p>0.05$).

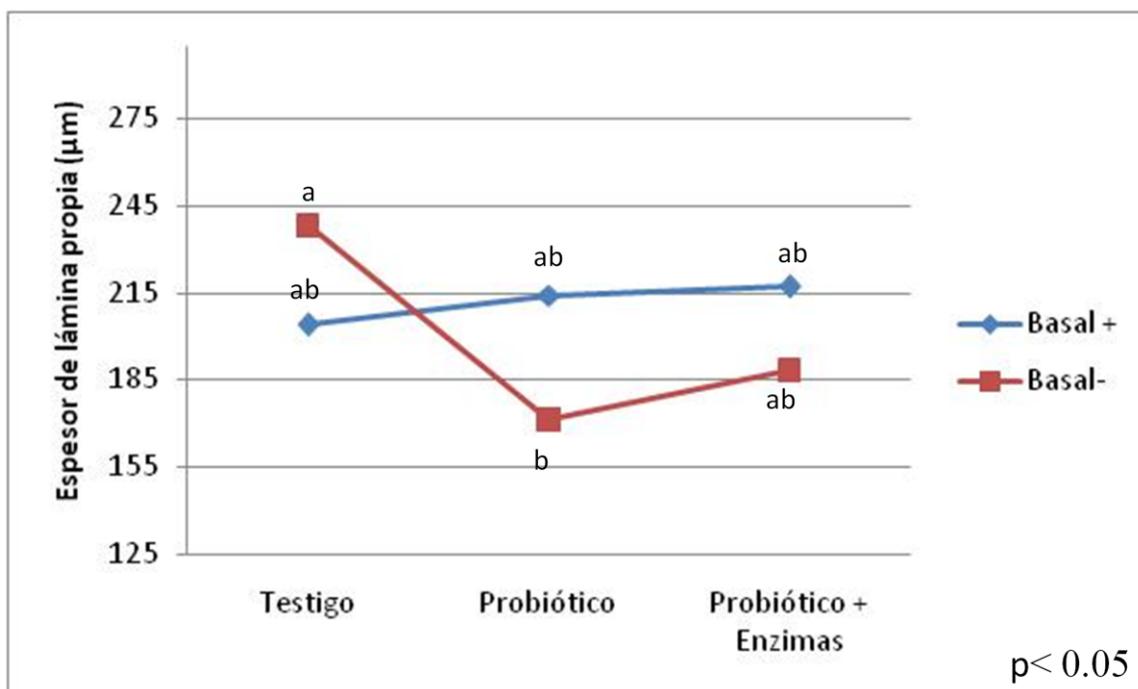


Figura 6. Efecto gráfico de interacción Dieta x Aditivos en el espesor de lámina propia, en yeyuno al día 21 de edad. Distintas literales indican diferencia estadística significativa ($p < 0.05$).

En la interacción Dieta x Aditivos (Figura 7), en profundidad de criptas, al día 21 de edad se observa que la profundidad de criptas aumenta con la adición del probiótico en la dieta basal positiva (+) ($p < 0.05$) respecto a todos los niveles de los demás factores. Con la combinación del probiótico + enzimas, en la dieta Basal positiva (+) también se nota un incremento en la profundidad de las criptas, sin embargo, no se observa diferencia entre los demás niveles de los factores ($p > 0.05$).

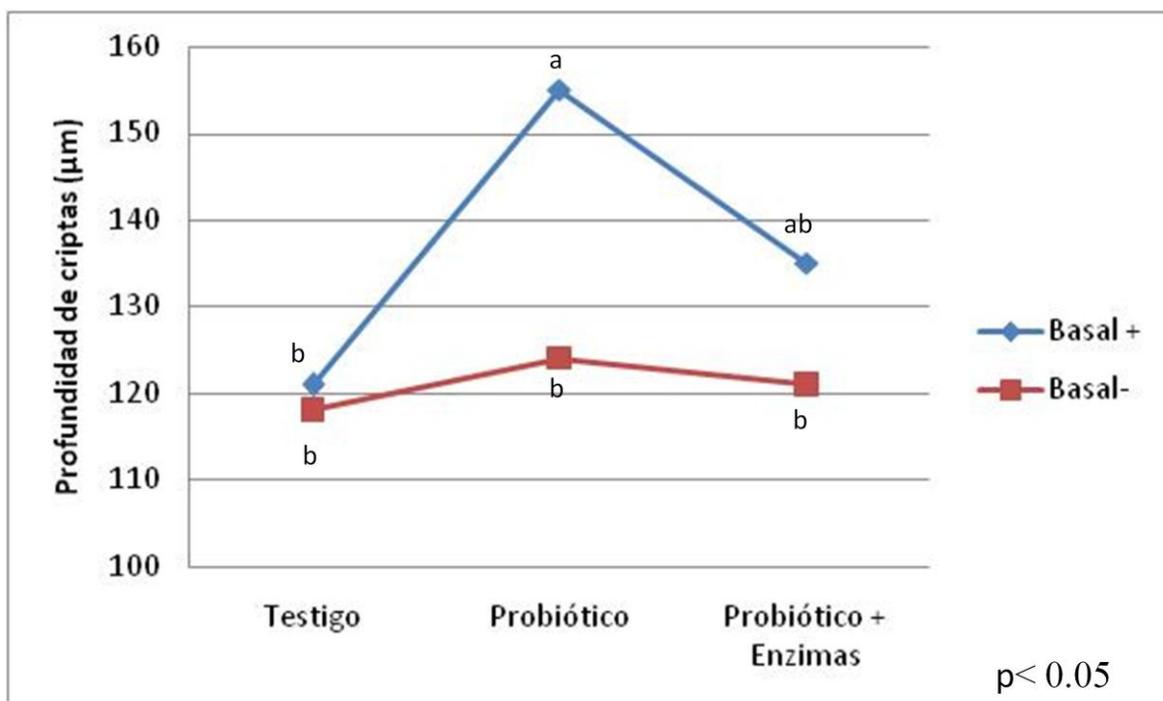


Figura 7. Interacción en la profundidad de criptas, en yeyuno al día 21 de edad. Distintas literales indican diferencia estadística significativa ($p < 0.05$).

En la profundidad de criptas al día 42, como se aprecia en la Figura 8, los tratamientos Testigo con la dieta Basal positiva (+) no presentó diferencia en tamaño respecto al tratamiento Probiótico con la misma dieta ($p > 0.05$), sin embargo, presentó criptas más grandes respecto a los demás niveles de tratamientos ($p < 0.05$). El tratamiento Probióticos no mostró diferencias ($p > 0.05$) con el tratamiento Probióticos + enzimas en la misma dieta y respecto al tratamiento Testigo con la dieta Basal negativa (-); sin embargo, presentó diferencias ($p < 0.05$) con los demás niveles del factor aditivos en la dieta Basal negativa (-).

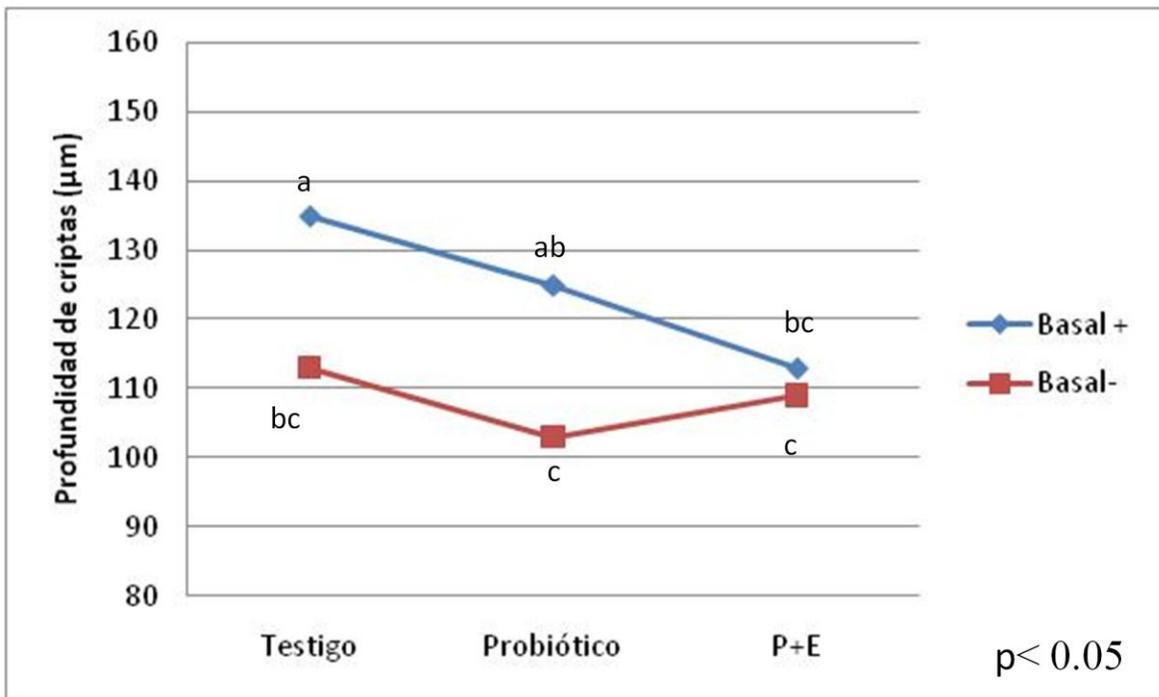
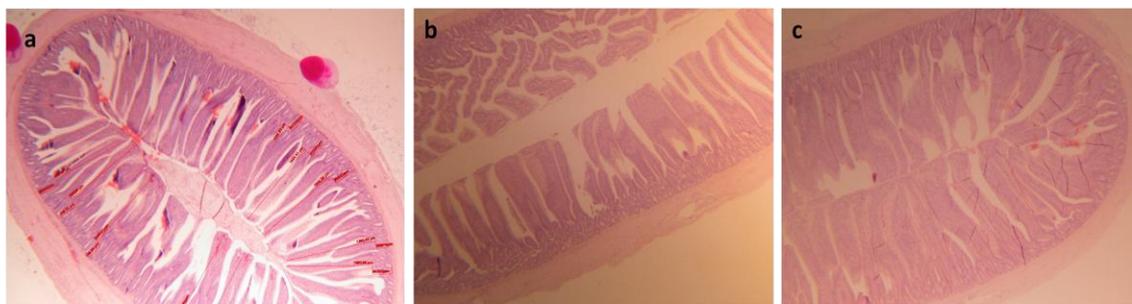


Figura 8 Efectos de interacción Dieta x Aditivos en la profundidad de criptas, en yeyuno al día 21 de edad. Distintas literales indican diferencia estadística significativa ($p < 0.05$).

En las Figuras 9 y 10 se pueden observar las vellosidades del yeyuno a los días 21 y 42 de edad de los pollos, por los factores dietas y aditivos.

