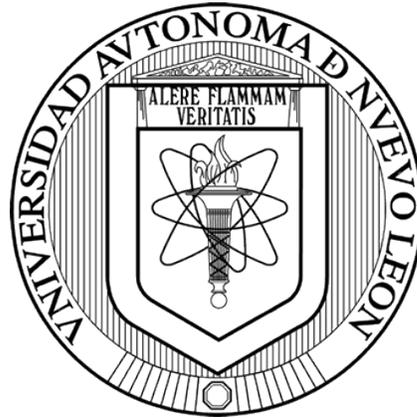


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
POSGRADO CONJUNTO
FACULTAD DE AGRONOMÍA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**



Efecto de la suplementación dietaria de probióticos a base de *Saccharomyces cerevisiae*, y minerales quelatados de cobre, zinc y selenio, sobre la utilización de nutrientes, morfología y composición de la microbiota intestinal en un modelo de codorniz japonesa (*Coturnix japonica*)

TESIS PRESENTADA POR:

M.C. CARLOS ALFREDO GAONA RODRÍGUEZ

Como requisito parcial para obtener el Grado de:

Doctor en Ciencia Animal

Enero de 2025

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
POSGRADO CONJUNTO AGRONOMÍA-VETERINARIA**

Efecto de la suplementación dietaria de probióticos a base de *Saccharomyces cerevisiae*, y minerales quelatados de cobre, zinc y selenio, sobre la utilización de nutrientes, morfología y composición de la microbiota intestinal en un modelo de codorniz japonesa (*Coturnix japonica*)

Aprobación de Tesis por el Comité Particular de:

M.C. Carlos Alfredo Gaona Rodríguez



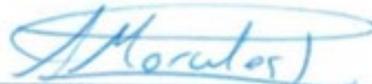
**Dr. Hugo Bernal Barragán
Director de Tesis**



**Dra. Nydia Corina Vásquez Aguilar
Codirectora de Tesis**



**Dr. Jaime Hernández Escareño
Codirector de Tesis**



**Dra. Adriana Morales Trejo
Codirectora de Tesis**



**Dr. Miguel Cervantes Ramírez
Codirector de Tesis**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
POSGRADO CONJUNTO AGRONOMÍA-VETERINARIA**

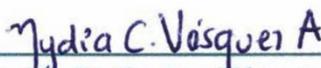
Efecto de la suplementación dietaria de probióticos a base de *Saccharomyces cerevisiae*, y minerales quelatados de cobre, zinc y selenio, sobre la utilización de nutrientes, morfología y composición de la microbiota intestinal en un modelo de codorniz japonesa (*Coturnix japonica*)

Aprobación de Tesis por el Comité Particular de:

M.C. Carlos Alfredo Gaona Rodríguez



Dr. Hugo Bernal Barragán
Director de Tesis



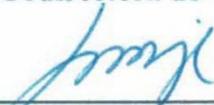
Dra. Nydia Corina Vásquez Aguilar
Codirectora de Tesis



Dr. Jaime Hernández Escareño
Codirector de Tesis



Dra. Adriana Morales Trejo
Codirectora de Tesis



Dr. Miguel Cervantes Ramírez
Codirector de Tesis



Dr. Uziel Castillo Velázquez
Coordinador del Posgrado Conjunto Agronomía - Veterinaria

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Hugo Bernal Barragán, le manifiesto mi profunda gratitud por su generoso tiempo y por compartir sus amplios conocimientos. Su orientación y las experiencias que me permitió vivir durante mis estudios de Doctorado han sido invaluable. Aprecio enormemente su apoyo en los momentos de dificultad, así como la oportunidad y enseñanzas que me ha brindado para crecer como profesional.

A la Dra. Nydia Vásquez Aguilar, por su respaldo académico y todos los momentos buenos que compartimos durante mi formación académica.

Al Dr. Uziel Castillo Velázquez, por su confianza y acompañamiento desde el inicio de mi formación, así como sus consejos, los cuales han sido de gran ayuda.

A la Dra. Adriana Morales Trejo y al Dr. Miguel Cervantes Ramírez por sus amables atenciones y su apoyo académico a lo largo de este proceso, cuya guía y disposición han sido de gran valor para mi formación.

Al Dr. Juan Emmanuel Segura Carmona por el compañerismo y apoyo en las actividades realizadas durante mi doctorado.

A los estudiantes del Servicio Social de la Facultad de Agronomía que me apoyaron en las actividades y por los momentos compartidos.

Al Posgrado Conjunto Agronomía – Veterinaria por el invaluable apoyo y acompañamiento brindado a lo largo de este proceso de formación.

A la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI) por la beca otorgada, la cual fue fundamental para la realización de mis estudios de Doctorado.

A Plasset Ingredients por el respaldo brindado para el desarrollo de esta tesis.

DEDICATORIA

Dedico esta Tesis con profundo amor y gratitud a mis padres. A mi madre, Ana Esmeralda Rodríguez Piñeros, que en paz descansa, cuyo amor y fortaleza siguen iluminando mi camino cada día; su ejemplo de perseverancia y entrega vive en cada uno de mis logros. A mi padre, Carlos Humberto Gaona Cuéllar, un hombre ejemplar que me enseñó la importancia de tener fundamento en cada paso que doy. A ambos les ofrezco este trabajo con cariño y con la alegría de saber que su legado sigue guiando mi vida.

ÍNDICE DE CONTENIDO

| | |
|---|-----------|
| AGRADECIMIENTOS | 1 |
| DEDICATORIA | 2 |
| ÍNDICE DE CONTENIDO | 3 |
| ÍNDICE DE CUADROS | 6 |
| ÍNDICE DE FIGURAS | 8 |
| LISTADO DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS | 9 |
| RESUMEN | 10 |
| I. INTRODUCCIÓN | 13 |
| II. LITERATURA REVISADA | 15 |
| 2.1. La codorniz japonesa (<i>Coturnix japonica</i>) | 15 |
| 2.2. Histomorfología del intestino delgado de la codorniz japonesa | 15 |
| 2.3. Microbiota intestinal (MI) | 16 |
| 2.4. La levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 17 |
| 2.5. Investigación de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en la nutrición de aves de corral | 18 |
| 2.6. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como probiótico | 19 |
| 2.7. Minerales quelatados: concepto | 20 |
| 2.8. Papel activo de cobre, zinc y selenio en la nutrición aviar | 20 |
| 2.9. Características de los minerales quelatados | 21 |
| 2.10. Minerales quelatados de cobre, zinc y selenio en la nutrición de aves | 21 |
| III. JUSTIFICACIÓN | 23 |
| IV. HIPÓTESIS | 24 |
| V. OBJETIVOS | 24 |
| 5.1. Objetivo general | 24 |
| 5.2. Objetivos específicos | 24 |
| VI. EXPERIMENTO 1. EVALUACIÓN DEL EFECTO DE | 25 |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> SOBRE CODORNICES EN CRECIMIENTO | |
| 6.1. Objetivo | 25 |
| 6.2. Materiales y métodos | 25 |
| 6.2.1. Ubicación y manejo general de las codornices | 25 |
| 6.2.2. Diseño experimental | 25 |

| | |
|---|-----------|
| 6.2.3. Análisis proximal de dietas y excretas | 28 |
| 6.2.4. Determinación del rendimiento productivo | 29 |
| 6.2.5. Determinación de la tasa de utilización de nutrientes y energía | 30 |
| 6.2.6. Análisis de histomorfología intestinal | 30 |
| 6.2.7. Análisis estadístico | 32 |
| 6.2.8. Consideraciones éticas | 32 |
| 6.3. Resultados | 32 |
| 6.3.1. Rendimiento productivo | 32 |
| 6.3.2. Tasa de utilización de nutrientes y energía | 33 |
| 6.3.3. Histomorfología intestinal | 34 |
| 6.4. Discusión | 37 |
| 6.5. Conclusiones del Experimento 1 | 40 |
| VII. EXPERIMENTO 2. EFECTO DE LA SUSTITUCIÓN DE | 41 |
| MINERALES INORGÁNICOS DE COBRE, ZINC Y SELENIO, POR SUS | |
| FORMAS QUELATADAS, EN LA DIETA DE CODORNICES EN | |
| CRECIMIENTO | |
| 7.1. Objetivo | 41 |
| 7.2. Materiales y métodos | 41 |
| 7.2.1. Ubicación y diseño experimental | 41 |
| 7.2.2. Determinación del rendimiento productivo | 44 |
| 7.2.3. Determinación de la tasa de utilización de nutrientes, energía y minerales trazas | 44 |
| 7.2.4. Análisis morfológico de tibias | 44 |
| 7.2.5. Cuantificación de minerales traza | 45 |
| 7.2.6. Análisis de histomorfología intestinal | 46 |
| 7.2.7. Consideraciones éticas | 46 |
| 7.2.8. Análisis estadístico. | 46 |
| 7.3. Resultados | 47 |
| 7.3.1. Rendimiento productivo | 47 |
| 7.3.2. Tasa de utilización de nutrientes, energía y minerales traza | 48 |
| 7.3.3. Morfología de tibias | 49 |

| | |
|--|-----------|
| 7.3.4. Histomorfología intestinal | 49 |
| 7.3.5. Efectos sobre las variables histomorfológicas en aves grandes | 50 |
| 7.3.6. Efectos sobre las variables histomorfológicas en aves pequeñas | 51 |
| 7.4. Discusión | 53 |
| 7.5. Conclusiones Experimento 2 | 57 |
| VIII. EXPERIMENTO 3. EFECTO COMBINADO DE LA INCLUSIÓN DE LEVADURA <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Y LA SUSTITUCIÓN DE MINERALES INORGÁNICOS DE COBRE, ZINC Y SELENIO POR SUS FORMAS QUELATADAS EN LA DIETA DE CODORNICES EN CRECIMIENTO | 59 |
| 8.1. Objetivo | 59 |
| 8.2. Materiales y métodos | 59 |
| 8.2.1. Ubicación y diseño experimental | 59 |
| 8.2.2. Determinación del rendimiento productivo | 60 |
| 8.2.3. Análisis morfológico de tibias | 60 |
| 8.2.4. Cuantificación de abundancia relativa de géneros en microbiota intestinal | 63 |
| 8.2.4.1. Obtención de muestras de contenido de los ciegos | 63 |
| 8.2.4.2. Extracción y purificación de ADN de muestras de contenido cecal | 63 |
| 8.2.4.3. Determinación de concentración y dilución de ADN genómico | 64 |
| 8.2.4.4. Cuantificación de la abundancia relativa en microbiota intestinal por qPCR | 65 |
| 8.2.5. Consideraciones éticas | 67 |
| 8.2.6. Análisis estadístico. | 67 |
| 8.3. Resultados | 68 |
| 8.3.1. Rendimiento productivo | 68 |
| 8.3.2. Morfología de tibias | 71 |
| 8.3.3. Abundancia relativa de microorganismos en microbiota intestinal | 72 |
| 8.4. Discusión | 74 |
| 8.5. Conclusiones Experimento 3 | 80 |
| IX. CONCLUSIONES | 81 |
| X. BIBLIOGRAFÍA | 82 |