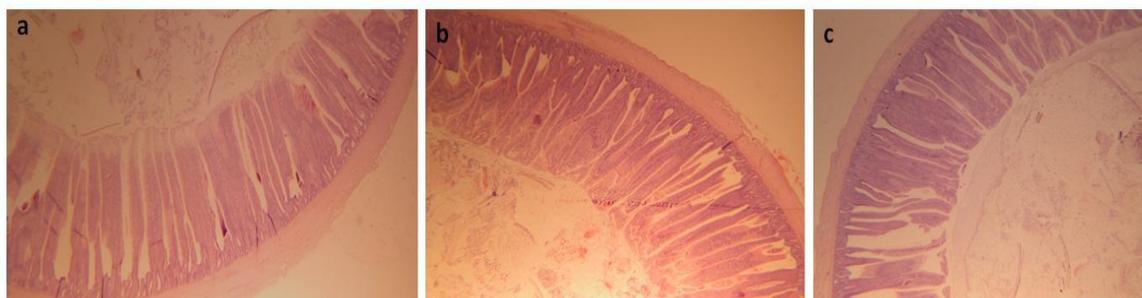


Dieta Basal positiva (+).: a) Testigo, b) Probiótico, c) Probiótico + enzimas

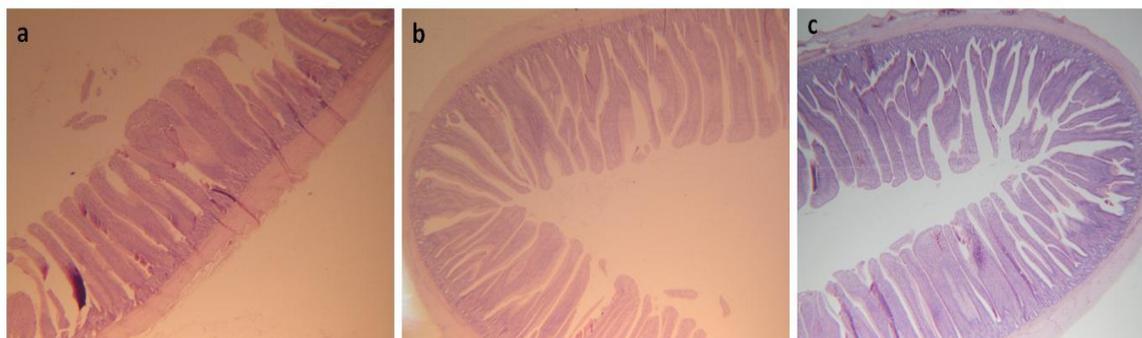


Dieta Basal negativa (-). a) Testigo, b) Probiótico, c) Probiótico + enzimas

Figura 9. Cortes histológicos de las vellosidades de yeyuno al día 21 de edad



Dieta Basal positiva (+).: a) Testigo, b) Probiótico, c) Probiótico + enzimas



Dieta Basal negativa (-). a) Testigo, b) Probiótico, c) Probiótico + enzimas

Figura 10. Ilustración de las vellosidades de yeyuno al día 42 de edad.

Íleon

En el cuadro 8 se muestran los resultados promedio en íleon. En el factor aditivos, al día 21 se observó que en el tratamiento Testigo las vellosidades fueron 20 % más largas y el espesor de lámina propia 19 % más grueso ($p < 0.05$) respecto a los tratamientos Probiótico y Probiótico + enzimas; las criptas fueron 11 % más profundas ($p < 0.05$) en el tratamiento Probiótico + enzimas. Al día 42, el espesor de lámina propia fue 16% mayor ($p < 0.05$) en los tratamientos Probiótico y Probiótico +enzimas y las criptas fueron 16% más profundas en el tratamiento Testigo ($p < 0.05$). En el factor dietas, al día 21 se observó que los pollos que consumieron la dieta Basal positiva (+) tuvieron vellosidades 15% más largas. Al día 42, se observó que los pollos que consumieron la dieta Basal negativa (-) presentaron vellosidades 7% más largas y los que consumieron la dieta Basal positiva (+) tuvieron criptas 12% más profundas ($p < 0.05$). Se encontró interacción Dietas x Aditivos en LV, ELP y C al día 21, así como en LV y C al día 42.

Cuadro 8. Cambios histológicos en íleon de pollos alimentados con dietas sorgo+soya, *B. subtilis* y un complejo enzimático, a los 21 y 42 días de edad.

	Íleon 21 días de edad			Íleon 42 días de edad		
	LV	ELP	C	LV	ELP	C
	Aditivos (μm)					
Testigo	947 \pm 162 ^b	214 \pm 56 ^b	114 \pm 16 ^a	833 \pm 62 ^a	182 \pm 14 ^a	121 \pm 6 ^b
Probiótico	798 \pm 110 ^a	173 \pm 25 ^a	126 \pm 8 ^{ab}	843 \pm 136 ^a	208 \pm 25 ^b	113 \pm 10 ^{ab}
Prob.+ Enzimas	739 \pm 46 ^a	177 \pm 31 ^{ab}	127 \pm 10 ^b	894 \pm 86 ^a	216 \pm 19 ^b	106 \pm 17 ^a
	Dietas (μm)					
Basal +	896 \pm 172 ^b	200 \pm 54 ^a	121 \pm 17 ^a	824 \pm 108 ^a	206 \pm 22 ^a	120 \pm 6 ^b
Basal -	760 \pm 55 ^a	176 \pm 25 ^a	124 \pm 7 ^a	890 \pm 81 ^b	197 \pm 26 ^a	106 \pm 15 ^a
	Probabilidad					
Aditivos	0.00	0.02	0.02	0.14	0.00	0.00
Dieta	0.00	0.07	0.42	0.01	0.19	0.00
AditivosxDieta	0.00	0.02	0.00	0.00	0.30	0.00

Distintas literales en cada columna indican diferencia estadística ($p < 0.05$). **LV**: longitud de vellosidad, **ELP**: espesor de lámina propia, **C**: profundidad de criptas.

En la Figura 11 se aprecia la interacción Dieta x Aditivos, al día 21. En la longitud de vellosidades se observó que el tratamiento Testigo con la dieta Basal positiva (+) presentó mayor longitud de vellosidades ($p < 0.05$) respecto a los demás niveles de los factores evaluados. En el tratamiento Probiótico con la dieta Basal positiva (+), las vellosidades fueron más largas ($p < 0.05$) respecto al tratamiento Probiótico+ enzimas con la misma dieta y Probiótico con la dieta Basal negativa (-). No se observó diferencia ($p > 0.05$) entre el tratamiento Probiótico+ enzimas con la dieta Basal positiva (+) y los distintos niveles del factor aditivos con la dieta Basal negativa (-).

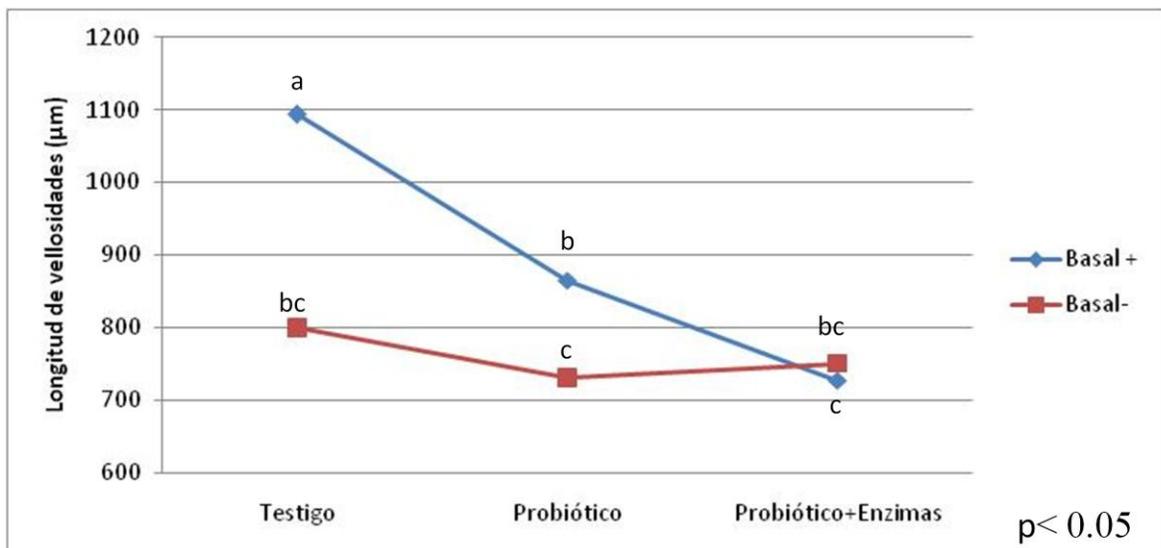


Figura 11. Interacción Dieta x Aditivos en la longitud de vellosidades, en íleon al día 21 de edad. Distintas literales indican diferencia estadística significativa ($p < 0.05$).

En la variable ELP en íleon, la Figura 12 muestra como al día 21, el tratamiento Testigo con la dieta Basal positiva (+) presentó mayor ($p < 0.05$) espesor de lámina propia respecto a los tratamientos Probiótico +enzimas con la dieta Basal positiva (+), así como Testigo y Probiótico + enzimas con la dieta Basal negativa (-). No se observó diferencia en el resto de los niveles de los factores evaluados. ($p > 0.05$).

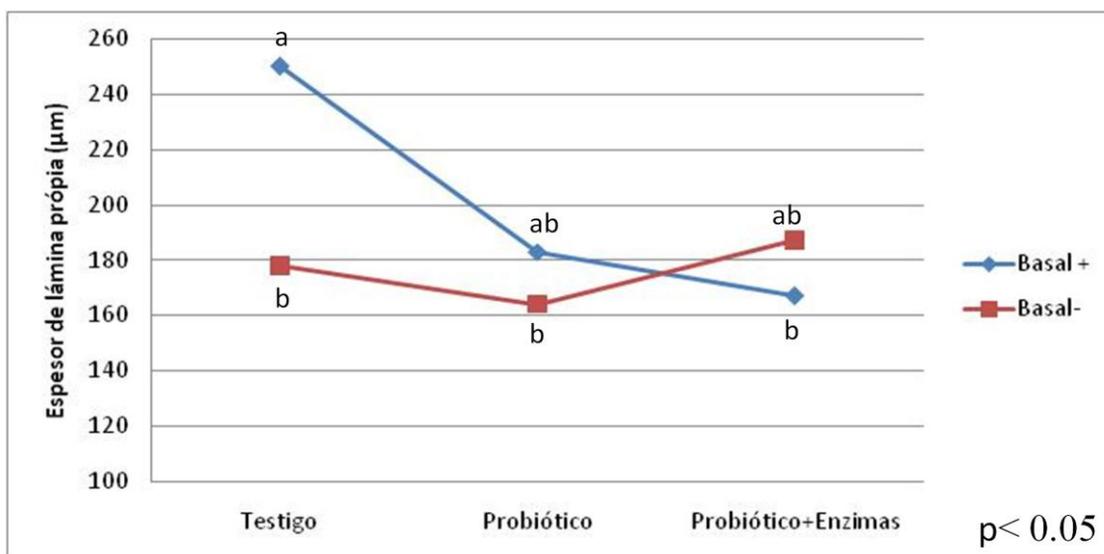


Figura 12. Efecto de interacción Dieta x Aditivos en el espesor de lámina propia en íleon al día 21 de edad. Distintas literales indican diferencia estadística significativa ($p < 0.05$).

La interacción en profundidad de criptas se muestra gráficamente en la Figura 13. El tratamiento Testigo con la dieta Basal positiva (+) presentó la menor ($p < 0.05$) profundidad de criptas respecto a los tratamientos Probiótico y Probiótico +enzimas con la misma dieta y los tratamientos Testigo y Probiótico +enzimas con la dieta Basal negativa (-).

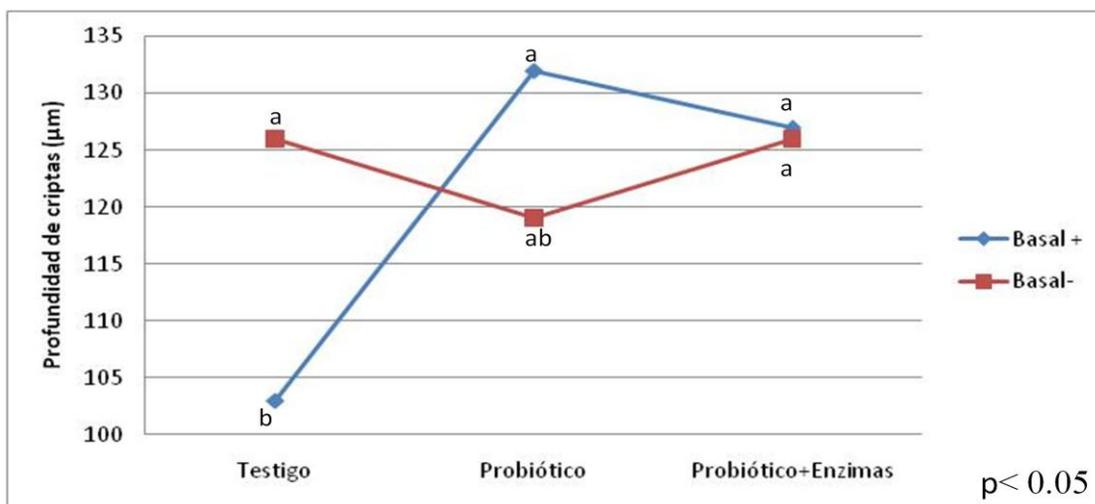


Figura 13. Gráfica de interacción Dieta x Aditivos en la profundidad de criptas en íleon al día 21 de edad. Distintas literales indican diferencia estadística significativa ($p < 0.05$).

Se observa en la Figura 14, que la longitud de vellosidades fue menor ($p < 0.05$) en los tratamientos Testigo y Probióticos con la dieta Basal positiva (+), respecto al tratamiento Probióticos + enzimas con la misma dieta y al tratamiento Probióticos con la dieta Basal negativa (-).

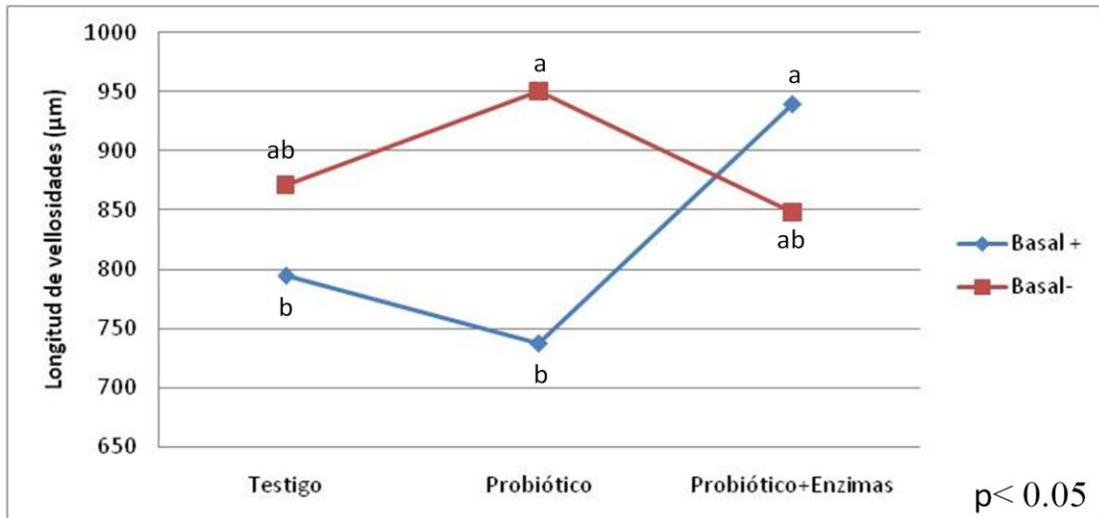


Figura 14. Interacción Dieta x Aditivos en la longitud de vellosidades en íleon al día 42 de edad. Distintas literales indican diferencia estadística significativa ($p < 0.05$).

La profundidad de criptas (Figura 15) fue menor ($p < 0.05$) en el tratamiento Probiótico +enzimas con la dieta Basal negativa (-) respecto a los demás niveles de los factores evaluados.

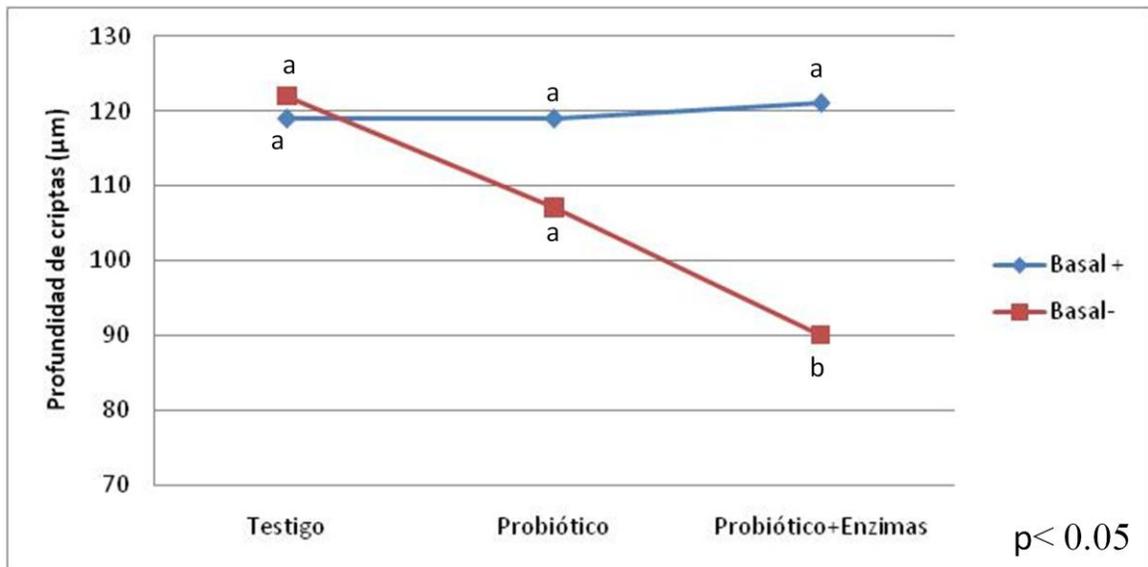


Figura 15. Efecto de interacción Dieta x Aditivos en la profundidad de criptas en íleon al día 42 de edad. Distintas literales indican diferencia estadística significativa ($p < 0.05$).

En las Figuras 16 y 17 se observan los cortes de íleon a los días 21 y 42 de edad, por los factores dietas y aditivos.

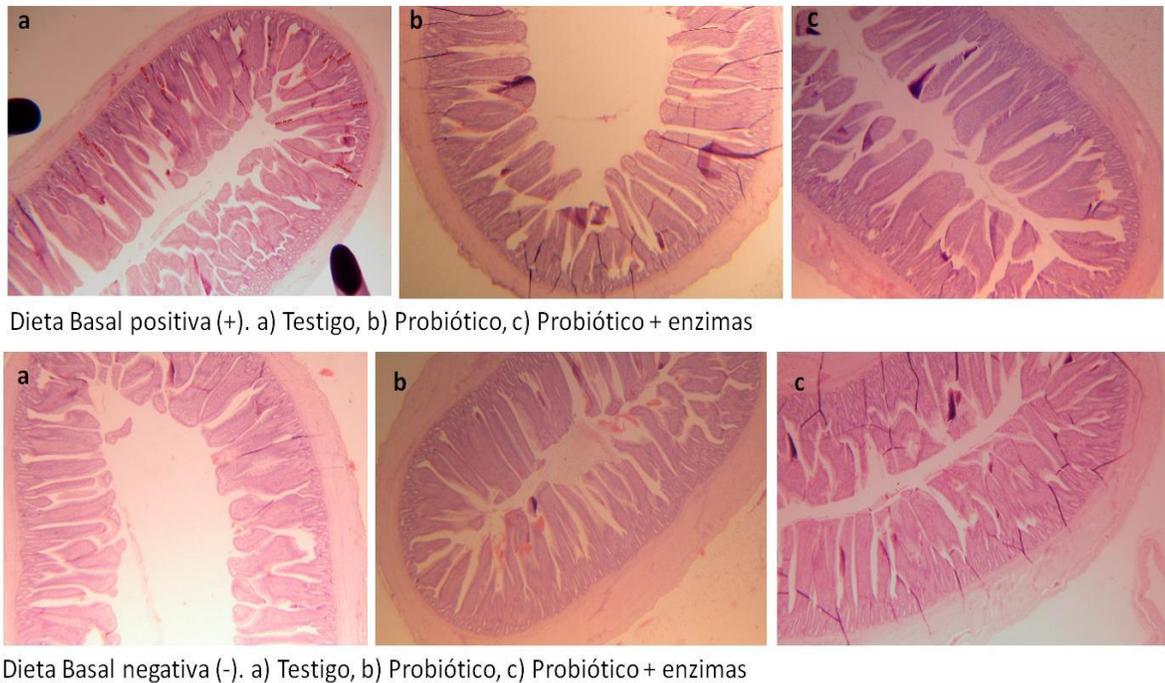
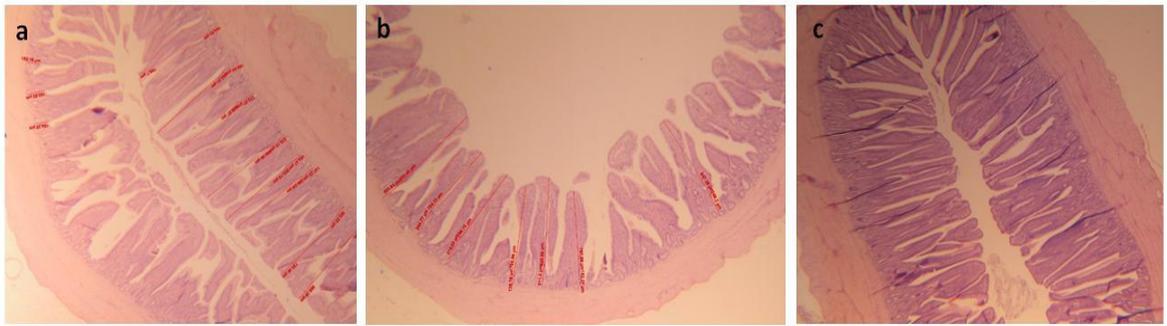
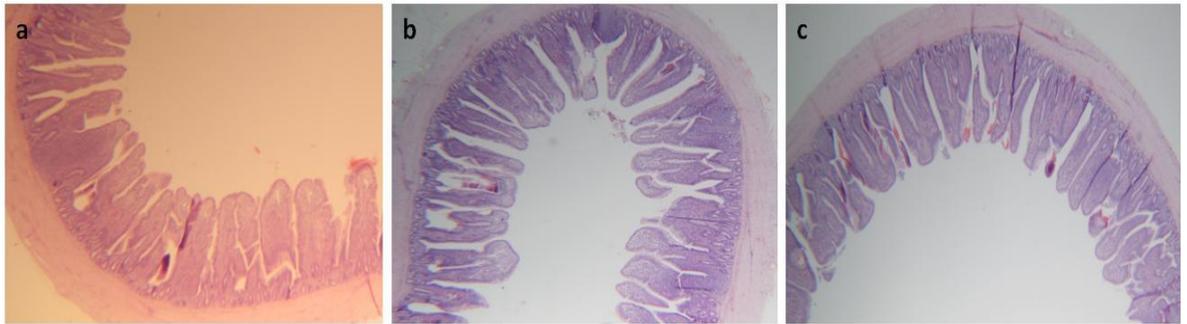


Figura 16. Cortes histológicos de las vellosidades de íleon al día 21 de edad.



Dieta Basal positiva (+). a) Testigo, b) Probiótico, c) Probiótico + enzimas



Dieta Basal negativa (-). a) Testigo, b) Probiótico, c) Probiótico + enzimas

Figura 17. Ilustración de las vellosidades de íleon al día 42 de edad.

3.3 Inmunidad humoral

No se observó diferencia estadística ($p > 0.05$) en los títulos de anticuerpos séricos a la enfermedad de Newcastle en ninguno de los momentos de muestreo, tanto en el factor aditivos como en el factor dietas (Cuadro 9). En los valores de IgA secretora intestinal, en el factor aditivos no se observó diferencia ni al día 21 ni al 42; el factor dietas se observó que los pollos que consumieron la dieta Basal positiva (+) presentaron 5 unidades de densidad óptica más ($p < 0.05$) respecto a los animales que consumieron la dieta Basal negativa (-).

Cuadro 9 Respuesta inmune humoral en pollos alimentados con dietas sorgo + soya, *B. subtilis* y un complejo enzimático, a los 21 y 42 días de edad.

	HI VEN , Log ₂		Ig As intestinal, DO 405 nm	
	Día 21	Día 42	Día 21	Día 42
Aditivos				
Testigo	7 ±0.41 ^a	8 ±0.31 ^a	95 ±1.16 ^a	92 ±0.37 ^a
Probiótico	6 ±0.31 ^a	8 ±0.33 ^a	99 ±4.03 ^a	93 ±0.50 ^a
Probiótico + Enzimas	7 ±0.26 ^a	8 ±0.27 ^a	93 ±0.59 ^a	89 ±2.87 ^a
Dietas				
Basal positiva(+)	6 ±0.34 ^a	8 ±0.27 ^a	98 ±2.72 ^a	90 ±1.96 ^a
Basal negativa(-)	7 ±0.21 ^a	9 ±0.21 ^a	93 ±0.46 ^b	92 ±0.42 ^a
Probabilidad				
Aditivos	0.18	0.24	0.15	0.20
Dieta	0.14	0.72	0.04	0.24
Aditivos X Dieta	0.76	0.08	0.16	0.59

Valores ± la desviación estándar. Distintas literales en cada columna de cada experimento, indican diferencia estadística ($p < 0.05$). **HI**= Inhibición de la hemoaglutinación, **VEN**= Virus de la enfermedad de Newcastle, **DO**= Densidad óptica.