ÍNDICE DE CUADROS

| | | |
|-------------------|---|-----------|
| Cuadro 1. | Principales taxones que colonizan el TGI en aves de producción | 17 |
| Cuadro 2. | Alimento balanceado para crecimiento de codornices con adición de 0, 0.15, 0.30 y 0.45% (en base materia seca) de levadura <i>S. cerevisiae</i> . | 26 |
| Cuadro 3. | Desempeño de crecimiento y tasa de viabilidad (n = 5 repeticiones por tratamiento) de codornices alimentadas con 0, 0.15, 0.30 y 0.45% de levadura <i>S. cerevisiae</i> en base seca. | 33 |
| Cuadro 4. | Tasa de utilización de MS, proteína y energía en codornices japonesas en fase de crecimiento. | 34 |
| Cuadro 5. | Efecto de la suplementación con levadura activa (<i>S. cerevisiae</i>) sobre la morfología intestinal de codornices en diferentes cortes del intestino delgado. | 36 |
| Cuadro 6. | Dietas ofrecidas en etapa de inicio (10 – 24 d de edad) y desarrollo (25 a 39 d de edad), con sustitución del 0, 33, 67 y 100% de cobre, zinc y selenio inorgánicos por su fuente orgánica. | 43 |
| Cuadro 7. | Rendimiento productivo de codornices en crecimiento alimentadas con diferentes niveles de sustitución cobre, zinc y selenio inorgánico por orgánicos. | 47 |
| Cuadro 8. | Tasa de utilización de nutrientes, energía y minerales trazas de codornices en crecimiento alimentadas con diferentes niveles de sustitución cobre, zinc y selenio inorgánico por orgánicos. | 48 |
| Cuadro 9. | Resultados de morfología de tibias de codornices en crecimiento alimentadas con diferentes niveles de sustitución cobre, zinc y selenio inorgánico por orgánicos. | 49 |
| Cuadro 10. | Resultados de mediciones histológicas de codornices de tamaño grande (Bloques 3 y 4) alimentadas con dietas en las que se sustituyeron 0, 33, 67 y 100% de minerales de Cu, Zn y Se inorgánicos por minerales quelatados. | 51 |

| | | |
|-------------------|--|-----------|
| Cuadro 11. | Resultados de mediciones histológicas de codornices de tamaño pequeñas (Bloques 1 y 2) alimentadas con dietas en las que se sustituyeron 0, 33, 67 y 100% de minerales de Cu, Zn y Se inorgánicos por minerales quelatados. | 52 |
| Cuadro 12. | Dietas experimentales en la etapa de Iniciación (10-24 días de edad) de codornices en crecimiento. | 61 |
| Cuadro 13. | Dietas experimentales en la etapa de Desarrollo (25-39 días de edad) de codornices en crecimiento. | 62 |
| Cuadro 14. | Secuencias de oligonucleótidos utilizados para el análisis de abundancia relativa de microorganismos en contenido intestinal de codornices en crecimiento. | 66 |
| Cuadro 15. | Conformación de los controles negativos. | 67 |
| Cuadro 16. | Rendimiento productivo promedio y desviación estándar (SD) de codornices en crecimiento en cada tratamiento. | 69 |
| Cuadro 17. | Rendimiento productivo relativo al promedio del bloque correspondiente, de codornices alimentadas con una sustitución de minerales inorgánicos de Cu, Zn, y Se y la suplementación con levadura <i>S. cerevisiae</i> en la dieta de codornices en crecimiento. | 70 |
| Cuadro 18. | Morfología de la tibia de codornices en crecimiento. | 72 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | | |
|------------------|---|-----------|
| Figura 1. | Producto comercial líquido PlassYeast®, levadura activa <i>Saccharomyces cerevisiae</i> con 1.4×10^9 UFC/mL, Plasset Ingredients. | 27 |
| Figura 2. | Baterías de crianza equipadas para investigación en codornices. | 27 |
| Figura 3. | Criterios de medición de características de histomorfología intestinal. Microfotografía de la mucosa duodenal teñida con H&E, objetivo 10X. | 31 |
| Figura 4. | Valores promedio de altura de vellosidad, ancho de vellosidad y profundidad de la cripta por sección de intestino delgado. Microfotografías con tinción H&E, objetivo 10X. | 35 |
| Figura 5. | Presentación de las formas inorgánicas y orgánicas de los minerales de cobre, zinc y selenio utilizadas en experimentación. | 42 |
| Figura 6. | Medición de las características de morfología de la tibia. | 45 |
| Figura 7. | Determinación de concentración y dilución de ADN genómico. | 64 |
| Figura 8. | Tasa de viabilidad de codornices en crecimiento de Experimento 3. n = 25 | 71 |
| Figura 9. | Abundancia relativa de ADN de los microorganismos objetivo en muestras de contenido cecal de codornices en respuesta al factor minerales quelatados y el factor levadura <i>S. cerevisiae</i> . | 73 |

LISTADO DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

| | | | |
|-------------|--|------------|---------------------------------|
| cm | Centímetros | Mín | Mínimo |
| Cq | Cycle quantification | N | Nitrógeno |
| Ct | Cycle threshold | PC | Proteína cruda |
| SD | Desviación estándar | RPM | Revoluciones por minuto |
| DEPC | Diethylpyrocarbonate | Sc | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> |
| EEM | Error estándar de la media | UI | Unidades internacionales |
| FDA | Fibra detergente ácido | PC | Proteína cruda |
| FDN | Fibra detergente neutro | UFC | Unidades formadoras de colonia |
| GDP | Ganancia de peso diario | | |
| °C | Grados centígrados | | |
| g | Gramos | | |
| h | Horas | | |
| kcal | Kilocalorías | | |
| kg | Kilogramo | | |
| LSC | Levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | | |
| MS | Materia seca | | |
| Máx | Máximo | | |
| µl | microlitro | | |
| µm | Micrómetro | | |
| mg | Miligramos | | |
| MQ | Minerales quelatados | | |

RESUMEN

La presente investigación fue realizada con el fin de generar nuevos conocimientos que permitan mejorar la nutrición de aves en crecimiento, a partir de la aplicación de nuevos productos biotecnológicos, específicamente probióticos y minerales traza quelatados. Se establecieron tres experimentos con la finalidad de determinar el efecto que cada uno de los dos productos biotecnológicos evaluados, así como la combinación de ambos, podrían tener sobre los parámetros biológicos de crecimiento (peso de las aves, aumento diario de peso, consumo de alimento y eficiencia alimenticia).

También se determinó el efecto de los tratamientos aplicados sobre aspectos de mejora de la salud de los animales en crecimiento. En este sentido se midió el efecto de los tratamientos aplicados sobre las vellosidades intestinales, sobre la formación ósea, y sobre la microbiota intestinal.

El primero de los tres experimentos evaluó el efecto de incluir diferentes niveles de la levadura viva *Saccharomyces cerevisiae*, específicamente 0.15, 0.30 y 0.45% (base materia seca), a la dieta para crecimiento de codornices japonesas, para evaluar cambios en la tasa de utilización de energía y nutrientes, así como en la eficiencia productiva. Se utilizaron 155 codornices japonesas de 15 días de edad, divididas en cuatro grupos. El primer grupo (T1) no recibió levadura actuó como control, mientras que los grupos Trat2, Trat3 y Trat4 recibieron suplementos de 0.15, 0.30 y 0.45% de levadura, respectivamente. Cada tratamiento se replicó en cuatro jaulas, con 7 a 8 codornices por jaula. Se midieron variables como el peso corporal de las aves, la ganancia diaria de peso, el consumo de la dieta (g/ave/día), la eficiencia alimenticia y la viabilidad. Los datos se analizaron mediante análisis de varianza, encontrándose que al incluir 0.45% de levadura mejoró significativamente el consumo de alimento, la supervivencia y la eficiencia en la utilización de proteína, y variables histomorfológicas. Sin embargo, no modificó el peso, la conversión alimenticia ni el aumento diario de peso de las codornices.

El segundo experimento evaluó el impacto de reemplazar cobre, zinc y selenio inorgánicos por orgánicos en dietas de codornices japonesas en crecimiento. Se utilizó un diseño de bloques al azar con 150 codornices divididas en cuatro grupos, con diferentes niveles de sustitución de minerales (0%, 33%, 67% y 100%). Los resultados mostraron que el tratamiento con 67% de sustitución (T3) mejoró significativamente el peso vivo, la ganancia diaria de peso (GDP) y la viabilidad de las codornices, aunque no hubo diferencias en el consumo de alimento ni en la eficiencia alimenticia. T3 también mostró una mayor utilización del cobre y el hierro. El peso de las tibias fue mayor con un 33% de sustitución (T2) y un 67% mejoró la histomorfología intestinal.

El tercer experimento evaluó de manera conjunta la suplementación con *Saccharomyces cerevisiae* y minerales quelatados de cobre, zinc y selenio, en el que se utilizaron un total de 179 codornices japonesas, estas aves fueron asignadas a 4 tratamientos, con 5 repeticiones por tratamiento, cada repetición fue conformada por entre 8-9 aves. Los resultados mostraron efectos generalmente positivos en el rendimiento productivo de las codornices en crecimiento. *Saccharomyces cerevisiae* destacó por favorecer el crecimiento y el desarrollo óseo, mientras que el cobre, zinc y selenio quelatados tuvo un impacto significativo en la ganancia de peso. Ambos factores mantuvieron una excelente viabilidad de las aves y, cuando se combinaron, promovieron un aumento en la abundancia relativa de especies benéficas de la microbiota intestinal, como *Lactobacillus spp.* y *Bifidobacterium spp.*

La información generada en la presente investigación permite vislumbrar las posibilidades que tiene la nutrición animal con la aplicación de novedosos productos biotecnológicos para contribuir al incremento de la producción de alimentos que se requieren para satisfacer la demanda de alimentos para la creciente población en los siguientes 40 años de este siglo XXI. La mejora de los datos productivos contribuye también a mejorar la economía de su producción.

También se generaron conocimientos que detallan la importancia de la nutrición animal para mejorar el estado de salud y el bienestar animal de las aves que son criadas para

producir los alimentos que la sociedad humana requiere, los cuales deben ser de alta calidad nutricional, con buenos índices de calidad organoléptica y libres de residuos de sustancias (ej. antibióticos, toxinas, componentes proinflamatorios, etc.) que pudieran ser perjudiciales para los consumidores.

El componente ambiental también fue considerado en la presente investigación, al determinar la eficiencia de utilización de los nutrientes de la dieta por efecto de la aplicación de los productos biotecnológicos evaluados, ya que es muy importante que la nutrición animal contribuya a mejorar la utilización de los alimentos ofrecidos a los animales, y al mismo tiempo es importante contribuir a reducir la excreción de nutrientes por heces y orina, a partir de mejorar la utilización de los mismos en el metabolismo animal.

I. INTRODUCCIÓN

La implementación de estrategias que mejoren la nutrición y el bienestar animal es fundamental para lograr un crecimiento saludable en los animales, asegurando que los subproductos obtenidos sean de la más alta calidad y reduciendo el impacto ambiental de los sistemas productivos pecuarios. Diversos estudios han identificado a los probióticos como una alternativa biológica y económica para reemplazar los antibióticos utilizados como promotores de crecimiento, contribuyendo a la seguridad alimentaria y disminuyendo el riesgo de desarrollo de resistencia a los antimicrobianos (Gutiérrez-Ramírez *et al.*, 2013; Venkatesh *et al.*, 2024).

En particular, los probióticos basados en levadura han despertado un creciente interés, ya que su inclusión en la dieta podría mejorar la salud intestinal y la eficiencia en la conversión de nutrientes en carne o huevo (Anee *et al.*, 2021). La industria avícola moderna enfrenta desafíos significativos, especialmente en sistemas de cría intensiva, donde el estrés puede alterar la microbiota intestinal, facilitando la colonización por enteropatógenos (Kabir, 2009; Venkatesh *et al.*, 2024). En este contexto, las estrategias nutricionales son clave para optimizar tanto el rendimiento productivo como la salud de las aves, mientras se promueven prácticas más sostenibles y respetuosas con el bienestar animal (Englmaierová *et al.*, 2021).

De igual manera, la suplementación con minerales traza de cobre, zinc y selenio inorgánicos ha sido ampliamente investigada debido a su importancia en procesos fisiológicos críticos, como el crecimiento, la reproducción, la integridad ósea y la función inmunológica (Goff, 2018). Tradicionalmente, estos minerales se han administrado en las formas de óxidos, sulfatos o cloruros, que presentan baja biodisponibilidad y tienden a formar complejos insolubles en el tracto gastrointestinal, limitando su absorción. Para superar estas limitaciones, se han propuesto fuentes orgánicas de minerales, como quelatos, que han sido descritos como más biodisponibles y estabilidad digestiva (Świątkiewicz *et al.*, 2014; Goff, 2018).

Dada estas consideraciones, se genera una razón de peso para diseñar un experimento que evalúe los efectos de la inclusión de probióticos basados en *Saccharomyces cerevisiae* y minerales traza quelatados de cobre, zinc y selenio en la nutrición de las aves y sus potenciales beneficios en el crecimiento y salud de las codornices.

II. LITERATURA REVISADA

2.1. La codorniz japonesa (*Coturnix japonica*)

Los polluelos de codorniz japonesa pesan de 6 a 8 g al nacer, y su plumaje inicial es de color marrón claro en el dorso y las alas, con rayas marrón oscuro en la parte trasera. Entre las 3 y 4 semanas de edad comienzan a desarrollar las plumas juveniles, mientras que las plumas definitivas suelen aparecer alrededor de las 6 semanas. La pigmentación de las plumas varía según la variedad y el género, permitiendo la determinación del sexo a partir de las 2 o 3 semanas de edad (Cheng *et al.*, 2010).

La codorniz japonesa ha ganado un creciente interés en la industria avícola debido a su resistencia a patógenos y su destacada producción de huevos y carne, contribuyendo a la nutrición humana. Además, se ha convertido en un modelo animal valioso para la investigación científica (Vahdatpour *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2016).

2.2. Histomorfología del intestino delgado de la codorniz japonesa

La estructura histológica del intestino delgado está compuesta por cuatro capas principales: la serosa, la muscularis externa, la submucosa y la mucosa. La mucosa forma vellosidades que se proyectan hacia la luz intestinal. La capa muscular externa incluye dos capas: una capa muscular circular interna, más gruesa, y una capa muscular longitudinal externa, mucho más delgada (Yamauchi, 2002).

La mucosa alberga numerosas criptas de Lieberkühn, que contienen células de Paneth, y placas de Peyer dispersas intermitentemente en la lámina propia. Las vellosidades están revestidas por un epitelio cilíndrico simple con células caliciformes (CC) distribuidas a lo largo del revestimiento epitelial (Nasrin *et al.*, 2012).