3.4 Conteo de coliformes totales.

Como se puede ver en el Cuadro 10, en el factor aditivos, se observaron menores ($p < 0.05$) conteos de coliformes totales en los tratamientos adicionados con Probióticos o Probióticos +enzimas. En el factor dieta se observaron menores ($p < 0.05$) conteos de coliformes totales en la dieta Basal negativa (-) respecto a la dieta Basal positiva (+).

Cuadro 10. Conteos de coliformes totales en el contenido de íleon de pollos de engorda alimentados con dietas sorgo + soya, *B. subtilis* y un complejo enzimático, al día 42 de edad.

Aditivos		Log₁₀ de las UFC/g
Testigo		7 ± 0.24 ^b
Probiótico		6 ± 0.15 ^a
Probiótico + Enzimas		6 ± 0.13 ^a
Dietas		
Basal positiva(+)		7 ± 0.19 ^b
Basal negativa (-)		6 ± 0.14 ^a
Probabilidad		
Aditivos		0.00
Dieta		0.00
Aditivos X Dieta		0.16

Valores ± la desviación estándar. Distintas literales en cada columna indican diferencia estadística ($p < 0.05$). **UFC**= unidades formadoras de colonias

4. DISCUSIÓN

4.1 Parámetros productivos

En el factor dietas, la mejora en alrededor del 4% en la ganancia de peso y peso corporal, así como la disminución en el índice de conversión de los días 1-21 y 22-42 en los pollos alimentados con las dietas Basal positiva (+) se atribuye a la mayor densidad de nutrientes contenidos en esta dieta (Energía Metabolizable, aminoácidos esenciales y proteína). Al tener mayor cantidad de nutrientes la dieta Basal positiva (+), los pollos que la consumieron pudieron depositar mayor cantidad de proteína en forma de músculo, lo que a su vez coincide con el mayor rendimiento en canal observado al día 42. Zorrilla *et al.* (1993)⁷⁰ observaron que el aumento de peso en el pollo de engorda está influenciado linealmente por el nivel de energía en la dieta. Ellos tuvieron alrededor del 5% de mayor peso corporal con incrementos constantes de energía metabolizable (100 Kcal/Kg) en la dieta; si bien no observaron un efecto en la ganancia de peso con diferentes niveles de proteína, si observaron mayor ganancia de peso conforme aumentaron los niveles de lisina en la dieta. Leeson *et al.* (1996)⁷¹ describieron una disminución lineal en el peso corporal, peso de la canal y rendimiento en pechuga con porcentajes de dilución de la dieta del 10% (320 Kcal/Kg y 1.8 % de proteína cruda). Saleh *et al.* (2004)⁷² reportaron un aumento de alrededor del 3% de peso corporal y medio punto menos de índice de conversión al aumentar gradualmente los niveles de energía metabolizable (45 Kcal/Kg) y proteína cruda (0.22%) de la dieta.

En el factor aditivos, los resultados del incremento de peso corporal y ganancia de peso observadas en los pollos de los tratamientos a los cuales se les adicionó el Probiótico y el Probiótico + enzimas, del día 22-42 y en los parámetros acumulados del día 1- 42 de edad, se explican por una mejor digestión y absorción de los nutrientes contenidos en la dieta. *B. subtilis* contiene un sistema de secreción enzimática bien desarrollado, se ha visto que son capaces de secretar amilasas y proteasas⁷³, complementando de esta manera la digestión de los

pollos.⁷⁴ Teo y Tan (2007)³⁴ realizaron un experimento en donde emplearon dos fases de alimentación (1-21 días de edad y 22-42 días de edad) empleando dietas con maíz-pasta de soya como ingredientes principales y la adición de dos concentraciones de *B. subtilis* a las dietas; ellos no observaron diferencia en los parámetros productivos al día 21 de edad, sin embargo, al día 42 de edad observaron un incremento del 1.5% en la ganancia de peso y una mejora de 4 puntos en el índice de conversión. Sen *et al.* (2012)³⁶ emplearon dos fases de alimentación (1-21 días y 22-35 días) en dietas con maíz + pasta de soya + trigo como ingredientes principales y la adición de tres concentraciones de *B. subtilis* a las dietas; reportaron un incremento del 5-7% en la ganancia de peso al día 21 de edad y de 8% al día 35, también observaron una mejora de 5 y 10 puntos en el índice de conversión alimenticia (Kg/Kg) en las dos fases de alimentación. Los mismos autores reportaron una mejora en la retención aparente de nutrientes; con la adición de *B. subtilis* en la dieta, se mejoró 2.4% la energía bruta y 4% la proteína cruda a los 21 días y 3.3% la materia seca, 3.22% la energía bruta y 2.21% la proteína cruda a los 42 días. De la misma manera, la adición de enzimas exógenas a la dieta también mejora la digestión de los nutrientes contenidos en la dieta y complementa la secreción endógena por parte de las aves, lo que lleva a un aumento en la digestión de los nutrientes de la dieta.⁵³ Walsh *et al.* (2013)⁷⁵ emplearon dietas basadas en maíz-pasta de soya y adicionaron *B. subtilis* y un complejo enzimático (xilanasas, amilasas y proteasas), ellos observaron que los pollos de engorda que fueron adicionados en la dieta presentaron un 8% más de ganancia de peso y tuvieron una disminución en el índice de conversión.

El procesamiento de las canales tipo supermercado implica únicamente el desplume, desangrado y evisceración de los pollos, y no se toman en cuenta los pesos relativos de la pechuga, pierna y muslo.⁶⁴ En el presente estudio no se observó diferencia en el peso relativo de canal, en los pollos a los que se adicionó *B. subtilis* solo o combinado con enzimas en la dieta, lo que puede atribuirse a que se analizó el peso relativo de la canal completa y no sus diferentes partes. Molnar

et al. (2011)³⁵ realizaron un estudio en donde incluyeron 4 diferentes niveles de *B. subtilis* a las dietas de pollos de engorda, ellos no observaron diferencias estadísticas en el peso de la canal eviscerada. Sin embargo, al analizar el rendimiento de los cortes de la canal, pudieron observar que los pollos adicionados con el probiótico presentaron 8% más de rendimiento de pechuga y 4% menos de rendimiento en muslos. Acosta *et al.* (2007)⁷⁶ emplearon *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus rhamnosus* en dietas maíz-pasta de soya como ingredientes principales. Al igual que en el trabajo anterior, ellos no observaron diferencia en el rendimiento de la canal eviscerada, sin embargo observaron que el peso de la pechuga fue superior en un 3.12 % respecto al tratamiento testigo.

En el amarilleamiento en piel no se presentó diferencia entre los pollos adicionados o no con *B. subtilis* solo o en combinación con enzimas, lo anterior puede atribuirse a que los pollos fueron criados en buenas condiciones de sanidad y no fueron sometidas al estrés de las practicas de manejo que se realizan en aves comerciales, por lo que la salud e integridad intestinal no se vio comprometida⁷⁷ y por lo tanto la absorción de pigmento fue similar en aves adicionadas o no. Martínez (2013)⁷⁸ realizó un experimento en donde empleó dietas basadas en sorgo + soya + harina de carne y añadió diferentes probióticos a las dietas (*Lactobacillus acidophilus*, *B. subtilis* y *L. farciminis*); dicho autor no observó diferencia en el amarilleamiento en piel en los diferentes tratamientos. Cortés *et al.* (2000)³⁰ realizaron un experimento en donde evaluaron el amarilleamiento en piel, con la adición de *B. toyoi* a dietas basadas en sorgo + soya; observaron un aumento en la deposición de pigmento en la piel con la inclusión del probiótico en la dieta.

4.2 Análisis histológicos

En duodeno, en el factor dietas, las diferencias observadas en LV y profundidad de criptas en los dos periodos de muestreo, se atribuye a la mayor disponibilidad de nutrientes en lumen intestinal en los pollos que consumieron la dieta Basal positiva (+), lo que favoreció en crecimiento de las vellosidades intestinales y las criptas. Lo anterior coincide con lo reportado por Yamauchi *et al.* (1996)⁷⁹, Shamoto y Yamauchi (2000)⁸⁰, Yamauchi (2002)⁸¹ quienes reportan que la longitud de las vellosidades intestinales y la profundidad de las criptas intestinales disminuye en aves ayunadas conforme avanza el periodo de ayuno, recuperando su tamaño al restablecer la fuente de alimento. Los resultados observados en el presente trabajo contrastan con Thompson y Applegate (2006)⁸² quienes reportaron que no encontraron disminución en la longitud de las vellosidades intestinales de pollos de engorda con un ayuno de hasta 24 horas, lo cual atribuyeron a un mecanismo adaptativo de respuesta de la mucosa para maximizar la absorción de nutrientes.

En el factor aditivos, en duodeno al día 21 se observó que el espesor de lámina propia disminuyó alrededor del 28% en los tratamientos a los que se añadió el Probiótico y el Probiótico +enzimas en la dieta. Lo anterior se atribuye a una disminución en el tejido conectivo debido a la secreción de metabolitos, entre ellos antibióticos, por parte de *B. subtilis*, los cuales reducen la colonización intestinal con bacterias. Ravindran *et al.* (1984)⁸³ y Apajalahti *et al.* (2004)⁸⁴ mencionan que la microbiota intestinal disminuye la absorción de nutrientes al incrementar el grosor de la mucosa intestinal. Tomando en cuenta que el tiempo de permanencia del quimo en el duodeno es corto, de aproximadamente 10 minutos⁸⁵, un menor espesor de lámina propia contribuye a una mayor absorción de nutrientes en duodeno al incrementar el contacto con los capilares intestinales.⁸⁶ Es interesante mencionar que estos resultados coinciden con uno de los mecanismos de acción de los antibióticos promotores del crecimiento, que es precisamente la disminución del espesor de lámina propia.⁸⁷ Al día 42 se observó una mayor profundidad de

criptas, lo que coincide con lo reportado por Pelicano *et al.* (2003, 2005)^{88,89}, Lee *et al.* (2010)⁹⁰, quienes observaron criptas más grandes en animales suplementados con *B. subtilis*. Las criptas con tamaños incrementados indican una alta actividad celular proliferativa encaminada a asegurar una adecuada tasa de reemplazamiento epitelial para compensar las pérdidas normales por extrusión en la punta de la vellosidad.

En yeyuno, en la interacción Dieta x Aditivos al día 21 se observó un efecto favorable con la adición de los aditivos en ambas dietas, pero con diferentes mecanismos. El incremento en la longitud de vellosidades y profundidad de criptas con la adición del Probiótico, solo o en combinación con enzimas en la dieta Basal Positiva (+), se explica por el incremento en la proliferación celular de las criptas como efecto de *B. subtilis*, tal como reportan Pelicano *et al.* (2003, 2005), Lee *et al.* (2010).⁹⁰ Al haber sustrato disponible, las vellosidades también crecieron, tal como se mencionó por Zorrilla *et al.* (1993)⁷⁰, Leeson *et al.* (1996)⁷¹ y Saleh *et al.* (2004).⁷² En el caso del comportamiento de los aditivos en la dieta Basal negativa (-), el epitelio intestinal respondió disminuyendo el espesor de lámina propia, lo que también mejora la absorción de nutrientes, tal como se discutió previamente. Se menciona que el yeyuno es la porción intestinal en donde se realiza la mayor absorción de nutrientes⁸² y comparado con duodeno, la digesta tiene mayor tiempo de retención, 10 minutos vs 84 minutos respectivamente⁸⁵ por lo que el aumento en la longitud de las vellosidades y disminución de lámina propia favorecen una mayor absorción de nutrientes del lumen intestinal para mantener niveles óptimos de crecimiento y producción.⁹¹

En la interacción Dieta x Aditivos observada en íleon, al día 21, la disminución en la longitud de vellosidades, espesor de lámina propia y aumento en la profundidad de criptas con la adición del Probiótico, solo o en combinación con enzimas se debe a una disminución en la producción de ácidos grasos volátiles al haber una reducida fermentación de fibra en este segmento intestinal. Cabe resaltar que en la dieta se incluyó el 5% de DDGS, lo que aumenta el contenido total de PNA

insolubles. Van der Klis y Van Voorst (1993)⁹² e Iji *et al.* (2001)⁹³ observaron que el nivel de fibra, principalmente la fibra soluble, en la dieta tiene un efecto marcado en el desarrollo, anatomía y función intestinal, llevando a un incremento en el tamaño y longitud del intestino delgado, colon y ciego en aves, lo que podría estar asociado con modificación histológica del intestino y consecuentemente con sus funciones de absorción. Si bien se tiene mayor impacto en la morfología intestinal por la inclusión de fibra soluble en la dieta, al incluir fibra insoluble se tiene una fuente de sustratos fermentables en la última porción del tracto gastrointestinal de las aves, particularmente en el íleon. Montagne *et al.* (2003)⁹⁴ describe que los ácidos grasos volátiles de cadena corta (principalmente butirato), productos de la fermentación de los carbohidratos, tienen un efecto trófico en las vellosidades intestinales, lo que provocaría un incremento en la longitud de las vellosidades y espesor de mucosa. Al añadir el complejo multienzimático a la dieta se tendría mayor cantidad de xilooligosacáridos fermentables pasando ciegos y por lo tanto menor fermentación de la fibra en íleon. Lo anterior explicaría el mayor tamaño de vellosidades en el tratamiento Testigo comparado con el tratamiento Probiótico y Probiótico+enzimas.

Al día 42, se observó un mayor ELP en los tratamientos suplementados con Probióticos y Probióticos +enzimas, sin interacción Dieta x Aditivos en esta variable. Lo anterior se explica por un incremento en la cantidad de células del sistema inmunológico en este segmento intestinal. Gómez *et al.* (2010)⁹⁵ mencionan mayor infiltración de linfocitos en la última porción del tracto digestivo, lo que podría explicar los resultados observados en dichos tratamientos.

4.3 Inmunidad humoral

En el factor dietas, la diferencia observada en Ig As al día 21, en la dieta Basal positiva (+), se debió a que hubo mayor cantidad de nutrientes que pudieron ser dirigidos a la formación de anticuerpos. Itzá-Ortíz *et al.* (2008)⁶⁵ observaron mayores títulos de anticuerpos séricos IgG e IgA en la Infección de la Bolsa de Fabricio en pollos de engorda que recibieron dietas con mayor densidad energética, comparados con pollos a los cuales se les ofrecieron dietas reducidas en energía.

En el factor aditivos, los títulos de anticuerpos a la enfermedad de Newcastle e Ig As no presentaron diferencia, tal resultado se explica, en primer lugar por las buenas condiciones de higiene y manejo en que se encontraban los animales. Lo anterior se traduce en bajas condiciones de estrés y una exposición disminuida a patógenos. Jin *et al.* (1998)⁷⁷ mencionan que el efecto de los probióticos en pollos es más evidente en condiciones de estrés. En segundo lugar, se explica por la capacidad de *B. subtilis* para provocar mayor estimulación inmunológica de tipo celular. Existen trabajos indicando que, principalmente, la estimulación inmunológica provocada por *B. subtilis* es inmunidad innata de tipo celular, al aumentar las subpoblaciones de linfocitos intraepiteliales intestinales, particularmente CD8⁺⁹⁰, un aumento en la fagocitosis por macrófagos y heterófilos^{98,99}, así como un aumento en la expresión de receptores TLR-2 y TLR-4.²⁷ También se debe tomar en cuenta que el nivel de anticuerpos circulantes puede proveer información del estatus inmunológico a nivel sistémico y no de la capacidad de respuesta inmunológica contra un antígeno específico¹⁰⁰. Lo anterior concuerda con lo reportado por Lee *et al.* (2010)⁹⁰ quienes realizaron un estudio en pollos de engorda y no encontraron diferencias en el título de anticuerpos séricos a la enfermedad de Newcastle en 8 de 9 cepas de *Bacillus subtilis* evaluadas. Sin embargo, ellos observaron que con la inclusión de *B. subtilis* disminuyeron los niveles de α -1-AGP, que es una proteína de fase aguda que se incrementa como respuesta a la inflamación inespecífica.

4.4 Conteos de coliformes totales

En el factor dietas, la reducción en el conteo de coliformes totales en los animales que consumieron la dieta Basal negativa (-), se explica por la menor disponibilidad de nutrientes disponibles para ser empleados como sustratos por las bacterias.¹⁵ Lo anterior coincide con lo observado por Nian *et al.* (2011)⁹⁶, quienes observaron que en dietas suplementadas con xilanasas, las aves que fueron alimentadas con dietas reducidas en nutrientes presentaron bajos conteos de coliformes totales en íleon respecto a aves alimentados con dietas de densidades nutricionales mayores.

En el factor aditivos, la reducción en las UFC de coliformes en íleon en los tratamientos adicionados con esporas de *B. subtilis* pudo deberse a tres mecanismos inherentes. En primer lugar a la secreción de péptidos con efecto antibiótico y enzimas, que redujeron la presencia de bacterias en el lumen intestinal. En segundo lugar, al mecanismo de exclusión competitiva, el cual permitió disminuir la competencia por sustratos fermentables (almidones y aminoácidos) por la microbiota intestinal. En tercer lugar, al mejorar la digestión de los pollos puesto que *B. subtilis* es capaz de producir amilasas y proteasas, lo que puede complementar la digestión de las aves⁷⁴ y de esta manera se mejoró la digestión/absorción de los nutrientes contenidos en el alimento. Los resultados observados en el presente trabajo, coinciden con lo reportado por diversos autores. La Ragione y Woodward (2003)³² realizaron un experimento en pollos de engorda y observaron una reducción en la colonización por *Salmonella enterica* de 0.5 a un logaritmo y de más de un logaritmo en la colonización por *Clostridium perfringens*, con la adición de *B. subtilis* a la dietas. Molnar *et al.* (2011)³⁵ realizó un experimento en pollos y observó una reducción de dos logaritmos en la colonización por *E. coli* en íleon, a los 35 días de edad de los animales.

La disminución en los conteos de coliformes se puede relacionar con la mejor ganancia de peso observada en los tratamientos adicionados. Apajalathi y

Kettunen (2006)⁹⁷ describen una relación inversamente proporcional entre la densidad de las poblaciones bacterianas en el intestino y el crecimiento corporal. Es decir, mientras más densamente poblado por bacterias se encuentre el intestino, menor ganancia de peso se logra.

5. CONCLUSIONES

Bajo las condiciones experimentales empleadas en el presente trabajo, se puede concluir que pollos de engorda alimentados con dietas conteniendo sorgo + soya como ingredientes principales, con densidades de nutrientes mayores que aquellos que recibieron dietas con -85 Kcal de EM/ Kg y 1.5% menos de proteína y aminoácidos esenciales:

1. Tuvieron mejor peso corporal, ganancia de peso, rendimiento en canal y menor el índice de conversión.
2. Incrementaron la longitud de las vellosidades y profundidad de criptas en duodeno al día 21 de edad.
3. Aumentaron las UFC de coliformes en íleon, al día 42 de edad.
4. Incrementaron los niveles de IgA secretora al día 21 de edad, sin afectar los títulos de anticuerpos a la enfermedad de Newcastle.

El uso de probióticos compuestos de esporas de *Bacillus subtilis*, solos o en combinación con complejos enzimáticos que contienen xilanasas, amilasas y proteasas, en dietas con sorgo + soya como ingredientes principales:

1. Incrementaron la ganancia de peso y peso corporal en pollos de engorda.
2. Disminuyeron el espesor de lámina propia en duodeno, al día 21 de edad.
3. Disminuyeron las UFC de coliformes en íleon, al día 42 de edad.
4. No afectaron los niveles de IgA secretora intestinal ni los títulos de anticuerpos a la enfermedad de Newcastle.

Finalmente, de la información obtenida en este trabajo, se concluye que el complejo enzimático a base de (amilasas, proteasas y xilanasas) y el probiótico (*Bacillus subtilis*) mejoran el valor alimenticio de dietas sorgo + soya para pollos de engorda.

6. REFERENCIAS

1. Del Moral BLA, Hurtado JA. Los efectos de la gripe aviar en los precios del pollo. Boletín de la Facultad de Economía. Universidad Nacional Autónoma del Estado de México. 2013; V (3): 29-38
2. SIAP-SAGARPA [página de internet] México: Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Secretaría de Agricultura Ganadería Desarrollo Rural Pesca y Alimentación. [Citado el día 14 de Septiembre de 2013] Disponible en la página de internet: http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&layout=mid=369
3. UNA [página de internet] México: Unión Nacional de Avicultores. [Citado el día 14 de Septiembre de 2013] Disponible en la página de internet: <http://una.org.mx/2013/component/content/article/16unageneral/indicadores-economicos/47-indicadores-economicos.html>
4. Gómez VGG. Modulación nutricional de la inmunidad en pollo de engorda mediante el empleo de un estimulante (paredes de levaduras de *Saccharomyces cerevisiae*) [Tesis de Doctorado]. Distrito Federal, México: Universidad Nacional Autónoma de México, 2009.
5. López CC, Arce MJ, Ávila GE. Estrategias Nutricionales y de alimentación para obtener una eficiente productividad ante los retos actuales. AMEVEA [en línea] Argentina 2008 [citado 5 de Abril de 2012] Disponible en internet: www.cadenaavicola.com.ar/.../.v
6. Koutsos EA, Arias VJ. Intestinal ecology: Interactions among the gastrointestinal tract, nutrition, and the microflora. *J. Appl. Poult. Res.* 2006; 15: 161-173
7. Hoerr JF. Intestinal integrity and the impact of losing it. *World Poultry-Elsevier* 2001; 17 (7): 16-18
8. Chambers JR, Gong J. The intestinal microbiota and its modulation for *Salmonella* control in chickens. *Food Res. Inter.* 2011; 44: 3149-3159

9. Lan PTN, Hayashi H, Sakamoto M, Benno Y. The role of the commensal gut microbiota community in broiler chickens. *Poult. Sci. J* 2005; 61:95-104
10. Alzueta CML, Rodríguez MT, Cutuli A, Rebole L, Ortiz T, Centeno C, Trevino J. Effect of whole and demucilaged linseed in broiler chickens diets on digesta viscosity, nutrient utilization and intestinal microflora. *Br. Poult. Sci.* 2003; 44: 67- 74
11. Bedford MR, Cowieson AJ. Exogenous enzymes and their effects on intestinal microbiology. *Anim. Feed Sci. Technol.* 2012; 173: 76-85
12. Patterson JA, Burkholder KM. Application of prebiotics and probiotics in poultry production. *Poult. Sci.* 2003; 82: 627-631
13. Vilá B, Esteve-Garcia E, Brufau J. Probiotic micro-organisms: 100 years of innovation and efficacy; modes of action. *Poult. Sci. J.* 2010; 65: 369-380
14. Tellez G, Higgins SE, Donoghue AM, Hargis B. Digestive physiology and the role of microorganisms. *J. Appl. Poult. Res.* 2006; 15: 136-144
15. Bedford M. Removal of antibiotic growth promoters from poultry diets: implications and strategies to minimize subsequent problems. *Poult. Sci. J.* 2000; 56: 347-365
16. Chichlowski M, Croom J, McBride BW, Havenstein GB, Koci MD. Metabolic and physiological impact of probiotics or direct-feed microbials on poultry: A brief review of current knowledge. *Int. J. Poult. Sci.* 2007; 6(10): 694-704
17. Fuller R. A review: Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriology* 1989; 66: 365-378
18. Hong HA, Duc LH, Cutting SM. The use of bacterial spore formers as probiotics. *FEMS Microb. Rev.* 2005; 29: 813-835
19. Choct M. Managing gut health through nutrition. *Brit. Poult. Sci.* 2009; 50 (1):9-15
20. Errington J. Regulation of endospore formation in *Bacillus subtilis*. *Nat. Rev. Microbiol.* 2003; 1: 117-126
21. Henriques AO, Moran JCP. Structure assembly and function of the spore surface layers. *Annu. Rev. Microbiol* 2007; 61: 555-588