El duodeno es el principal sitio de la digestión química. La altura de las vellosidades y la profundidad de las criptas son máximas en esta región y disminuyen progresivamente

hacia el yeyuno, alcanzando sus valores más bajos en el íleon. En el yeyuno, donde comienza una absorción significativa de nutrientes, la capa muscular externa es más delgada en comparación con el duodeno, y la capa muscular longitudinal externa es apenas distinguible en algunas áreas. La densidad de las células caliciformes aumenta en comparación con el duodeno (Wilkinson *et al.*, 2018).

El íleon, siendo el sitio final de la absorción de nutrientes, comparte características con el yeyuno, aunque presenta un mayor grosor de las vellosidades y criptas más definidas. Similar al yeyuno, la capa muscular externa del íleon es más delgada que en el duodeno, con una musculatura circular y longitudinal bien definida (Wilkinson *et al.*, 2018).

2.3. Microbiota intestinal (MI)

El tubo gastrointestinal (TGI) de las aves alberga una amplia variedad de microorganismos como bacterias, hongos, protozoos y virus, los cuales mantienen una interacción constante con sus hospederos. La microbiota intestinal (MI) de las aves comienza a formarse y desarrollarse desde el primer día de vida del polluelo, influenciado por los microorganismos presentes en el intestino de la madre y por factores externos como la dieta, el ambiente y la manipulación. Estos factores externos juegan un papel crucial en la configuración de la MI (Rinttilä y Apajalahti, 2013).

Se estima que el número de células bacterianas en el TGI de las aves supera en una proporción de aproximadamente 10:1 al de las células del propio ave. En el TGI de las aves de corral se encuentran alrededor de 640 especies bacterianas, que pertenecen a 140 géneros diferentes. Estas bacterias muestran variaciones en su abundancia y diversidad a lo largo del tracto digestivo (Cuadro 1, Gil de los Santos *et al.*, 2005).

Teniendo en cuenta lo anterior, se ha señalado que la microbiota intestinal no debe analizarse únicamente en términos de especies microbianas individuales, sino como comunidades interactivas capaces de promover o inhibir el crecimiento de otras cepas. De esta

manera, las comunidades bacterianas, formadas por organismos beneficiosos, trabajan en colaboración con el huésped para promover una mejor salud (Rinttilä y Apajalahti, 2013).

El análisis de la microbiota intestinal en aves se ha llevado a cabo principalmente mediante métodos basados en cultivos, los cuales han sido útiles para la identificación y el análisis de grupos específicos de bacterias (Sun *et al.*, 2013; Stanley *et al.*, 2013; Yadav y Jha, 2019). En los últimos años, la investigación de la microbiota intestinal ha sido complementada con el uso de técnicas de biología molecular, lo que ha permitido una comprensión más profunda y detallada de su composición y funciones (Kim *et al.*, 2022; Chen *et al.*, 2023).

Cuadro 1. Principales taxones que colonizan el TGI en aves de producción.

| Porción del TGI | Filos dominantes | Géneros dominantes |
|---|-----------------------|---|
| Proventrículo y molleja | <i>Firmicutes</i> | <i>Lactobacillus spp.</i> |
| Intestino delgado (duodeno, yeyuno e íleon) | <i>Firmicutes</i> | <i>Lactobacillus spp.</i> , <i>Enterococcus spp.</i> <i>Clostridium spp.</i> |
| | <i>Proteobacteria</i> | <i>Escherichia spp.</i> , <i>Helicobacter spp.</i> , <i>Salmonella spp.</i> |
| Intestino grueso (colon y ciegos) | <i>Firmicutes</i> | <i>Lactobacillus spp.</i> , <i>Enterococcus spp.</i> , <i>Clostridium spp.</i> |
| | <i>Bacteroidetes</i> | <i>Bacteroides spp.</i> |
| | <i>Actinobacteria</i> | <i>Bifidobacterium spp.</i> |
| | <i>Proteobacteria</i> | <i>Escherichia spp.</i> , <i>Helicobacter spp.</i> , <i>Salmonella spp.</i> |

Elaborado con datos de Rychlik, (2020) y Śliżewska *et al.* (2020).

2.4. La levadura *Saccharomyces cerevisiae*

La palabra "levadura" agrupa a una variedad de organismos unicelulares, cuyas células suelen ser ovaladas, aunque también pueden presentar otras formas. Estos organismos se

reproducen por fisión binaria o gemación, y algunos tienen la capacidad de adoptar formas dimórficas o bifásicas, desarrollando estructuras miceliales bajo condiciones ambientales específicas (Suárez-Machín *et al.*, 2016).

Saccharomyces cerevisiae, una levadura ampliamente reconocida por su contribución al desarrollo y bienestar humano es uno de los probióticos más utilizados. Su eficacia se debe a sus propiedades fisicoquímicas, que le permiten establecer una relación simbiótica con la microbiota intestinal del huésped. Por esta razón, su inclusión en la alimentación de aves de producción como probiótico se considera una estrategia efectiva para reducir el riesgo de trastornos intestinales (Díaz *et al.*, 2017).

Una de las definiciones más aceptadas de "probiótico" es la propuesta por la FAO (2001), que describe a estos como "microorganismos vivos que, administrados en cantidades adecuadas, aportan beneficios a la salud del huésped". En este contexto, las cepas nativas de *Saccharomyces cerevisiae* cumplen con los criterios establecidos por Fuller (1992) para ser consideradas probióticos, que incluyen la capacidad de sobrevivir a diferentes niveles de pH, resistir las sales biliares y mantener un crecimiento celular óptimo a 37°C, lo que les permite ofrecer beneficios significativos al huésped (Hamilton, 1996).

2.5. Investigación de *Saccharomyces cerevisiae* en la nutrición de aves de corral

Diversas investigaciones han explorado los beneficios de suplementar las dietas para aves con esta levadura, resaltando su capacidad para mejorar parámetros productivos, salud intestinal y resistencia a enfermedades entre otras características, que resultan esenciales para el bienestar general y el desempeño óptimo de las aves.

En el trabajo de Ghosh *et al.* (2012), observaron efectos positivos al suplementar con pared celular de *Saccharomyces cerevisiae* hidrolizada, en la histomorfología intestinal de pollos de engorda y en la presencia de células caliciformes en el intestino. Wang *et al.* (2017) investigaron el efecto de *Saccharomyces cerevisiae* sobre la estructura del intestino de pollos de engorda expuestos a un lipopolisacárido, reportaron que un 0.5% de este

probiótico aumentó la altura de vellosidad y redujo la profundidad de la criptas en el yeyuno e íleon, lo cual es un indicativo de una eficaz respuesta ante este desafío.

Roy y Ray (2023) evaluaron el efecto de *Saccharomyces cerevisiae* como alternativa a los antibióticos promotores de crecimiento en pollos Cobb 500. Reportaron que en el grupo suplementado con *S. cerevisiae* (20 g/100 kg de alimento), aumentó la altura de vellosidad y se redujo la profundidad de la cripta en duodeno e íleon en comparación con el grupo con antibióticos promotores del crecimiento y grupo control.

Soren *et al.* (2024) reportaron un aumento en la altura de las vellosidades y una reducción en la profundidad de las criptas en las tres secciones del intestino delgado de pollos de engorda suplementados con postbióticos de *Saccharomyces cerevisiae* (1.25 g/kg de alimento) comparado con las aves del grupo testigo.

Vahdatpour *et al.* (2011) observaron que las codornices japonesas alimentadas con dietas que incluían *Saccharomyces cerevisiae* mostraron un mejor rendimiento en su crecimiento y en los niveles de hormonas relacionadas con el crecimiento. Tomaszewska *et al.* (2018) descubrieron que la incorporación de levadura inactivada a razón de 15 g/kg de dieta en codornices japonesas resultaba en el mejoramiento características de la histomorfología intestinal.

2.6. *Saccharomyces cerevisiae* como probiótico

Indiscutiblemente, la mayoría de las investigaciones muestran resultados positivos en la histomorfología cuando se incorpora *Saccharomyces cerevisiae* como probiótico en la dieta. Sin embargo, aunque son minoría, existen estudios que no concuerdan con estos hallazgos. Además, la escasa información sobre el impacto de esta levadura en el rendimiento productivo y en la microbiota intestinal de las codornices sugiere una necesidad significativa de investigación. Esto subraya el creciente interés en explorar estos efectos utilizando la codorniz japonesa como modelo de estudio.

2.7. Minerales quelatados: concepto

Los minerales quelatados consisten en complejos estables donde un ion metálico se une de forma covalente a una molécula orgánica, como un aminoácido, un ácido graso o un carbohidrato (Byrne y Murphy, 2022). El uso de minerales orgánicos o quelatados se ha propuesto como una alternativa a las fuentes inorgánicas (Yaqoob *et al.*, 2020). Según una revisión reciente (Elnesr *et al.*, 2024), los minerales orgánicos presentan una mayor biodisponibilidad y capacidad de absorción, atribuida a su menor antagonismo y a un mecanismo de absorción más eficiente. Esto puede traducirse en mejoras en el rendimiento productivo, la tasa de utilización de nutrientes y energía, y la salud ósea, la cual se ha evaluado mediante parámetros de morfología ósea, como el aumento en peso, longitud y ancho del hueso, características que favorecen una mayor rigidez y estabilidad del esqueleto en las extremidades, aspectos fundamentales para el crecimiento y bienestar de las aves (Harash *et al.*, 2020).

2.8. Papel activo de cobre, zinc y selenio en la nutrición aviar

El cobre, el zinc y el selenio son tres minerales traza que se consideran esenciales debido a que su deficiencia o exceso en el organismo puede provocar enfermedades graves e incluso la muerte.

El cobre desempeña un papel crucial en varias actividades fisiológicas de las aves, incluido el metabolismo del hierro y la hematopoyesis, facilitando la absorción de hierro por los enterocitos y siendo esencial para la ceruloplasmina, que transporta hierro a los reticulocitos que producen hemoglobina. También participa en el transporte de electrones durante la respiración aeróbica, y en la formación de colágeno y elastina en huesos y tejidos conjuntivos, entre otras funciones (Goff, 2018).

El zinc es fundamental para las aves, actuando como cofactor en diversas reacciones enzimáticas y participando en la síntesis proteica, de carbohidratos y en el metabolismo energético, así como en diversas reacciones bioquímicas. En aves de postura, el Zn es

crucial como componente de la anhidrasa carbónica, una enzima esencial para la formación de la cáscara del huevo y la calcificación ósea a partir de iones de carbonato (Salim *et al.*, 2008; Darvishi *et al.*, 2020).

Así mismo, el selenio es un elemento vital para las aves, y aunque sus requerimientos son bajos, su deficiencia puede causar graves problemas de salud. Entre sus funciones más importantes se encuentran el mantenimiento de un estado antioxidante óptimo, así como roles críticos en reproducción, producción y función inmunológica (Shouzhen *et al.*, 2015; Dalgaard *et al.*, 2018).

Las formas más comunes de suplementar Cu, Zn y Se en las dietas avícolas son las inorgánicas, incluyendo sulfatos, óxidos, carbonatos y cloruros en el pienso. El uso intensivo de minerales en las formas mencionadas puede reducir su biodisponibilidad y puede causar contaminación ambiental debido al aumento de la excreción de minerales (Aksu *et al.*, 2010).

2.9. Características de los minerales quelatados

Los minerales quelatados son moléculas resultantes de un enlace covalente entre iones metálicos y un ligando como proteínas o carbohidratos (Venglovska *et al.*, 2014). Los minerales quelatados pueden ser: complejos metálicos, complejos de aminoácidos metálicos, quelatos de aminoácidos metálicos, proteínatos metálicos, complejos de polisacáridos metálicos, propionatos metálicos y complejos derivados de levadura como *Saccharomyces cerevisiae* (Darvishi *et al.*, 2020; Mona *et al.*, 2015). Utilizar minerales quelatados en general da como resultado una mejor absorción intestinal, asociada con las pequeñas moléculas orgánicas y la reducción de la combinación de complejos insolubles con oligoelementos iónicos (Nollet *et al.*, 2007; Peric *et al.*, 2007).

2.10. Minerales quelatados de cobre, zinc y selenio en la nutrición de aves

Diversos estudios han explorado las ventajas de estas formas quelatadas en distintas especies avícolas, revelando resultados que apuntan hacia un potencial superior en

comparación con los minerales inorgánicos tradicionales. Abdallah *et al.* (2009) observó que los pollitos de engorda (broiler) alimentados con dietas que contenían un 100% de minerales orgánicos (Zn, Cu, Mn y Fe) tenían un peso corporal significativamente mayor y una mejor conversión alimenticia respecto a la observada en las aves alimentadas con minerales inorgánicos.

Darvishi *et al.* (2020) investigaron el efecto de fuentes inorgánicas y orgánicas de Zn y Mn en el rendimiento y características de calidad del huevo en gallinas ponedoras, estos autores destacan que las fuentes orgánicas de Zn y Mn mostraron una mayor biodisponibilidad en comparación con sus fuentes inorgánicas. Cruz y Fernández, (2011) investigaron el efecto que Se y Zn de fuentes orgánicas tienen sobre la producción y calidad del huevo de codornices japonesas, quienes reportaron que no se hallaron diferencias en el consumo, eficiencia alimenticia, tasas de mortalidad y distintas características de calidad del huevo con menor cantidad de minerales quelatados.

El estudio de Shouzhen *et al.* (2015) investigó los efectos del selenio orgánico utilizado como antioxidante frente a la exposición a *Clostridium perfringens* a 14 días de edad, y encontraron que la adición de este microelemento mejoró el rendimiento productivo y la integridad del intestino, facilitando un mejor aprovechamiento de nutrientes y una respuesta inmunológica más robusta en pollos de engorde. Ghada, (2019) reportó que la suplementación de las dietas del grupo de codornices japonesas con quelatos de Mn y Zn tuvo una gran influencia en el rendimiento, el crecimiento, el perfil sanguíneo y las características de la canal y mejoró la respuesta inmune.

Por otra parte, Ray *et al.* (2014) evaluaron el desempeño de la codorniz japonesa con minerales orgánicos (Cu, Zn y Mn) mediante la sustitución de fuentes inorgánicas, quienes encontraron que la mayoría de los metabolitos séricos analizados, así como los rasgos distintivos de la canal, y el peso de los tejidos linfoides no difirió.

III. JUSTIFICACIÓN

Al presente, existe un progresivo interés en explorar los prometedores beneficios de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y minerales quelatados de cobre, zinc y selenio. Este interés está íntimamente ligado a la necesidad de desarrollar fórmulas nutricionales eficaces que no solo mejoren los parámetros productivos y el bienestar animal, sino que también reduzcan la contaminación ambiental y los costos asociados al desaprovechamiento de nutrientes en aves de producción. Esta tendencia ha fomentado la acumulación de conocimientos sobre el uso de estos ingredientes, principalmente en pollos de engorde y otras aves de corral.

Sin embargo, es necesario generar más información de los procesos fisiológicos modificados por estos ingredientes-nutrientes en codornices japonesas, una especie promisoriosa y de gran potencial productivo de carne y huevo, la cual ha destacado como modelo de investigación dentro de la industria avícola.

La evaluación de la adición *Saccharomyces cerevisiae* y los quelatos de minerales de cobre, zinc y selenio de forma individual y combinada en codornices japonesas en crecimiento sobre la eficiencia productiva, la tasa de utilización de nutrientes y energía, la histomorfología intestinal y la abundancia relativa en la microbiota intestinal proporcionará un mejor entendimiento de los efectos nutricionales que serán clave en la lucha constante por una mayor eficiencia y bienestar de los sistemas avícolas y pecuarios.

IV. HIPÓTESIS

Los probióticos a base de *Saccharomyces cerevisiae*, y los minerales quelatados de cobre, zinc y selenio integrados a la dieta de codornices japonesas en crecimiento de manera individual y conjunta permitirán mejorar el rendimiento productivo, la tasa de utilización de nutrientes y energía, morfología de la tibia, histomorfología intestinal y la abundancia relativa de la microbiota intestinal de las aves.

V. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Investigar el impacto de añadir probióticos de *Saccharomyces cerevisiae* y minerales quelatados de Cobre, Zinc y Selenio a la dieta, sobre el rendimiento productivo, la tasa de utilización de nutrientes y energía, la morfología de la tibia, histomorfología intestinal y abundancia relativa de la microbiota intestinal de las aves.

5.2. Objetivos específicos

1. Evaluar las variables productivas (Peso vivo, ganancia de peso diario, consumo de alimento, conversión de alimento, eficiencia alimenticia y viabilidad) de las aves en crecimiento.
2. Determinar la tasa de utilización de MS, cenizas, proteína, energía y minerales trazas
3. Comparar los parámetros: altura de las vellosidades (AV), ancho de las vellosidades (ANV), profundidad de la cripta (CP) y la relación VA/CP en duodeno, yeyuno e íleon.
4. Analizar la morfología de tibias
5. Contrastar la abundancia relativa de especies en la microbiota intestinal

VI. EXPERIMENTO 1.

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE *Saccharomyces cerevisiae*

SOBRE CODORNICES EN CRECIMIENTO

6.1. Objetivo

Evaluar la inclusión de levadura de *Saccharomyces cerevisiae* a la dieta de codornices japonesas en crecimiento, sobre los parámetros productivos, la tasa de utilización de nutrientes y energía, y la histomorfología intestinal.

6.2. Materiales y métodos

6.2.1. Ubicación y manejo general de las codornices

El estudio se llevó a cabo en la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León, ubicada en el Campus de Ciencias Agropecuarias de la UANL en Gral. Escobedo, México. La prueba de alimentación tuvo una duración de seis semanas, incluyendo dos semanas de adaptación. Todos los procedimientos efectuados recibieron la evaluación y aprobación del Comité de Bioética y Bienestar Animal, así como del Comité de Bioseguridad e Higiene de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UANL (Folio 33/2022; Dictamen aprobatorio 44/2022, fecha del 29 de abril de 2022).

6.2.2. Diseño experimental

Se emplearon 155 codornices japonesas de un día de edad, las cuales a los 15 días de edad fueron asignadas aleatoriamente a cuatro grupos de tratamiento, correspondientes a los cuatro dietas experimentales (Cuadro 2): T1, que recibió una dieta control sin levadura, y T2, T3 y T4, que fueron alimentadas con 0.15, 0.30 y 0.45 % de levadura *Saccharomyces cerevisiae* (base materia seca), respectivamente, utilizando como fuente la levadura PlassYeast®, (1.4×10^9 UFC de *Saccharomyces cerevisiae* /mL; Plasset, México; Figura 1).

Cuadro 2. Alimento balanceado para crecimiento de codornices con adición de 0, 0.15, 0.30 y 0.45% (en base materia seca) de levadura *S. cerevisiae*.

| Ingredientes | T1 | T2 | T3 | T4 |
|--|-------|-------|-------|-------|
| Maíz | 604.8 | 605.3 | 605.0 | 605.0 |
| Harina de soya | 350.0 | 348.0 | 346.8 | 345.3 |
| PlassYeast®* | 0.0 | 15.0 | 30.0 | 45.0 |
| Aceite vegetal | 11.0 | 11.0 | 11.0 | 11.0 |
| Fosfato monocálcico | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 |
| Carbonato de calcio | 20.0 | 20.0 | 20.0 | 20.0 |
| Sal | 4.0 | 4.0 | 4.0 | 4.0 |
| L-Lisina (78%) | 1.9 | 1.9 | 1.9 | 1.9 |
| DL-Metionina (99%) | 3.0 | 3.0 | 3.0 | 3.0 |
| L-Treonina (99%) | 0.8 | 0.8 | 0.8 | 0.8 |
| Cloruro de Colina | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 |
| Premix Vit+Min** | 2.5 | 2.5 | 2.5 | 2.5 |
| Total (secado al aire) | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 |
| <i>Composición química analizada (base seca)</i> | | | | |
| Materia seca (%) | 89.6 | 88.7 | 87.4 | 85.9 |
| Cenizas (%) | 6.8 | 6.7 | 7.0 | 7.0 |
| Energía bruta (kcal/kg) | 3012 | 3015 | 3016 | 3018 |
| Proteína cruda (%) | 29.7 | 25.6 | 24.7 | 27.8 |
| Extracto etéreo (%) | 3.0 | 3.1 | 2.8 | 2.5 |
| FDA (%) | 3.3 | 2.5 | 2.1 | 2.5 |
| FDN (%) | 14.3 | 13.4 | 13.1 | 13.0 |
| Celulosa (%) | 2.7 | 1.9 | 1.7 | 2.0 |
| Hemicelulosa (%) | 11.0 | 10.9 | 11.0 | 10.5 |
| Lignina (%) | 0.6 | 0.6 | 0.5 | 0.5 |

*Producto húmedo con 10% de materia seca

** El Premix Vit+Min adicionado a razón de 2.5 kg/1000 kg de alimento, aportó las siguientes vitaminas por kg de dieta: A: 12,000,000 UI, D₃: 3,500,000 UI, E: 20,000 UI, K₃: 5 g, B₁: 2 g, B₂: 6.5 g, B₆: 1 g, B₁₂: 20 mg, Biotina: 100 mg, Nicotinamida: 35 g, Ácido pantoténico: 10 g y Ácido fólico: 1 g. También aportó los siguientes minerales por kg de dieta: Manganeso: 37.5 g, Zinc: 37.5 g, Hierro: 20 g, Cobre: 4 g, Yodo: 0.50 g y Selenio: 0.10 g.

Cada tratamiento tuvo 4 repeticiones (unidades experimentales), con 7-8 aves por jaula en baterías de investigación para aves (Figura 2). Las aves tuvieron disponibilidad de alimento y agua a libre acceso. Se llevó un registro diario de la cantidad de alimento

proporcionado y del rechazo por cada jaula, utilizando para ello una báscula electrónica con una capacidad máxima de 1000 g y una precisión de 0.1 g (Metrology, BCH-1000, China).



Figura 1. Producto comercial líquido PlassYeast®, levadura activa *Saccharomyces cerevisiae* (1.4×10^9 UFC/mL, Plasset, México).



Figura 2. Baterías de crianza equipadas para investigación en codornices.

6.2.3. Análisis proximal de dietas y excretas

Las dietas y excretas fueron analizadas en el Laboratorio de Nutrición y Calidad de los Alimentos, perteneciente a la Facultad de Agronomía de la UANL, siguiendo la metodología AOAC (2005):

Humedad: (AOAC 930.15): Este procedimiento mide la pérdida de peso de una muestra al secarse hasta alcanzar un peso fijo en un horno de convección forzada (Yamato Scientific, Japón) a 103°C. Los datos obtenidos reflejan el contenido de materia seca (MS) de la muestra analizada.

Cenizas: (método 942.05; AOAC): el contenido de cenizas se calculó midiendo el material restante después de quemar durante 4 horas la muestra a 550°C en una mufla (Lindberg, Waltham, MA, USA).

Grasa: (método 920.39; AOAC): La cantidad de grasa se determinó mediante una extracción con éter de petróleo. Dicho proceso se llevó a cabo con el Extractor de grasa ANKOM XT10 (ANKOM Technology, Macedonia, NY).

Proteína cruda: se midió mediante el método Kjeldahl. Este proceso comenzó con la digestión a 400°C de la muestra en ácido sulfúrico concentrado adicionado con un catalizador (3% de sulfato de cobre, y 97% sulfato de potasio). Posteriormente se destiló el nitrógeno previamente digerido, en un aparato de destilación Kjeldahl, en el que el ion amonio (NH_4^+) se transforma en amoníaco gaseoso (NH_3) al reaccionar con una base fuerte (NaOH 40%). En la titulación subsiguiente, el ácido estándar neutraliza el amoníaco capturado, para determinar cuántos moles de nitrógeno había en la muestra original. Se calcula enseguida el contenido de proteína cruda usando el factor $\text{N} \times 6.25$ (McDonald *et al.*, 2002; Navarro y Roa, 2020).

La determinación de los componentes fibrosos se realizó utilizando técnicas establecidas en la literatura científica. Para medir las fracciones de fibra FDN (fibra detergente neutro)

y FDA (fibra detergente ácido), se empleó el método propuesto por Van Soest *et al.* (1991). Para ello se utilizó el analizador de fibra ANKOM 2000 (ANKOM, Macedon, USA). Para determinar el contenido de lignina ácido detergente, se realizó el procedimiento descrito por Ramírez-Lozano (2007). Se calcularon los niveles de hemicelulosa mediante la diferencia entre FDN y FDA, mientras que la celulosa se cuantificó restando la lignina del valor de FDA (Dryden, 2008).

Energía: la energía en las muestras (alimento y excretas) se midió por combustión en una bomba calorimétrica adiabática, conforme a los métodos descritos por Liu *et al.* (2022).

6.2.4. Determinación del rendimiento productivo

Consumo: diariamente se pesó la cantidad de alimento ofrecido por cada comedero en todos los tratamientos utilizando para ello una báscula electrónica (Metrology, BCH-1000®, China) con capacidad de 1000 g y precisión de 0.1 g, y, semanalmente se pesó el alimento rechazado, y por diferencia de estas dos cantidades se determinó el consumo real.

Peso: semanalmente se pesaron todas las aves individualmente de manera ágil y precisa utilizando la misma báscula electrónica (Metrology, BCH-1000®, China).

Ganancia de peso diario (GDP): a partir del peso semanal, se calculó el aumento de peso diario dividiendo el anterior valor entre los días de la semana.

Conversión alimenticia: se determinó utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Conversión alimenticia} = \frac{\text{Consumo de alimento (g)}}{\text{Ganancia de peso (g)}}$$

Viabilidad (% de supervivencia): se calculó mediante la fórmula:

$$\text{Viabilidad \%} = \frac{\text{Número de aves vivas al final del experimento}}{\text{Número de aves iniciales}} \times 100$$

6.2.5. Determinación de la tasa de utilización de nutrientes y energía

La tasa de utilización de nutrientes y energía se determinó durante la última semana del experimento. Para esto, se recogieron de manera cuantitativa las excretas de cada codorniz a lo largo de 96 horas. Las muestras obtenidas se conservaron en refrigeración hasta su análisis, en el cual se midió su contenido de materia seca (MS), cenizas, proteína cruda y energía, utilizando los procedimientos descritos por Khosravi *et al.* (2016) y por Kaur *et al.* (2008).