22. Cutting SM. *Bacillus* probiotics. *Food Microbiology* 2011; 28: 214-220
23. Soccol RC, Porto de Souza VL, Rigon SM, Pedroni MAB, Tiemi YC, De Dea LJ, Pandey A, Thomaz-Soccol V. The potential of probiotics: A review. *Food Tech. Biotech.* 2010; 48 (4): 413-434
24. Jadamus A, Vahen W, Simon O. Growth behaviour of a spore forming probiotic strain in the gastrointestinal tract of broiler chicken and piglets. *Arch. Anim. Nutr.* 2001; 54:1-17
25. Hoa TT, Duc LH, Isticato R, Baccigalupi L, Ricca E, Van PH, Cutting SM. Fate and dissemination of *Bacillus subtilis* spores in a murine model *Appl. Environ. Microbiol.* 2001; 67(9): 3819-3823
26. Rhee KJ, Sethupathi P, Driks A, Lanning DK, Knight KL. Role of commensal bacteria in development of gut-associated lymphoid tissues and preimmune antibody repertoire. *J. immunol.* 2004; 172: 1118-1124
27. Huang JM, La Ragione RM, Nunez A, Cutting SM. Immunostimulatory activity of *Bacillus* spores. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2008; 53(2):1-9
28. Duc LH, Hong HA, Fairweather N, Ricca E, Cutting SM. Bacterial spores as vaccine vehicles. *Infect. Immun.* 2003; 71: 2810-2818
29. Fritts CA, Kersey JH, Motl MA, Kroger EC, Yan F, Si J, Jiang Q, Campos MM, Waldroup AL, Waldroup PW. *Bacillus subtilis* C-132 (calsporin) improves live performance and microbiological status of broiler chickens. *J. App. Poult. Res.* 2000; 9: 149-155
30. Cortés CA, Ávila GE, Casaubon HMT, Carrillo DS. Efecto de *Bacillus toyoi* sobre el comportamiento productivo en pollos de engorda. *Vet. Méx.* 2000; 31(4): 301-309
31. La Ragione M, Casula G, Cutting SM, Woodward MJ. *Bacillus subtilis* spores competitively exclude *Escherichia coli* O78:K80 in poultry. *Vet. Microbiol.* 2001; 79: 133-142
32. La Ragione RM, Woodward MJ. Competitive exclusion by *Bacillus subtilis* spores of *Salmonella enterica* serotype enteritidis and *Clostridium perfringens* in young chickens. *Vet. Microb.* 2003; 94: 245- 256

33. Khaksefidi A, Ghoorchi T. Effect of probiotic on performance and immunocompetence in broiler chickens. *J. Poult. Sci.* 2006; 43: 296-300
34. Teo AY, Tan HM. Evaluation of the performance and intestinal gut microflora of broiler fed on corn-soy diets supplemented with *Bacillus subtilis* PB6 (CloSTAT). *J. Appl. Poult. Res.* 2007; 16: 296-303
35. Molnár AK, Podmaniczky B, Kürt P, Tenk I, Glávits R, Virág GY, Szabo ZS. Effect of different concentrations of *Bacillus subtilis* on growth performance, carcass quality, gut microflora and immune response of broiler chickens. *B Poult. Sci.* 2011; 52(6): 658-665
36. Sen S, Ingale SL, Kim YW, Kim JS, Kim KH, Lohakare JD, Kim EK, Ryu MH, Kwon IK, Chae BJ. Effect of supplementation of *Bacillus subtilis* LS 1-2 to broiler diets on growth performance, nutrient retention, caecal microbiology and small intestinal morphology. *Res. Vet. Sci.* 2012; 93: 264-268
37. Amerah AM, Quilesb A, Medel P, Sánchez J, Lehtinend MJ, Gracia MI. Effect of pelleting temperature and probiotic supplementation on growth performance and immune function of broilers fed maize/soy-based diets. *Anim. Feed Sci. Technol.* 2013; 180: 55-63
38. Nagashiro C. Actualidad en el uso de enzimas en la nutrición de aves. Primer congreso de enzimas. [en línea] Maracaibo, Venezuela 2008 [citado el 20 de Abril de 2012] Disponible en internet: http://www.wpsa-aeca.es/articulo.php?id_articulo=1421
39. Amerah AM, Gilbert G, Simmins PH, Ravindran V. Influence of feed processing on the efficacy of exogenous enzymes in broiler diets. *Poult. Sci. J* 2011;67:29-46
40. Chárraga S, Fernández SR. Uso de enzimas en la producción avícola. AMEVEA [en línea] Ecuador 2010 [citado el 20 de Abril de 2012] Disponible en internet: <http://www.amevea-ecuador.org/datos/MEMORIAS.pdf>

41. Barletta A. Introduction: Current market and expected developments. In Bedford MR and Partridge GG, editors. *Enzymes in Farm Animal Nutrition*, 2nd edition. United Kingdom: CAB International Publishing, 2010:1-11
42. Hruby M, Pierson EEM. Implications of enzyme use in corn/sorghum/soy poultry diets on performance, nutrient utilization and gut microflora. [Tomado de la dirección electrónica <http://ag.ansc.purdue.edu/poultry/multistate/HrubyPiersonFinnfeeds.pdf>] *Proceeding of Mult-State Poult. Meeting*. No. 12
43. Sheppy C. The Current feed enzyme market and likely trends: In Bedford MR and Partridge GG, editors. *Enzymes in farm animal nutrition*. United Kingdom: CAB International Publishing, 2001:1-10
44. Santos AA. Poultry intestinal health through diet formulation and exogenous enzyme supplementation. [Tesis de Doctorado]. United States of America: North Carolina State University, 2006.
45. Noy Y, Sklan D. Digestion and absorption in the young chick. *Poult. Sci.* 1995; 74: 366-373
46. Bach KKE. The nutritional significance of “dietary fibre” analysis. *Anim. Feed Sci. Technol.* 2001; 90: 3-20
47. Chesson A. Non-starch polysaccharide degrading enzymes in poultry diets: influence of ingredients on the selection of activities. *Poul. Sci. J.* 2001; 57: 251-263
48. Paloheimo M, Pironen J, Vehmaanpera J. Xylanases and cellulases as feed aditives. In Bedford MR and Partridge GG, editors. *Enzymes in farm animal nutrition*, 2nd edition. United Kingdom: CAB International Publishing, 2010:12-53
49. Ritz CW, Hulet RM, Self BB, Denbow DM. Growth and intestinal morphology of male turkeys as influenced by dietary supplementation of amylase and xylanase. *Poult. Sci.* 1995; 74: 1329–1334.
50. Mahagna M, Nir I, Larbier M, Nitsan Z. Effect of age and exogenous amylase and protease on development of the digestive tract, pancreatic

enzyme activities and digestibility of nutrients in young meat-type chicks. *Reprod. Nutr. Dev.* 1995; 35: 201–212.

51. Douglas MW, Parsons CM. Effect of various soybean meal sources and avizyme on chick growth performance and ileal digestible energy. *J. Appl. Poult. Res.* 2000; 9:74–80
52. Café MB, Borges CA, Fritts CA, Waldroup PW. Avizyme improves performance of broilers fed corn soybean meal-based diets. *J. Appl. Poult. Res.* 2002; 11: 29–33.
53. Gracia MI, Aranibar MJ, Lázaro R, Medel P, Mateos GG. α -amylase supplementation of broiler diets based on corn. *Poult. Sci.* 2003; 82: 436-442
54. Onderci M, Sahin N, Sahin K, Cikim G, Aydın A, Ozercan I, Aydın S. Efficacy of Supplementation of α -amylase-producing bacterial culture on the performance, nutrient use, and gut morphology of broiler chickens fed a corn-based diet. *Poult. Sci.* 2006; 85: 505-510
55. Cowieson AJ, Singh DN, Adeola O. Prediction of ingredient quality and the effect of a combination of xylanase, amylase, protease and phytase in the diets of broiler chicks. 1. Growth performance and digestible nutrient intake *Brit. Poult. Sci.* 2006; 47(4): 477-489
56. Cowieson AJ, Singh DN, Adeola O. Prediction of ingredient quality and the effect of a combination of xylanase, amylase, protease and phytase in the diets of broiler chicks. 2. Energy and nutrient utilization *Brit. Poult. Sci.* 2006; 47(4): 490-500
57. Liu N, Ruc YJ, Tang DF, Xua TS, Partridge GG. Effects of corn distillers dried grains with solubles and xylanase on growth performance and digestibility of diet components in broilers. *Anim. Feed Sci. Technol.* 2011; 163: 206-266
58. Barekain MR, Choct M, Iji AP. Xylanase supplementation improves the nutritive value of diets containing high levels of sorghum distillers' dried

- grains with soluble for broiler chickens. *J. Sci. Food Agric.* 2013; 93(7): 1552-1559
59. Odetallah NH, Wang JJ, Garlich JD, Shih JCH. Keratinase in starter diets improves growth of broiler chicks. *Poult. Sci* 2003; 82: 664-670
60. Ghazi S, Rooke JA, Galbraith H. Improvement of the nutritive value of soybean meal by protease and α -galactosidase treatment in broiler cockerels and broiler chicks. *Brit. Poult. Sci.* 2003; 44(3): 410-418
61. Santiago GR, Cortés CA, López CC, Ávila GE. Evaluación de tres programas de alimentación para pollos de engorda con base en dietas sorgo –soya con distintos porcentajes de proteína. *Vet. Mex.* 2011; 42(4): 299- 309
62. SMN-CONAGUA [página de internet] México: Sistema Meteorológico Nacional. Comisión Nacional del Agua. [Citado el 10 de Febrero de 2014] Disponible en la página de internet: <http://www.smn.conagua.gob.mx>
63. Juárez Estrada MA. Capítulo VII: Registros de producción para pollo de engorda. En Serrano Ávalos RC, Hernández Velasco X, editores. *Sistemas de producción animal I Volumen 1, Aves.* 2da edición, Sistema de Universidad abierta, UNAM 2005; 105-127
64. Rubio García Ma. E. Capítulo XIII: Procesamiento, industrialización y comercialización del pollo productor de carne. En Serrano Ávalos RC, Hernández Velasco X, editores. *Sistemas de producción animal I Volumen 1, Aves.* 2da edición, Sistema de Universidad abierta, UNAM 2005; 223-240
65. Itzá-Ortiz MF, López-Coello C, Ávila-González E, Gómez-Rosales S, Arce-Menocal J, Velásquez-Madrado PA. Effect of energy source and level on the length of intestinal villi, immune response and the production performance in broilers. *Vet. Mex.* 2008; 39(4): 357-376
66. Solis de los Santos F, Farnell MB, Téllez G, Balog JM, Anthony NB, Torres-Rodríguez A, Higgins S, Hargis BM, Donoghue AM. Effect of prebiotic on gut development and ascites incidence of broilers reared in a hypoxic environment. *Poult. Sci.* 2005; 84:1092-1100

67. Thayer SG, Beard CW. Serologic procedures. Swayne DE, Glisson RJ, Jackwood WM, Pearson EJ, Reed MW editors. A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens. Pennsylvania: American Association of Avian Pathologists, 1998; 257-258
68. Giannenas I, Papadopoulos E, Tsaliec E, Triantafilloud E, Henikl S, Teichmanne K. Assessment of dietary supplementation with probiotics on performance, intestinal morphology and microflora of chickens infected with *Eimeria tenella*. *Vet. Parasitol.* 2012; 188 (2): 31-40
69. Kuehl RO. Diseño de Experimentos: Principios estadísticos de diseño y análisis de investigación. 2^{da} edición. México: Thomson Learning, 2001
70. Zorrilla FF, Cuca GM, Ávila GE. Efecto de niveles de energía, lisina y proteína en dietas para pollos de engorda en iniciación. *Vet. Mex.* 1993; 24 (4): 311-316
71. Leeson SL, Caston and Summers JD. Broiler responses to diet energy. *Poult. Sci.* 1996; 75: 529-535
72. Saleh EA, Watkins SE, Waldroup AL and Waldroup PW. Effects of dietary nutrient density and energy feeding programs for growing large male broilers chickens. *Int. J. Poult. Sci.* 2004;3 : 11-16
73. Schallmeyer M, Singh A, Ward OP. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Canad. J. Microbiol.* 2004; 50: 1-17
74. Lan Y, Verstegen MWA, Tamminga S, Williams BA. The role of the comensal gut microbial community in broiler chickens. *Poult. Sci. J.* 2005; 47: 106-114
75. Walsh MC, Romero LF, Indrakumar SE, Ravindran V. Influence of combinations of a direct-fed microbial and exogenous enzymes on the growth performance and feed efficiency of broilers. *Poult. Sci.* Poultry Science Association Annual Meeting 2013, Metabolism and nutrition: Feed additives II. (abstracts 169-179) Vol.92 (E- suppl. 1)