La tasa de utilización de la materia seca, proteína, energía y minerales traza se determinó empleando la siguiente ecuación: Tasa de utilización del nutriente (%) = [(cantidad de nutriente ingerido – cantidad de nutriente excretado en las heces) / cantidad de nutriente ingerido] × 100 (Gaona Rodríguez *et al.*, 2023; Qi y Wang, 2024).

6.2.6. Análisis de histomorfología intestinal

El día 42 de edad, se sacrificaron entre 7 y 8 aves por tratamiento (32 aves en total). Inmediatamente después del proceso de eutanasia, se recogieron muestras intestinales (de 9 a 14 cm) del duodeno, el yeyuno y el íleon y se conservaron en formol al 10% en solución salina tamponada con fosfato (PBS). Las muestras se embebieron en parafina, se seccionaron, se tiñeron con hematoxilina-eosina (H&E) y se montaron en portaobjetos para su observación (Vásquez *et al.*, 2022).

La observación se realizó con un microscopio óptico (Carl Zeiss© Primo Star, Alemania) equipado con una cámara digital. Se tomaron microfotografías y medidas utilizando el software Zen 3.2 (edición azul) (Carl Zeiss©, Alemania) para medir los parámetros histológicos: altura de las vellosidades (VH), anchura de las vellosidades (VW), profundidad de las criptas (Figura 3) y la relación entre la altura de las vellosidades y la profundidad de las criptas.

La altura de la vellosidad (μm) se midió desde la base de la vellosidad, donde se une con la parte superior de la cripta, hasta la punta apical. La anchura de la vellosidad (μm) se midió en la sección media, entre los puntos más distantes de sus bordes laterales. La profundidad de la cripta (μm) se midió desde su base hasta donde conecta con la base de la vellosidad (Figura. 3). El criterio de selección de las vellosidades medidas ($n= 613$ en total) fue la integridad de la vellosidad. La relación VH:CD se calculó dividiendo la altura de la vellosidad por la profundidad de la cripta (VH:CD; Khan *et al.*, 2022).

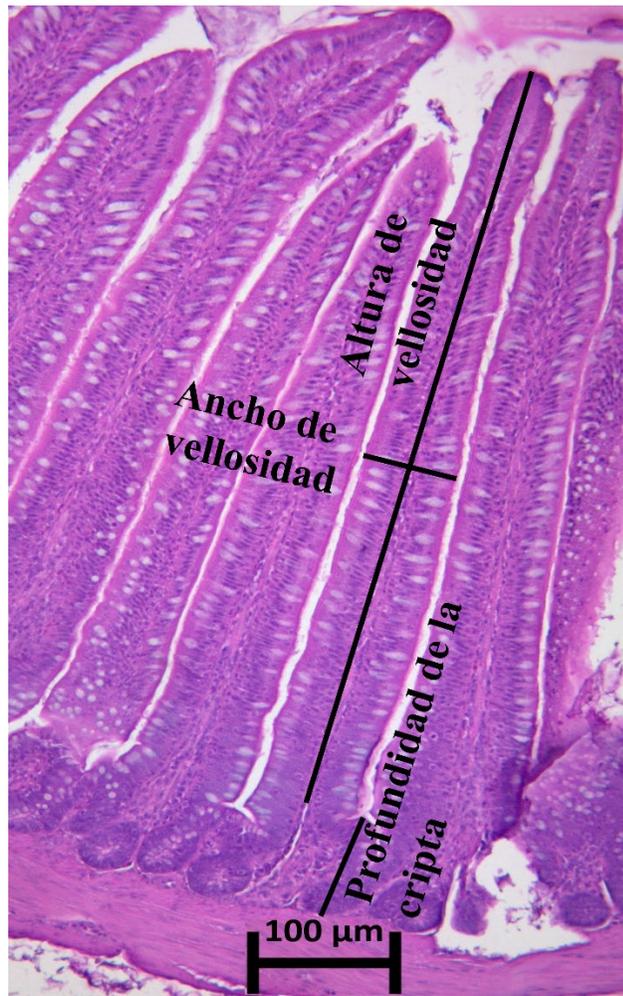


Figura 3. Criterios de medición de características de histomorfología intestinal. Microfotografía de la mucosa duodenal teñida con H&E, objetivo 10X.

6.2.7. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados se efectuó utilizando un diseño completamente aleatorizado, aplicando un análisis de varianza univariante para cada una de las variables. Si se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos, se realizó la correspondiente comparación de medias por Tukey, estableciendo un intervalo de confianza de 95% en cada prueba realizada. Se utilizó el software estadístico SPSS® (versión 24) y se consideraron significativas las diferencias cuando ($P < 0.05$).

6.2.8. Consideraciones éticas

Las técnicas y procedimientos en su totalidad aquí propuestos priorizan en todo momento el bienestar de las aves. El protocolo y los procedimientos realizados para el manejo y sacrificio de las 32 aves macho de este primer experimento por medio de dislocación cervical, que fueron realizados atendiendo la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Los protocolos fueron aprobados por el Comité de Bioética y Bienestar Animal, así como de Bioseguridad e Higiene, del Posgrado Conjunto en Ciencia Animal (Agronomía-Veterinaria) de la UANL. El Dictamen aprobatorio fue el 44/2022 (Folio 33/2022), del 29 de abril 2022.

6.3. Resultados

6.3.1. Rendimiento productivo

En el Cuadro 3 se presentan los resultados obtenidos del rendimiento productivo. El peso promedio de las aves asignadas a los tratamientos con 0%, 0.15%, 0.30% y 0.45% de levadura, no mostraron diferencias significativas, con valores de 110.8 g, 110.6 g, 112.9 g y 111.6 g, respectivamente ($P= 0.854$).

La ganancia diaria de peso tampoco presentó diferencias significativas entre los tratamientos, registrando valores de 4.27 g/d, 3.96 g/d, 4.25 g/d y 4.23 g/d para los tratamientos 1,

2, 3 y 4, respectivamente ($P= 0.718$). Sin embargo, el consumo de alimento sí mostró diferencias significativas entre los tratamientos. Los valores obtenidos fueron de 15.32 g para el tratamiento 1, 16.15 g para los tratamientos 2 y 3, y 16.42 g para el tratamiento 4 ($P= 0.050$). El tratamiento 4, con 0.45% de levadura, presentó el mayor consumo de alimento.

La conversión alimenticia no mostró diferencias significativas entre los tratamientos, con valores de 4.06 g/g, 4.92 g/g, 4.76 g/g y 5.18 g/g para los tratamientos 1, 2, 3 y 4, respectivamente (EEM: 0.771, Valor P : 0.377).

En cuanto a la viabilidad, sí se observaron diferencias significativas. Los valores fueron de 95.00% para el tratamiento 1, 98.75% para el tratamiento 2, 97.50% para el tratamiento 3 y 99.37% para el tratamiento 4 (EEM: 1.633, Valor P : 0.047). El tratamiento 4 presentó la mayor viabilidad.

Cuadro 3. Desempeño de crecimiento y tasa de viabilidad ($n = 5$ repeticiones por tratamiento) de codornices alimentadas con 0, 0.15, 0.30 y 0.45% de levadura *S. cerevisiae* en base seca.

| | Tratamiento | | | | EEM | Valor P |
|-----------------------------------|--------------------|---------------------|---------------------|--------------------|-------|-----------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | | |
| Levadura | | | | | | |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> * | 0% | 0.15% | 0.30% | 0.45% | | |
| Rendimiento productivo de aves | | | | | | |
| Peso promedio (g) | 110.8 | 110.6 | 112.9 | 111.6 | 2.982 | 0.854 |
| ADP (g/d) | 4.27 | 3.96 | 4.25 | 4.23 | 0.311 | 0.718 |
| Consumo de alimento (g) | 15.32 ^b | 16.15 ^{ab} | 16.15 ^{ab} | 16.42 ^a | 0.405 | 0.050 |
| Conversión alimenticia (g/g) | 4.06 | 4.92 | 4.76 | 5.18 | 0.771 | 0.377 |
| Viabilidad (%) | 95.00 ^b | 98.75 ^{ab} | 97.50 ^{ab} | 99.37 ^a | 1.633 | 0.047 |

*(base seca)

Letras diferentes en la misma fila, indican diferencias significativas ($P < 0.05$)

6.3.2. Tasa de utilización de nutrientes y energía

En el Cuadro 4 se presentan los resultados de la tasa de utilización de energía y nutrientes determinados en el presente experimento. Se evidenciaron diferencias únicamente en la utilización de proteína ($P = 0.011$), donde los tratamientos 1 y 4 registraron los más altos

valores, con 58.2 % y 53.6 %, respectivamente, mientras que T2 presentó el valor más bajo (35.5 %).

Las tasas de utilización de materia seca y energía no registraron diferencias entre tratamientos ($P = 0.223$ y $P = 0.358$, respectivamente). Los valores de MS oscilaron entre 74.1 % en T2 y 79.8 % en T1, mientras que los de energía variaron entre 75.6 kcal en T2 y 80.4 kcal en T4.

Cuadro 4. Tasa de utilización de MS, proteína y energía en codornices japonesas en fase de crecimiento.

| Nutriente | Tratamiento | | | | EEM | Valor P |
|--|-------------------|-------------------|--------------------|-------------------|------|---------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | | |
| Levadura activa <i>S. cerevisiae</i> * | 0% | 0.15% | 0.30% | 0.45% | | |
| MS, % | 79.8 | 74.1 | 78.0 | 78.6 | 2.68 | 0.223 |
| Proteína, % | 58.2 ^a | 35.5 ^b | 45.6 ^{ab} | 53.6 ^a | 4.66 | 0.011 |
| Energía, kcal | 80.2 | 75.6 | 78.5 | 80.4 | 2.02 | 0.358 |

*Base seca

EEM = Error estándar de la media

^{abc} Diferentes superíndices en la misma fila, denotan diferencias ($P < 0.05$)

6.3.3. Histomorfología intestinal

Los resultados analizados en duodeno, yeyuno e íleon destacan un gradiente morfológico a lo largo del tracto intestinal, donde las características de histomorfología disminuyen progresivamente desde el duodeno hacia el íleon (Figura 4). Es decir, la altura de las vellosidades presentó diferencias ($P < 0.05$), siendo mayor la altura en el duodeno (414 μm), seguido del yeyuno (282 μm) y, finalmente, con la menor altura en el íleon (235 μm). De manera similar, el ancho de las vellosidades también mostró esta tendencia. El ancho promedio fue mayor ($P < 0.05$) en el duodeno (85 μm), seguido por el yeyuno (77 μm) y el íleon (62 μm). Por último, el mismo patrón se observó en la profundidad de las criptas, con valores significativamente mayores ($P < 0.05$) en el duodeno (61 μm), seguidos del yeyuno (46 μm) y, por último, el íleon (39 μm).

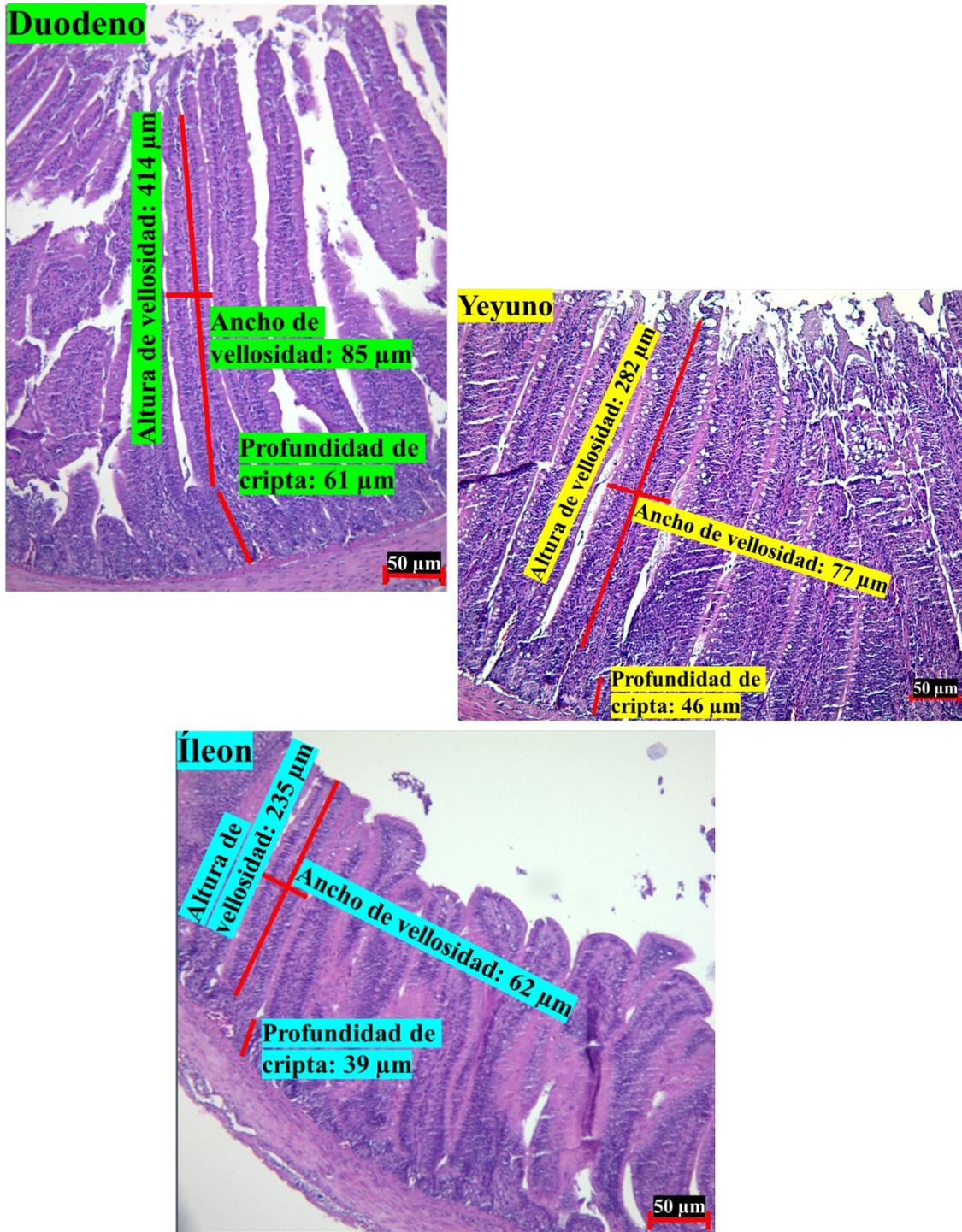


Figura 4. Valores promedio de altura de vellosidad, ancho de vellosidad y profundidad de la cripta por sección de intestino delgado. Microfotografías con tinción H&E, objetivo 10X.

Los resultados mostraron diferencias significativas en las variables de morfología intestinal en función de los niveles de suplementación con levadura activa *Saccharomyces cerevisiae* (Cuadro 5; $P \leq 0.05$). En el duodeno, la altura de las vellosidades incrementó progresivamente desde 191.7 μm en T1 hasta 474.4 μm en T4 ($P = 0.000$), mientras que el ancho de las vellosidades también fue mayor en T3 y T4 (88.6 μm y 96.04 μm , respectivamente) comparado con T1 y T2 ($P = 0.000$). La profundidad de las criptas mostró mayores valores en T3 y T4 (69.4 μm y 64.9 μm , respectivamente) con respecto a T1 y T2 ($P = 0.000$). La relación altura/profundidad de cripta alcanzó su máximo en T2 (8.62), siendo significativamente mayor que en T1 y T3 ($P = 0.000$).

Cuadro 5. Efecto de la suplementación con levadura activa (*S. cerevisiae*) sobre la morfología intestinal de codornices en diferentes cortes del intestino delgado.

| Corte intestinal/Variable | T1 | T2 | T3 | T4 | EEM | P Valor |
|--|---------------------|---------------------|----------------------|---------------------|-------|---------|
| Levadura activa <i>S. cerevisiae</i> * | 0% | 0.15% | 0.30% | 0.45% | | |
| Duodeno (n=124) | | | | | | |
| Altura vellosidad (μm) | 191.69 ^c | 308.42 ^b | 389.29 ^{ab} | 474.44 ^a | 47.08 | <0.001 |
| Ancho de vellosidad (μm) | 49.07 ^b | 58.58 ^b | 88.57 ^a | 96.04 ^a | 10.41 | <0.001 |
| Profundidad cripta (μm) | 52.49 ^{ab} | 40.85 ^b | 69.43 ^a | 64.99 ^a | 8.24 | <0.001 |
| Relación A/Prof Cripta | 4.20 ^c | 8.62 ^a | 5.62 ^{bc} | 8.07 ^{ab} | 1.30 | <0.001 |
| Yeyuno (n=115) | | | | | | |
| Altura vellosidad (μm) | 144.47 ^c | 247.92 ^b | 253.44 ^b | 353.47 ^a | 33.62 | <0.001 |
| Ancho de vellosidad (μm) | 62.73 ^b | 63.36 ^b | 70.5 ^b | 93.67 ^a | 8.18 | <0.001 |
| Profundidad cripta (μm) | 25.29 ^c | 31.33 ^c | 46.56 ^b | 61.63 ^a | 4.38 | <0.001 |
| Relación A/Prof Cripta | 6.37 ^b | 8.67 ^a | 5.97 ^b | 5.89 ^b | 0.93 | <0.001 |
| Íleon (n=137) | | | | | | |
| Altura vellosidad (μm) | 112.50 ^b | 148.54 ^b | 260.62 ^a | 300.56 ^a | 28.28 | <0.001 |
| Ancho de vellosidad (μm) | 41.17 ^c | 46.50 ^c | 60.08 ^b | 74.43 ^a | 6.14 | <0.001 |
| Profundidad cripta (μm) | 21.38 ^b | 24.05 ^b | 39.31 ^a | 49.93 ^a | 4.19 | <0.001 |
| Relación A/Prof Cripta | 6.25 | 6.95 | 6.81 | 6.45 | 1.40 | 0.823 |

^{abcd}. Letras diferentes indican diferencias entre tratamientos

La altura de las vellosidades en el yeyuno, fue mayor en T4 (353.5 μm) que en los otros tratamientos ($P < 0.001$), mientras que el ancho de las vellosidades alcanzó su mayor valor en T4 (93.7 μm ; $P < 0.001$). La profundidad de las criptas fue significativamente mayor en T4 (61.63 μm), seguida de T3, con diferencias respecto a T1 y T2 ($P < 0.001$). Sin

embargo, la relación altura/profundidad de cripta fue superior en T2 (8.67) en comparación con los demás tratamientos ($P < 0.001$).

En el íleon, se registró un incremento en la altura de vellosidades desde T1 (112.5 μm) hasta T4 (300.6 μm) ($P < 0.001$), así como un incremento progresivo en el ancho de las vellosidades, alcanzando su máximo en T4 (74.4 μm) ($P < 0.001$). La profundidad de las criptas fue mayor en T3 y T4 (39.3 μm y 49.9 μm , respectivamente) con respecto a T1 y T2 ($P < 0.001$). No obstante, la relación altura/profundidad de cripta no mostró diferencias entre tratamientos ($P = 0.823$).

6.4. Discusión

La adición de diferentes concentraciones de levadura *Saccharomyces cerevisiae* (LSC) a la dieta de codornices provocó un aumento en la ingesta de alimento y una mejora significativa en la supervivencia de las aves. El grupo de aves alimentadas con la mayor dosis de levadura (0.45% en base seca) mostró los resultados más destacados.

Este fenómeno puede ser atribuible a las propiedades funcionales de la levadura, que incluyen características probióticas y postbióticas con efectos antimicrobianos, antioxidantes e inmunomoduladores (Cuevas-González *et al.*, 2020). Tales beneficios pueden fortalecer la capacidad de las aves para enfrentar desafíos ambientales y reducir la probabilidad de enfermedades.

Los resultados son coherentes con investigaciones previas, como el estudio de Fathi *et al.* (2012), que demostró efectos similares en pollitos de engorda. En el presente trabajo de investigación, el grupo con mayor concentración de *S. cerevisiae* alcanzó una tasa de viabilidad sobresaliente del 99.37%, lo que respalda el potencial positivo de la suplementación con esta levadura.

Los datos productivos de peso, aumento diario de peso y eficiencia alimenticia presentaron una tendencia similar entre los diferentes tratamientos experimentales.

Un estudio previo de He *et al.* (2021) con pollos de engorda demostró que la suplementación con levadura viva *Saccharomyces cerevisiae* generó beneficios notables durante la fase de crecimiento (días 22-42), incluyendo un incremento del 18% en la ganancia diaria de peso y una mejora del 11% en la conversión alimenticia, sin modificar el consumo diario de alimento.

La ausencia de mejoras observada en este estudio en las características productivas, como el peso promedio, la ganancia diaria de peso y la conversión alimenticia, podría estar relacionada con el nivel de levadura incluido en la dieta. La dosificación de la levadura desempeña un papel importante, ya que una suplementación excesiva puede sobre-estimular la respuesta inmunitaria y redirigir la energía hacia el recambio tisular. Esto podría favorecer una mayor viabilidad y salud intestinal, pero sin traducirse necesariamente en mejoras significativas en el rendimiento del crecimiento de especies de interés productivo (Gao *et al.*, 2008; Shen *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2022).

En la presente investigación, la eficiencia de utilización proteica mostró variaciones significativas entre tratamientos. Los grupos T1 y T4 exhibieron las tasas más altas, con 58.2% y 53.6% respectivamente, mientras que T3 ocupó una posición intermedia con 45.6% y T2 presentó el valor más bajo de 35.5%. Esta variabilidad podría explicarse por el estado fisiológico de las codornices, que habían completado su fase de crecimiento activo en el momento de la evaluación, correspondiente a la sexta semana de vida. La tasa de utilización de energía registró porcentajes de 80.2, 75.6, 78.5 y 80.4% para los tratamientos 1, 2, 3 y 4 respectivamente, sin observar diferencias ($P > 0.05$) entre los tratamientos. Esto difiere de los resultados obtenidos por Zhang *et al.* (2022), quienes notaron un mejor aprovechamiento de energía (86.8%) y proteína (74.6%) al alimentar gansos con dietas suplementadas con 2.0% de cultivo de *S. cerevisiae*.

En este estudio, se registró un incremento en la altura de vellosidades del intestino, directamente proporcional al incremento del nivel de levadura adicionada a la dieta. De manera similar, El-Wahab *et al.* (2020) reportaron que la altura de las vellosidades en el duodeno de codornices japonesas de 35 días de edad se incrementó al ser suplementadas con 3.5%

de un preparado de *Saccharomyces cerevisiae* (≤ 100 CFU/g) y un 7% de nucleótidos. En su estudio, las aves suplementadas alcanzaron una altura de 1188 μm en comparación con 683 μm en las aves no suplementadas. Sin embargo, no se conoce con claridad la razón detrás de las mediciones de vellosidades tan elevadas reportadas en ese trabajo.

Se ha reportado así mismo que la altura y ancho vellosidad junto con la relación A/Prof Cripta del yeyuno se vieron favorecidas en codornices de postura suplementadas con 100 mg/kg de *Saccharomyces cerevisiae* en la dieta, donde se encontró una altura, ancho de vellosidad y relación A/Prof Cripta de 547 μm , 143 μm y 6.60 $\mu\text{m}/\mu\text{m}$ respectivamente frente a 436 μm , 119 μm y 8.14 μm en aves sin suplementar (Mirakzahi *et al.*, 2022).

Kim *et al.* (2022) reportaron en pollos de engorda que la altura de vellosidades en duodeno y yeyuno fue significativamente mayor en las aves suplementadas con 1g/kg de un cultivo líquido de levadura viva de *Saccharomyces cerevisiae* con concentración de 2.8×10^8 CFU/g. En el duodeno, estas aves alcanzaron una altura promedio de 937 μm , mientras que en el yeyuno fue de 738 μm . En contraste, las aves no suplementadas presentaron alturas de 810 μm en el duodeno y 563 μm en el yeyuno, respectivamente.

Al igual que en este estudio, los autores también reportaron que otras variables de la morfología intestinal, como ancho de vellosidades y la relación entre la altura de vellosidades y profundidad de cripta se incrementaron en las aves alimentadas con el cultivo de levadura. Estas aves mostraron un ancho de vellosidad de 189 μm y una relación A/Prof de 9.15 $\mu\text{m}/\mu\text{m}$, en comparación con las aves no suplementadas, que presentaron valores de 143 μm y 4.99 μm , respectivamente.

A diferencia de los resultados registrados en el presente estudio, dichos autores no encontraron diferencias en las características mencionadas en las secciones intestinales de yeyuno e íleon.

6.5. Conclusiones del Experimento 1

La inclusión de levadura demostró efectos benéficos en el consumo de la dieta y la viabilidad, especialmente con mayores niveles de inclusión (0.45%). Aunque no se observaron diferencias en el peso promedio, el aumento diario de peso ni la conversión alimenticia, la mejora en la tasa de utilización de la proteína y en la morfología intestinal (particularmente en el yeyuno e íleon con el tratamiento 4) indica un potencial beneficio en la capacidad de absorción y salud intestinal de las aves.

Estos resultados sugieren que la levadura puede ser una adición valiosa en los piensos producidos a nivel comercial, para optimizar la salud intestinal y la viabilidad de las aves, y que podría traducirse en menores pérdidas económicas y un mejor aprovechamiento de los nutrientes, sin comprometer la eficiencia productiva.