76. Acosta A, Lon-Wo E, García Y, Dieppa O, Febles M. Efecto de una mezcla probiótica (*Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus rhamnosus*) en el comportamiento productivo, rendimiento en canal e indicadores económicos en el pollo de ceba. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*. 2007;41(4):355-358
77. Jin LZ, Ho YW, Abdullah N, Ali AM, Jalaludin S. Growth performance, intestinal microbial populations, and serum cholesterol of broilers fed diets containing *Lactobacillus* cultures. *Poult. Sci.* 1998; 77: 1259-1265
78. Martínez MG. Respuesta a la adición de probióticos sobre los parámetros productivos y la pigmentación de la piel del pollo de engorda *in vivo* [Tesis de Licenciatura]. Distrito Federal, México: Universidad Nacional Autónoma de México, 2013
79. Yamauchi K, Kamisoyama H, Isshiki Y. Effects of fasting and refeeding on structures of the intestinal villi and epithelial cells in white leghorn hens. *B. Poult. Sci.* 1996; 37(5): 909-921
80. Shamoto K, Yamauchi K. Recovery responses of chick intestinal villus morphology to different refeeding procedures. *Poult. Sci.* 2000; 79: 718- 723
81. Yamauchi K. Review on chicken intestinal villus histological alterations related with intestinal function. *J. Poult. Sci.* 2002; 39: 229-242
82. Thompson KL, Applegate TJ. Feed withdrawal alters small-intestinal morphology and mucus of broilers. *Poult. Sci* 2006; 85: 1535- 1540
83. Ravindran V, Kornegay ET, Webb KE. Effects of fiber and virginamicyn on nutrient absorption, nutrient retention and rate of passage in growing swine. *J. Anim. Sci.* 1984; 59: 400-408
84. Apajalahti J, Kettunen A, Graham H. Characteristics of the gastrointestinal microbial communities, with special reference to the chicken. *Poult. Sci. J.* 2004; 60: 223- 232

85. Denbow M. Chapter 12: Gastrointestinal anatomy and physiology: In Causey Whittow editor. *Sturkie's Avian Physiology* 5th edition, Academic Press 2000: 229-325
86. Dibner JJ, Kitchell ML, Atwell CA, Ivey FJ. The effect of dietary ingredients and age on the microscopic structure of the gastrointestinal tract in poultry. *J. App. Poult. Res.* 1996; 5: 70-77
87. Gaskins HR, Collier CT, Anderson DB. Antibiotics as growth promotants: Mode of action. *Anim. Biotech.* 2002; 13 (1): 29-42
88. Pelicano ERL, Souza PA, Souza HBA, Oba A, Norkus EA, Kodawa LM, Lima TMA. Morfometria e ultra-estrutura da mucosa intestinal de frangos de corte alimentados com dietas contendo diferentes probióticos. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias* 2003; 98 (547): 124-134
89. Pelicano ERL, Souza PA, Souza HBA, Figueiredo DF, Boiago MM, Carvalho SR, Bordon VF. Intestinal mucosal development in broiler chickens fed natural growth promoters. *Braz. J. Poult. Sci.* 2005; 7(4): 221-229
90. Lee KW, Lee SH, Lillehoj HS, Li GX, Jang S I, Babu US, Park MS, Kim DK, Lillehoj EP, Neumann AP, Rehberger TG, Siragusa GR. Effects of direct-fed microbials on growth performance, gut morphometry, and immune characteristics in broiler chickens. *Poult. Sci.* 2010; 89: 203-216
91. Salim HM, Kang HK, Akter N, Kim DW, Kim JH, Kim MJ, Na JC, Jong HB, Choi HC, Suh OS, Kim WK. Supplementation of direct-feed microbials as an alternative to antibiotic on growth performance, immune response, cecal microbial populations and ileal morphology of broiler chickens. *Poult. Sci.* 2013; 92: 2084-2090
92. Van der Klis JD, Van Voorst, A. The effect of carboxymethylcellulose (a soluble polysaccharide) on the rate of marker excretion from the gastrointestinal tract of broilers. *Poult. Sci.* 1993; 72, 503-512

93. Iji PA, Saki AA, Tivey DR. Intestinal development and body growth of broiler chicks on diets supplemented with non-starch polysaccharides. *Anim. Feed Sci. Technol.* 2001;89:175–188.
94. Montagne L, Pluske JR, Hampson DJ. A review of interactions between dietary fibre and the intestinal mucosa, and their consequences on digestive health in young non-ruminant animals. *Anim. Feed Sci. Technol.* 2003; 108: 95-117
95. Gómez VGG, López CC, Maldonado BC, Ávila GE. El sistema inmune digestivo de las aves. *Investigación y Ciencia de la Universidad Autónoma de Aguascalientes* 2010; 48: 9-16
96. Nian F, Guo YM, Ru YJ, Li FD, Péron A. Effect of exogenous xylanase supplementation on the performance, net energy and gut microflora of broiler chickens fed wheat-based diets. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 2011; 24(3): 400-406
97. Apajalahti J, Kettunen A. Microbes of the chicken gut. In: G.C.Perry (ed) *Poultry Science Symposium* CABI Publishing, Wallingford (in press) Series 2006; 28.
98. Khaksefidi A, Ghoorchi T. Effect of probiotic on performance and immunocompetence in broiler chickens. *J. Poult. Sci.* 2006; 43: 296-300
99. Lee KW, Li G, Lillehoj HS, Lee SH, Jang SI, Babu US, Lillehoj EP, Neumann AP, Siragusa GR. *Bacillus subtilis*- based direct-fed microbials augment macrophage function in broiler chickens. *Res. Vet. Sci.* 2011; 91: e87-e91
100. Mountzouris KC, Tsitsirikos P, Palamidi I, Arvaniti A, Mohnl M, Schatzmayr G, Fegeros K. Effects of probiotic inclusion levels in broiler nutrition on growth performance, nutrient digestibility, plasma immunoglobulins, and cecal microflora composition. *Poult. Sci.* 2010; 89: 58-67

ANEXO 1

TÉCNICA DE ELISA

Se utilizó una placa de 96 pozos de fondo plano (Nunc[®] Fischer Scientific Rochester), la cual se cubrió con 100 µl IgA de pollo (Chicken IgA ELISA quantitation Kit Bethyl Laboratories Inc., Montgomery TX) previamente reconstituida en buffer de carbonatos (0.05M pH 9.6), la placa se dejó incubar por 24 horas a 4 °C. Posteriormente, la placa se lavó tres veces con PBS adicionado con Tween-20 al 0.05 %. Se añadieron 100 µl de solución de bloqueo PBS leche descremada al 0.5 %, sacarosa 0.2 %, se incubó por 30 minutos y posteriormente se lavó tres veces con PBS adicionado con Tween-20 al 0.05 %. Una vez realizados los lavados, se depositaron 10 µl de las muestras de los lavados intestinales y se incubaron 1 h a 37 °C. Una vez pasado el tiempo de incubación, se retiraron y se lavaron cinco veces con PBS Tween-20 al 0.05 %.

Se añadieron 100 µl de conjugado HRP (Goat anti-chicken IgA HRP, Bethyl Laboratories Inc., Montgomery TX.) (2 µl de un anticuerpo anti-IgA de pollo + 20 µl de solución de stop) y se incubó por una hora a 37° C. Una vez transcurrido este tiempo se realizaron cinco lavados con PBS adicionado con Tween-20 al 0.05 %, posteriormente se añadió el sustrato ABTS (ABTS, Synbiotic Corporation) (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) y se incubó durante 20 min. La reacción se detuvo con la adición de solución de paro (H₂SO₄ 2M). La lectura se realizó con una absorbancia 405 nm en un espectrofotómetro (Lector ELISA Biotek[®] EL X800, filtro de 405 nm).

ANEXO 2

PRUEBAS DE SHAPIRO-WILK Y LEVENE

Test Shapiro –Wilk para corroborar normalidad

Parámetros productivos

Tests of Normality^{d,c,d,e,f,g,h,i,j,k,l}

	Tratamiento	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Peso_21	1	.221	5	.200	.933	5	.616
	2	.202	5	.200	.889	5	.351
	3	.245	5	.200	.911	5	.476
	4	.176	5	.200	.971	5	.882
	5	.263	5	.200	.856	5	.214
	6	.203	5	.200	.943	5	.687
Peso_42	1	.246	5	.200	.844	5	.178
	2	.115	5	.200	.999	5	1.000
	3	.281	5	.200	.844	5	.176
	4	.289	5	.199	.850	5	.194
	5	.191	5	.200	.948	5	.725
	6	.276	5	.200	.911	5	.473
Gan_21	1	.240	5	.200	.919	5	.524
	2	.211	5	.200	.891	5	.364
	3	.254	5	.200	.904	5	.431
	4	.164	5	.200	.973	5	.895
	5	.253	5	.200	.870	5	.268
	6	.209	5	.200	.941	5	.675
Gan_42	1	.236	5	.200	.863	5	.238
	2	.306	5	.142	.875	5	.289
	3	.232	5	.200	.911	5	.472
	4	.211	5	.200	.892	5	.367
	5	.228	5	.200	.905	5	.438
	6	.222	5	.200	.938	5	.655
Gan_Glo	1	.244	5	.200	.842	5	.169
	2	.111	5	.200	.999	5	1.000
	3	.284	5	.200	.846	5	.183
	4	.283	5	.200	.859	5	.224
	5	.197	5	.200	.946	5	.711
	6	.276	5	.200	.912	5	.480
Cons_21	1	.164	5	.200	.970	5	.878

	2	.233	5	.200 [*]	.957	5	.785
	3	.234	5	.200 [*]	.894	5	.378
	4	.273	5	.200 [*]	.913	5	.483
	5	.239	5	.200 [*]	.899	5	.406
	6	.196	5	.200 [*]	.935	5	.632
Cons_42	1	.321	5	.101	.848	5	.187
	2	.247	5	.200 [*]	.951	5	.746
	3	.306	5	.141	.896	5	.390
	4	.176	5	.200 [*]	.985	5	.961
	5	.217	5	.200 [*]	.907	5	.449
	6	.284	5	.200 [*]	.918	5	.519
Cons_glob	1	.243	5	.200 [*]	.877	5	.298
	2	.187	5	.200 [*]	.980	5	.933
	3	.235	5	.200 [*]	.946	5	.709
	4	.178	5	.200 [*]	.983	5	.950
	5	.205	5	.200 [*]	.890	5	.355
	6	.197	5	.200 [*]	.960	5	.809
IC_21	1	.250	5	.200 [*]	.866	5	.251
	2	.307	5	.139	.863	5	.238
	3	.179	5	.200 [*]	.963	5	.827
	4	.145	5	.200 [*]	.981	5	.938
	5	.193	5	.200 [*]	.931	5	.606
	6	.178	5	.200 [*]	.953	5	.757
IC_42	1	.228	5	.200 [*]	.953	5	.762
	2	.193	5	.200 [*]	.956	5	.783
	3	.350	5	.045	.771	5	.046
	4	.166	5	.200 [*]	.976	5	.910
	5	.230	5	.200 [*]	.963	5	.829
	6	.204	5	.200 [*]	.949	5	.733
IC_glob	1	.302	5	.153	.805	5	.088
	2	.196	5	.200 [*]	.972	5	.889
	3	.320	5	.105	.795	5	.074
	4	.265	5	.200 [*]	.818	5	.112
	5	.212	5	.200 [*]	.950	5	.739
	6	.226	5	.200 [*]	.922	5	.543

Rendimiento en canal y amarilleamiento en canal fría

Tests of Normality

Tratamiento	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.