VII. EXPERIMENTO 2.

EFECTO DE LA SUSTITUCIÓN DE MINERALES INORGÁNICOS DE COBRE, ZINC Y SELENIO, POR SUS FOR- MAS QUELATADAS, EN LA DIETA DE CODORNICES EN CRECIMIENTO

7.1. Objetivo

Evaluar el efecto de los minerales quelatados de cobre, zinc y selenio en el alimento de codornices japonesas en crecimiento sobre variables productivas, la tasa de utilización de nutrientes, energía y minerales traza, morfología de la tibia, e histomorfología intestinal.

7.2. Materiales y métodos

7.2.1. Ubicación y diseño experimental

El segundo estudio se realizó en la Facultad de Agronomía, ubicada en Gral. Escobedo, dentro de las instalaciones del Campus UANL de Ciencias Agropecuarias, México. Se evaluó el efecto sustituir 0, 33, 67 y 100% de Cu, Zn y Se inorgánico por fuentes de minerales quelatados (Figura 5): Cu (Optimin Copper 15%™; quelato de cobre aminoácido hidratado), Zn (Optimin Zinc 15%™; quelato de zinc aminoácido hidratado) y Se (Optimin Se 3000 ROW25™; L(+) selenometionina derivada de pared de levadura *Saccharomyces cerevisiae* inactivada; Figura 5). Los tres productos fueron de la firma Selko (Nutreco, Países Bajos).

El experimento tuvo una fase de evaluación de 4 semanas, que inició cuando las aves tuvieron una edad inicial de 9 días. Del nacimiento a los 9 días de edad se realizaron aspectos de crianza y adaptación ambiental a las aves. Fueron utilizadas un total de 150 codornices japonesas, las cuales fueron divididas en 4 tratamientos en baterías de experimentación (Figura 2), con 4 repeticiones por tratamiento. Cada repetición estuvo

conformada por entre 8 - 10 aves, bajo un diseño de bloques al azar. El experimentó se dividió en dos etapas con su correspondiente dieta.



Figura 5. Presentación de las formas inorgánicas y orgánicas de los minerales de cobre, zinc y selenio utilizadas en experimentación.

La primera etapa fue Iniciación, cuya dieta (Cuadro 6), fue ofrecida a las aves de los 10 a los 24 días de edad. La segunda etapa fue la de Desarrollo (Cuadro 6), que fue ofrecida de los 25- 39 días de edad.

Cuadro 6. Dietas ofrecidas en etapa de inicio (10 – 24 d de edad) y desarrollo (25 a 39 d de edad), con sustitución del 0, 33, 67 y 100% de cobre, zinc y selenio inorgánicos por su fuente orgánica.

| | Inicio | | | | Desarrollo | | | |
|--|--------|-------|------|------|------------|------|-------|------|
| | T1 | T2 | T3 | T4 | T1 | T2 | T3 | T4 |
| Sustitución, % | 0 | 33 | 67 | 100 | 0 | 33 | 67 | 100 |
| Ingredientes, g | | | | | | | | |
| Maíz | 522 | 522 | 522 | 522 | 610 | 610 | 610 | 610 |
| Harina de soya | 414 | 414 | 414 | 414 | 340 | 340 | 340 | 340 |
| Aceite vegetal | 35 | 35 | 35 | 35 | 20 | 19 | 19 | 19 |
| Premix Exp ¹ | 28.8 | 28.6 | 28.6 | 28.4 | 29.1 | 29.2 | 29.1 | 29.0 |
| Sulfato de cobre* | 0.04 | 0.02 | 0.01 | 0.00 | 0.04 | 0.02 | 0.01 | 0.00 |
| Sulfato de zinc** | 0.20 | 0.13 | 0.07 | 0.00 | 0.20 | 0.13 | 0.07 | 0.00 |
| Selenito de sodio*** | 0.02 | 0.01 | 0.01 | 0.00 | 0.02 | 0.01 | 0.01 | 0.00 |
| Optimin Cobre® | 0.00 | 0.02 | 0.04 | 0.06 | 0.00 | 0.02 | 0.04 | 0.06 |
| Optimin Zinc® | 0.00 | 0.16 | 0.32 | 0.48 | 0.00 | 0.16 | 0.32 | 0.48 |
| Optimin SeY® | 0.00 | 0.02 | 0.04 | 0.07 | 0.00 | 0.02 | 0.04 | 0.07 |
| <i>Composición química analizada (base seca)</i> | | | | | | | | |
| Materia seca, % | 88.8 | 89.1 | 89.0 | 88.9 | 88.6 | 88.6 | 88.0 | 87.6 |
| Proteína cruda, % | 24.4 | 24.4 | 24.2 | 24.1 | 22.7 | 23.7 | 22.1 | 21.5 |
| Energía, kcal/kg | 4472 | 4432 | 4435 | 4411 | 4672 | 4467 | 4168 | 4511 |
| Grasa, % | 2.70 | 2.33 | 2.44 | 2.32 | 1.98 | 1.96 | 1.81 | 1.82 |
| Cenizas, % | 6.46 | 6.53 | 7.04 | 5.99 | 5.77 | 5.74 | 5.86 | 5.99 |
| FDN, % | 11.9 | 14.2 | 11.5 | 12.0 | 11.9 | 11.1 | 12.0 | 12.0 |
| FDA, % | 2.26 | 2.94 | 2.20 | 2.82 | 2.36 | 1.93 | 2.00 | 2.30 |
| Lignina, % | 1.09 | 1.07 | 0.95 | 1.32 | 0.99 | 1.08 | 1.09 | 0.97 |
| Hemicelulosa, % | 9.62 | 11.32 | 9.28 | 9.17 | 9.61 | 9.22 | 10.01 | 9.74 |
| Celulosa, % | 1.1 | 1.8 | 1.2 | 1.5 | 1.37 | 0.86 | 0.91 | 1.33 |

¹Premezcla Especial de Aminoácidos, Macrominerales, Vitaminas y Minerales traza, que suministra por kg de dieta: 2.70 g de metionina, 0.9 g de cloruro de colina, 1 g de fosfato mono-cálcico, 19.6 g de carbonato de calcio, 4 g de cloruro de sodio, 0.14 g de sulfato ferroso, 0.20 g de óxido de manganeso, 0.01 g de EDDI y 0.25 g de núcleo vitamínico para aves. *Sulfato de cobre (25% Cu), **Sulfato de zinc (36% Zn), ***Selenito de sodio (1% Se).

7.2.2. Determinación del rendimiento productivo

Durante toda la fase experimental (4 semanas), se efectuó un monitoreo sistemático tanto semanal como total de parámetros productivos. Este seguimiento abarcó: el peso de las aves (registrado en g), la ganancia diaria de peso (expresada en g/día), el consumo alimenticio por ave diario (g), la eficiencia de transformación alimenticia (calculada dividiendo el consumo de alimento entre la ganancia diaria de peso), y el índice de supervivencia de las aves, empleando para ello la metodología previamente establecida en el Experimento 1.

7.2.3. Determinación de la tasa de utilización de nutrientes, energía y minerales trazas

En la etapa final del experimento, específicamente durante la sexta semana de vida de las codornices, se procedió a recolectar cuantitativamente las excretas de cada unidad experimental (jaula) durante un período de 72 horas. Luego se siguió la metodología descrita en Experimento 1).

7.2.4. Análisis morfológico de tibias

Al final de la cuarta semana de la fase de evaluación, se sacrificaron $n=10$ aves macho por tratamiento para extraer las tibias izquierda y derecha de cada una. Los huesos se limpiaron de tejidos blandos (músculos, ligamentos, nervios y vasos) según lo descrito previamente (Santos *et al.*, 2022). Se midieron la longitud (cm) y el ancho (cm) de la tibia (Figura 6) utilizando un vernier (Stainless Hardened® Gns 150, China; Khan *et al.*, 2023). La longitud de la tibia se definió como la distancia desde el extremo superior de la epífisis proximal hasta el extremo inferior de la epífisis distal.

La longitud de la diáfisis se calculó restando las medidas de las epífisis proximal y distal de la longitud total de la tibia (Huang *et al.*, 2022). El ancho de la tibia se midió como la distancia entre los bordes externo e interno en el eje central de la tibia. El peso de la tibia

(g) se registró utilizando una balanza analítica (AND – HR-200, con una división mínima de 0.1 mg; (Santos *et al.*, 2022).

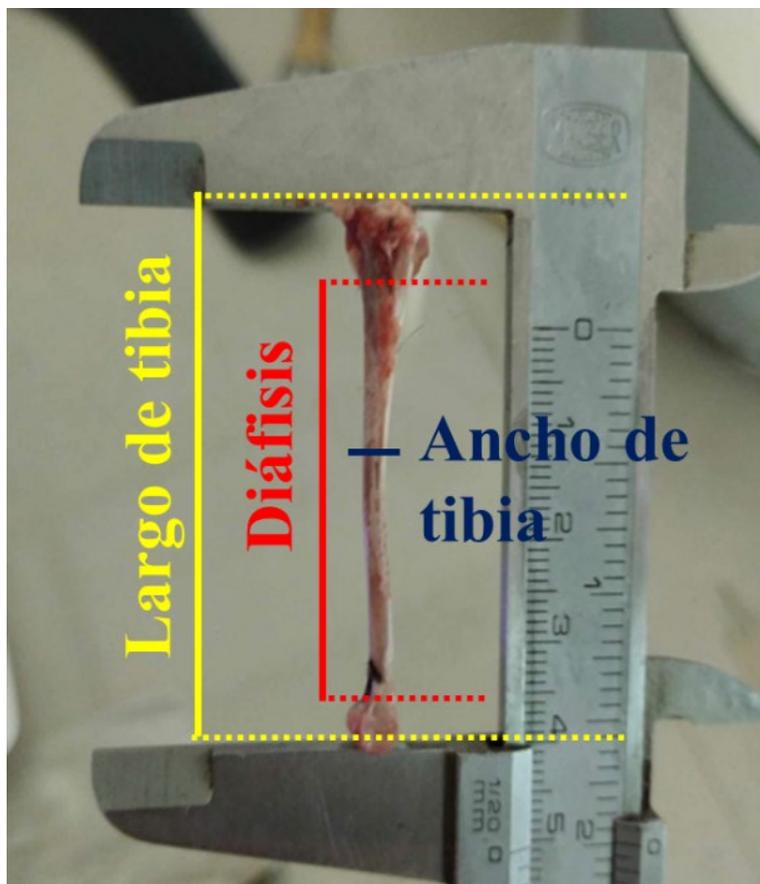


Figura 6. Medición de las características de morfología de la tibia.

7.2.5. Cuantificación de minerales traza

Se incineraron muestras de alimento, excretas y tibias de cada tratamiento a 520 °C durante 4 horas para obtener cenizas. Las cenizas se digirieron con 20 ml de agua destilada, 5 ml de HCl y 10 gotas de HNO₃ a 200 °C, reduciendo el volumen a 10 ml. El extracto se filtró en un matraz aforado y se ajustó a 100 ml con agua destilada. Este extracto se utilizó para medir la concentración de Cu⁺², Mn⁺², Zn⁺² y Fe⁺² mediante espectrofotometría de absorción atómica en un equipo específico (PerkinElmer, PinAAcle 900F AA Spectrometer, USA; Han *et al.*, 2024).

7.2.6. Análisis de histomorfología intestinal

El análisis de histomorfología intestinal en duodeno, yeyuno e íleon se realizó como se describe en Experimento 1. En el experimento 2 se analizó adicionalmente, la superficie de absorción de las vellosidades (SAV), la cual se calculó según la fórmula: $SAV = 2\pi \times (\text{anchura media de las vellosidades}/2) \times \text{altura de las vellosidades}$ (Prekatur *et al.*, 2024).

7.2.7. Consideraciones éticas

El protocolo y los procedimientos realizados para el manejo y sacrificio de las 32 aves macho de este segundo experimento se hizo por medio de dislocación cervical, corresponden a lo especificado en la NOM-062-ZOO-1999 y fueron aprobados el 29 de abril 2022 (Dictamen aprobatorio 44/2022) por el Comité de Bioética y Bienestar Animal, así como por el Comité de Bioseguridad e Higiene, del Posgrado Conjunto Agronomía - Veterinaria de la UANL (Folio 33/2022;).

7.2.8. Análisis estadístico.

Se realizó un análisis de la varianza univariante para cada una de las variables continuas, en un diseño de bloques completamente aleatorizados, con 4 tratamientos con 4 repeticiones cada uno. Las comparaciones de medias se realizaron mediante Tukey, con un nivel de confianza del 95%, empleando el programa SPSS®, versión 25.

Se llevó a cabo un análisis de regresión con el objetivo de evaluar efectos lineales y cuadráticos de los tratamientos sobre variables continuas, estimando la dosis óptima fisiológica cuando fueron significativos. La viabilidad de las aves se analizó con la prueba de Kruskal-Wallis, considerando significativas diferencias con $P < 0.05$.