Ren_%	1	.122	12	.200*	.970	12	.908
	2	.150	12	.200*	.941	12	.515
	3	.243	12	.048	.879	12	.084
	4	.213	12	.137	.915	12	.249
	5	.198	12	.200*	.820	12	.016
	6	.189	12	.200*	.891	12	.121
Pigm_B	1	.138	12	.200*	.928	12	.357
	2	.113	12	.200*	.955	12	.716
	3	.172	12	.200*	.935	12	.438
	4	.187	12	.200*	.941	12	.514
	5	.191	12	.200*	.956	12	.729
	6	.266	12	.019	.876	12	.077

a. Lilliefors Significance Correction

*. This is a lower bound of the true significance.

Análisis Histológico

Duodeno, 21 días de edad

Tests of Normality

Tratamiento		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Lon_vello	1	.261	5	.200*	.900	5	.410
	2	.159	5	.200*	.988	5	.971
	3	.219	5	.200*	.961	5	.813
	4	.270	5	.200*	.877	5	.297
	5	.316	5	.116	.826	5	.130
	6	.225	5	.200*	.899	5	.403
Criptas	1	.160	5	.200*	.977	5	.916
	2	.247	5	.200*	.881	5	.315
	3	.165	5	.200*	.987	5	.969
	4	.175	5	.200*	.954	5	.766
	5	.342	5	.056	.814	5	.106
	6	.211	5	.200*	.940	5	.669
Lam_pro	1	.269	5	.200*	.908	5	.457
	2	.234	5	.200*	.892	5	.365
	3	.260	5	.200*	.878	5	.301
	4	.197	5	.200*	.973	5	.891
	5	.300	5	.161	.879	5	.306
	6	.324	5	.094	.827	5	.133

a. Lilliefors Significance Correction

*. This is a lower bound of the true significance.

Duodeno, 42 días de edad

Tests of Normality

Tratamiento		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Lon_vello	1	.193	5	.200	.979	5	.927
	2	.227	5	.200	.884	5	.328
	3	.292	5	.191	.890	5	.359
	4	.250	5	.200	.882	5	.321
	5	.173	5	.200	.967	5	.857
	6	.198	5	.200	.968	5	.864
Lam_pro	1	.232	5	.200	.911	5	.475
	2	.224	5	.200	.961	5	.812
	3	.252	5	.200	.897	5	.394
	4	.348	5	.047	.778	5	.053
	5	.368	5	.025	.749	5	.029
	6	.224	5	.200	.899	5	.406
Criptas	1	.198	5	.200	.951	5	.744
	2	.233	5	.200	.886	5	.339
	3	.198	5	.200	.944	5	.693
	4	.335	5	.069	.752	5	.031
	5	.230	5	.200	.936	5	.636
	6	.200	5	.200	.933	5	.617

a. Lilliefors Significance Correction

*. This is a lower bound of the true significance.

Yeyuno, 21 días de edad

Tests of Normality

Tratamiento		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Lon_vello	1	.193	5	.200	.930	5	.595
	2	.258	5	.200	.828	5	.135
	3	.188	5	.200	.946	5	.711
	4	.228	5	.200	.886	5	.339
	5	.213	5	.200	.927	5	.574
	6	.234	5	.200	.882	5	.316
Criptas	1	.183	5	.200	.952	5	.752
	2	.340	5	.059	.872	5	.273
	3	.195	5	.200	.959	5	.804
	4	.308	5	.138	.831	5	.141
	5	.243	5	.200	.929	5	.591

	6	.245	5	.200*	.890	5	.356
Lam_pro	1	.175	5	.200*	.971	5	.883
	2	.215	5	.200	.876	5	.293
	3	.189	5	.200	.978	5	.924
	4	.230	5	.200	.918	5	.519
	5	.266	5	.200	.918	5	.516
	6	.193	5	.200*	.972	5	.891

a. Lilliefors Significance Correction

*. This is a lower bound of the true significance.

Yeyuno, día 42

Tests of Normality

	Tratamiento	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Lon_vello	1	.262	5	.200	.902	5	.418
	2	.215	5	.200	.866	5	.249
	3	.255	5	.200	.940	5	.669
	4	.377	5	.019	.768	5	.043
	5	.221	5	.200	.948	5	.723
	6	.283	5	.200	.928	5	.584
Lam_pro	1	.292	5	.188	.814	5	.105
	2	.189	5	.200	.942	5	.683
	3	.300	5	.161	.908	5	.458
	4	.338	5	.063	.823	5	.124
	5	.293	5	.186	.871	5	.272
	6	.240	5	.200	.888	5	.346
Crip	1	.304	5	.147	.789	5	.065
	2	.144	5	.200	.989	5	.977
	3	.170	5	.200	.978	5	.922
	4	.219	5	.200	.891	5	.360
	5	.197	5	.200	.929	5	.590
	6	.342	5	.057	.861	5	.232

a. Lilliefors Significance Correction

*. This is a lower bound of the true significance.

Íleon, día 21

Tests of Normality

	Tratamiento	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Lon_vello	1	.224	5	.200	.881	5	.312
	2	.230	5	.200	.955	5	.774
	3	.249	5	.200	.904	5	.432

	4	.200	5	.200	.948	5	.719
	5	.228	5	.200	.906	5	.444
	6	.152	5	.200	.993	5	.988
Criptas	1	.281	5	.200	.892	5	.367
	2	.222	5	.200	.912	5	.477
	3	.306	5	.141	.794	5	.072
	4	.330	5	.080	.877	5	.298
	5	.218	5	.200	.922	5	.543
	6	.339	5	.062	.720	5	.015
Lam_pro	1	.238	5	.200	.895	5	.384
	2	.202	5	.200	.907	5	.451
	3	.264	5	.200	.916	5	.507
	4	.225	5	.200	.904	5	.432
	5	.210	5	.200	.923	5	.548
	6	.225	5	.200	.915	5	.496

a. Lilliefors Significance Correction

*. This is a lower bound of the true significance.

Íleon, día 42

Tests of Normality

Tratami ento		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Lon_vello	1	.265	5	.200	.832	5	.145
	2	.178	5	.200	.948	5	.722
	3	.229	5	.200	.840	5	.165
	4	.240	5	.200	.842	5	.171
	5	.270	5	.200	.893	5	.372
	6	.239	5	.200	.883	5	.324
Crip	1	.179	5	.200	.975	5	.906
	2	.213	5	.200	.937	5	.644
	3	.188	5	.200	.955	5	.775
	4	.301	5	.158	.853	5	.204
	5	.245	5	.200	.941	5	.676
	6	.186	5	.200	.964	5	.839
Lam_pro	1	.224	5	.200	.925	5	.560
	2	.171	5	.200	.973	5	.894
	3	.233	5	.200	.908	5	.458
	4	.225	5	.200	.944	5	.694
	5	.206	5	.200	.913	5	.489
	6	.299	5	.163	.845	5	.179

a. Lilliefors Significance Correction

*. This is a lower bound of the true significance.

Títulos de anticuerpos a la enfermedad de Newcastle, día 21 de edad

Tests of Normality

Tratamiento	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk			
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.	
21_Log 2	1	.304	5	.149	.817	5	.111
	2	.360	5	.033	.767	5	.042
	3	.300	5	.161	.833	5	.146
	4	.223	6	.200	.908	6	.421
	5	.237	5	.200	.961	5	.814
	6	.367	5	.026	.684	5	.006

a. Lilliefors Significance Correction

*. This is a lower bound of the true significance.

Títulos de anticuerpos a la enfermedad de Newcastle, día 42 de edad

Tests of Normality

Tx	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk			
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.	
42_Log 2	1	.242	11	.071	.824	11	.019
	2	.255	10	.065	.837	10	.041
	3	.308	10	.008	.756	10	.004
	4	.370	10	.000	.686	10	.001
	5	.433	10	.000	.594	10	.000
	6	.254	9	.098	.810	9	.026

a. Lilliefors Significance Correction

IgA secretora, 21 días de edad

Tests of Normality

Tx	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk			
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.	
L405nm_21	1	.242	5	.200	.940	5	.665
	2	.211	5	.200	.898	5	.398
	3	.197	5	.200	.943	5	.685
	4	.270	5	.200	.916	5	.502
	5	.241	5	.200	.821	5	.119
	6	.273	5	.200	.852	5	.201

a. Lilliefors Significance Correction

*. This is a lower bound of the true significance.

IgA secretora, 42 días de edad

Tests of Normality

Tx	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
L405nm_42 1	.167	9	.200 [*]	.952	9	.714
2	.215	10	.200 [*]	.925	10	.398
3	.469	9	.000	.501	9	.000
4	.166	10	.200 [*]	.902	10	.228
5	.250	9	.112	.877	9	.145
6	.289	10	.018	.893	10	.183

a. Lilliefors Significance Correction

*. This is a lower bound of the true significance.

Coliformes totales

Tests of Normality

TX	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
CONTEOS 1	.197	5	.200 [*]	.940	5	.662
2	.292	5	.188	.846	5	.184
3	.273	5	.200 [*]	.935	5	.633
4	.262	5	.200 [*]	.782	5	.058
5	.276	5	.200 [*]	.830	5	.139
6	.349	5	.046	.778	5	.053

a. Lilliefors Significance Correction

*. This is a lower bound of the true significance.

Test Levene para corroborar homocedasticidad

Parámetros productivos

Test of Homogeneity of Variances

Peso_21

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.693	5	24	.175

Test of Homogeneity of Variances

Peso_42

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.252	5	24	.935

Test of Homogeneity of Variances

Gan_21

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.790	5	24	.153

Test of Homogeneity of Variances

Gan_42

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.296	5	24	.911

Test of Homogeneity of Variances

Gan_Glo

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.246	5	24	.938

Test of Homogeneity of Variances

Cons_21

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.256	5	24	.315

Test of Homogeneity of Variances

Cons_42

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.936	5	24	.476

Test of Homogeneity of Variances

Cons_glob

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.945	5	24	.470

Test of Homogeneity of Variances

IC_21

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.977	5	24	.119

Test of Homogeneity of Variances

IC_42

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.904	5	24	.495

Test of Homogeneity of Variances

IC_glob

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.861	5	24	.139

est of Homogeneity of Variances

Ren_%

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.601	5	66	.699

Test of Homogeneity of Variances

Pigm_B

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.537	5	66	.037

Análisis histológico

Duodeno, día 21de edad

Test of Homogeneity of Variances

Lon_vello

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.576	5	24	.053

Test of Homogeneity of Variances

Criptas

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
5.199	5	24	.002

Test of Homogeneity of Variances

Lam_pro

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.128	5	24	.097

Duodeno, día 42 días de edad

Test of Homogeneity of Variances

Lon_vello

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
3.744	5	24	.012

Test of Homogeneity of Variances

Lam_pro

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.472	5	24	.236

Test of Homogeneity of Variances

Criptas

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
3.374	5	24	.019

Yeyuno, 21 días de edad

Test of Homogeneity of Variances

Lam_pro

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
------------------	-----	-----	------

.299	5	24	.909
------	---	----	------

Test of Homogeneity of Variances

Criptas

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.638	5	24	.188

Test of Homogeneity of Variances

Lon_vello

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.318	5	24	.290

Yeyuno, 42 días edad

Test of Homogeneity of Variances

Lon_vello

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.192	5	24	.089

Test of Homogeneity of Variances

Lam_pro

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.632	5	24	.190

Test of Homogeneity of Variances

Crip

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.358	5	24	.872

Íleon, día 21 de edad

Test of Homogeneity of Variances

Lon_vello

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.014	5	24	.113

Test of Homogeneity of Variances

Lam_pro

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
3.088	5	24	.027

Test of Homogeneity of Variances

Criptas

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.357	5	24	.071

Íleon, 42 días de edad

Test of Homogeneity of Variances

Lon_vello

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.956	5	24	.122

Test of Homogeneity of Variances

Lam_pro

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.646	5	24	.186

Test of Homogeneity of Variances

Crip

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.141	5	24	.366

Títulos de anticuerpos a la enfermedad de Newcastle, día 21 y 42 de edad

Test of Homogeneity of Variances

21_Log 2

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.222	5	25	.084

Test of Homogeneity of Variances

42_Log 2

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.951	5	54	.101

IgA secretora, 21 y 42 días de edad

Test of Homogeneity of Variances

L405nm_21

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
15.598	5	24	.000

Test of Homogeneity of Variances

L405nm_42

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
3.940	5	51	.004

Coliformes totales

Levene's Test of Equality of Error Variances^a

Dependent Variable: CONTEOS

F	df1	df2	Sig.
2.477	5	24	.060