7.3. Resultados

7.3.1. Rendimiento productivo

Como se muestra en el Cuadro 7, el mayor peso vivo promedio obtenido en las 4 semanas de experimento se encontró en T3 con 67% de sustitución de cobre, zinc y selenio inorgánico por su forma orgánica (93.55 g) comparado con T1 (sin sustitución, 85.10 g), indicando una mejora significativa sobre esta variable productiva ($P=0.050$). De igual forma, los valores de GDP encontrados fueron estadísticamente más altos ($P = 0.037$) en T3 con 4.28 g/día en contraste con 3.87 g/día del T1.

Por otra parte, las variables de consumo de alimento y eficiencia alimenticia no mostraron ser diferentes entre tratamientos ($P = 0.378$ y $P = 0.631$ respectivamente, Cuadro 7).

Cuadro 7. Rendimiento productivo de codornices en crecimiento alimentadas con diferentes niveles de sustitución cobre, zinc y selenio inorgánico por orgánicos.

| | T1 | T2 | T3 | T4 | | |
|-----------------------------|--------------------|---------------------|--------------------|---------------------|-------|-----------|
| Sustitución, % | 0 | 33 | 67 | 100 | | |
| n= | 16 | 16 | 16 | 16 | EEM | Valor P |
| Peso vivo | 85.10 ^b | 88.31 ^{ab} | 93.55 ^a | 87.50 ^{ab} | 3.125 | 0.050 |
| GDP (g) | 3.87 ^b | 3.98 ^{ab} | 4.28 ^a | 3.93 ^{ab} | 0.145 | 0.037 |
| Consumo de alimento (g/día) | 14.83 | 15.46 | 15.85 | 15.13 | 0.600 | 0.378 |
| Eficiencia alimenticia | 0.273 | 0.267 | 0.281 | 0.275 | 0.103 | 0.631 |

^{abc}Medias con diferente literal difieren estadísticamente entre tratamientos ($P \leq 0.05$)

EEM= error estándar de la media.

La tasa de viabilidad fue más alta ($P \leq 0.05$) en el grupo T3 con 67% de sustitución (98.61%) comparado con 92.91%, 96.67%, y 95.00% para los tratamientos T1, T2 y T4 respectivamente (Figura 1).

7.3.2. Tasa de utilización de nutrientes, energía y minerales traza

Los tratamientos con diferentes niveles de sustitución de minerales de cobre, zinc y selenio tuvieron comportamientos similares ($P>0.05$) en cuanto a la tasa de utilización de MS, proteína y energía (Cuadro 8).

La tasa de utilización del mineral cobre (Cu^{2+}) fue menor ($P=0.001$) en T2 (26.12%) comparada con T1, T3, y T4, que presentan tasas altas y similares (48.27%, 60.04%, 58.38% respectivamente).

Por otra parte, en T2, la diferencia estadística significativa ($P\leq 0.05$) de la tasa de utilización de hierro (Fe^{2+}) también es notable, pues es especialmente más baja (36.83%), comparado con la utilización más alta obtenida por el grupo T4 (56.73%).

La tasa de utilización de manganeso (Mn^{2+}) y zinc (Zn^{2+}) fue similar estadísticamente entre tratamientos ($P>0.05$), sin embargo, en el caso del Mn^{2+} , se puede observar una tendencia numérica a aumentar los valores de la tasa de utilización conforme aumenta el nivel de sustitución de los minerales inorgánicos por orgánicos.

Cuadro 8. Tasa de utilización de nutrientes, energía y minerales trazas de codornices en crecimiento alimentadas con diferentes niveles de sustitución cobre, zinc y selenio inorgánico por orgánicos.

| | T1 | T2 | T3 | T4 | | |
|--------------------------------|---------------------|--------------------|---------------------|--------------------|-------|----------------|
| Sustitución, % | 0 | 33 | 67 | 100 | | |
| n= | 4 | 4 | 4 | 4 | EEM | Valor <i>P</i> |
| Utilización, % | | | | | | |
| MS | 73.85 | 73.39 | 73.34 | 74.36 | 1.887 | 0.942 |
| Proteína | 49.66 | 50.53 | 45.99 | 42.08 | 4.855 | 0.330 |
| Energía | 68.13 | 66.59 | 70.98 | 70.65 | 2.221 | 0.204 |
| Cobre (Cu^{2+}) | 48.27 ^a | 26.12 ^b | 60.04 ^a | 58.38 ^a | 6.830 | 0.001 |
| Manganeso (Mn^{2+}) | 25.43 | 34.25 | 35.65 | 44.35 | 7.886 | 0.147 |
| Hierro (Fe^{2+}) | 44.59 ^{ab} | 36.83 ^b | 51.65 ^{ab} | 56.73 ^a | 6.562 | 0.050 |
| Zinc (Zn^{2+}) | 79.78 | 73.56 | 79.60 | 86.34 | 4.306 | 0.076 |

^{abcd}. Letras diferentes indican diferencias entre tratamientos

7.3.3. Morfología de tibias

En el Cuadro 9 se observa que las mediciones de las tibias no mostraron diferencias estadísticamente significativas en el largo ($P=0.888$), ancho ($P=0.344$), y diámetro de la diáfisis ($P=0.482$). Sin embargo, se observa que el peso de la tibia si fue mayor estadísticamente ($P=0.045$) en el grupo T2 con 33% de sustitución (0.710 g) en contraste con T1 con 0% de sustitución (0.648 g), siendo el grupo con menor peso de tibia, mientras que los grupos con 67 y 100% de sustitución tuvieron valores intermedios con 0.662 y 0.663 g respectivamente.

Cuadro 9. Resultados de morfología de tibias de codornices en crecimiento alimentadas con diferentes niveles de sustitución cobre, zinc y selenio inorgánico por orgánicos.

| | T1 | T2 | T3 | T4 | EEM | Valor <i>P</i> |
|------------------|--------------------|--------------------|---------------------|---------------------|-------|----------------|
| % de sustitución | 0 | 33 | 67 | 100 | | |
| n= | 12 | 15 | 13 | 14 | | |
| Peso (g) | 0.648 ^b | 0.710 ^a | 0.662 ^{ab} | 0.663 ^{ab} | 0.022 | 0.045 |
| Largo (cm) | 4.996 | 5.052 | 5.015 | 5.014 | 0.727 | 0.888 |
| Ancho (cm) | 0.312 | 0.309 | 0.287 | 0.291 | 0.167 | 0.344 |
| Diáfisis (cm) | 3.877 | 3.934 | 4.018 | 3.973 | 0.089 | 0.482 |

^{abc}Medias con diferente literal difieren estadísticamente entre tratamientos ($P \leq 0.05$)

EEM= error estándar de la media

7.3.4. Histomorfología intestinal

En el análisis global de los resultados de cada corte intestinal, se observó una gran variabilidad e interacciones significativas entre Tratamiento y Bloque. Destacaron dos grupos: aves grandes (Bloques 3 y 4) y aves pequeñas (Bloques 1 y 2). Esto sugiere que podría haber efectos dietéticos aún no visibles que influyen de manera diferente en estos dos grupos de aves. Por esta razón, se realizó un análisis específico para cada grupo (aves grandes y pequeñas) con el objetivo de explorar el efecto de los tratamientos en ambos grupos. Los resultados se presentan en el Cuadro 10 para los efectos observados en las aves grandes y en el Cuadro 11 para los efectos en las aves pequeñas.

7.3.5. Efectos sobre las variables histomorfológicas en aves grandes

En el duodeno, de las aves grandes (Bloque 3 y 4), la altura de la vellosidad mostró diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0.05$). El T3 presentó la mayor altura de la vellosidad ($665 \mu\text{m}$), lo que sugiere una posible mejora en la absorción de nutrientes comparado con los otros tratamientos. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en el ancho de la vellosidad ($P > 0.05$).

En cuanto a la profundidad de la cripta, T2 presentó valores inferiores ($58 \mu\text{m}$; $P < 0.05$) en comparación con los otros tratamientos, lo que sugiere una mayor tasa de migración y renovación del epitelio de las vellosidades. La relación entre la altura y la profundidad de la cripta fue similar ($P > 0.05$) entre los tratamientos. En el yeyuno de las aves grandes (Bloque 3 y 4) la altura de la vellosidad fue mayor en los tratamientos 3 y 4 ($550 \mu\text{m}$ y $555 \mu\text{m}$, respectivamente) comparado con el T2 ($438 \mu\text{m}$; $P < 0.05$). El ancho de la vellosidad no registró diferencias ($P > 0.05$). La profundidad de la cripta fue significativamente ($P < 0.05$) menor en T2 ($48 \mu\text{m}$; mientras que la relación entre la altura de vellosidad y la profundidad de la cripta fue similar ($P > 0.05$) entre los tratamientos.

En el íleon de las aves grandes del presente experimento, observó que la altura de la vellosidad fue mayor en el T2 ($406 \mu\text{m}$), seguido por el T4 ($348 \mu\text{m}$) y el T3 ($326 \mu\text{m}$; $P < 0.05$). El ancho de la vellosidad fue significativamente menor en el T1 ($62 \mu\text{m}$) en comparación con los otros tratamientos ($P < 0.05$). A diferencia de lo encontrado en duodeno y yeyuno, la profundidad de la cripta en el íleon mostró valores superiores en el T2 ($57 \mu\text{m}$), que fue significativamente diferente al T1, en el que se registró la menor profundidad ($38 \mu\text{m}$; $P < 0.05$). La relación altura/profundidad de la cripta no mostró diferencias significativas entre los tratamientos ($P > 0.05$).

Cuadro 10. Resultados de mediciones histológicas de codornices de tamaño grande (Bloques 3 y 4) alimentadas con dietas en las que se sustituyeron 0, 33, 67 y 100% de minerales de Cu, Zn y Se inorgánicos por minerales quelatados.

| Corte intestinal/Variable % de sustitución | T1 0 | T2 33 | T3 67 | T4 100 | EEM | P Valor |
|---|-------------------|-------------------|-------------------|------------------|--------|---------|
| Duodeno (n=40) | | | | | | |
| Altura vellosidad (μm) | 607 ^{ab} | 594 ^{bc} | 665 ^a | 542 ^c | 26.369 | 0.000 |
| Ancho de vellosidad (μm) | 91 | 95 | 103 | 100 | 7.054 | 0.208 |
| Profundidad cripta (μm) | 65 ^{ab} | 58 ^b | 72 ^a | 63 ^{ab} | 5.012 | 0.024 |
| Relación A/Prof Cripta | 9.87 | 10.72 | 9.63 | 9.27 | 1.016 | 0.256 |
| Yeyuno (n=40) | | | | | | |
| Altura vellosidad (μm) | 495 ^{ab} | 438 ^b | 550 ^a | 555 ^a | 27.224 | 0.000 |
| Ancho de vellosidad (μm) | 83 | 96 | 95 | 87 | 6.675 | 0.118 |
| Profundidad cripta (μm) | 53 ^{bc} | 48 ^c | 64 ^a | 60 ^{ab} | 4.352 | 0.000 |
| Relación A/Prof Cripta | 9.97 | 9.54 | 9.14 | 9.68 | 0.910 | 0.670 |
| Íleon (n=49) | | | | | | |
| Altura vellosidad (μm) | 307 ^c | 406 ^a | 326 ^{bc} | 348 ^b | 15.102 | 0.000 |
| Ancho de vellosidad (μm) | 62 ^b | 83 ^a | 87 ^a | 96 ^a | 6.767 | 0.000 |
| Profundidad cripta (μm) | 38 ^c | 57 ^a | 47 ^{bc} | 49 ^{ab} | 4.333 | 0.000 |
| Relación A/Prof Cripta | 8.66 | 7.78 | 7.67 | 7.41 | 0.828 | 0.465 |

abcd: Letras diferentes indican diferencias entre tratamientos

7.3.6. Efectos sobre las variables histomorfológicas en aves pequeñas

En el duodeno de las aves pequeñas del presente experimento (Bloques 1 y 2), el tratamiento T3 presentó la mayor altura de la vellosidad (409 μm ; $P < 0.05$), similar a los resultados observados en las aves grandes. Esto sugiere un posible efecto benéfico en ambos grupos sobre el área de absorción de nutrientes. Sin embargo, T3 no mostró diferencias estadísticamente significativas respecto a T4 y T2. Estadísticamente, T3 solo difirió significativamente de T2, que tuvo el menor valor (285 μm).

Por otra parte, los tratamientos mostraron resultados similares ($P > 0.05$) en el ancho de la vellosidad, en la profundidad de la cripta y en la relación entre la altura de vellosidad y la profundidad de la cripta.

En cuanto el yeyuno de las aves pequeñas del presente estudio, la altura de la vellosidad no mostró diferencias significativas entre los tratamientos ($P > 0.05$). Sin embargo, el ancho de la vellosidad fue mayor ($P < 0.05$) en el T3 (77 μm), respecto de T2 (48 μm) y T4 (52 μm ; $P < 0.05$). La profundidad de la cripta fue menor ($P < 0.05$) en T1 (27 μm) y T4 (33 μm ; $P < 0.05$) respecto a T3 (44 μm). Además, la relación altura/profundidad de la cripta fue superior en T1, presentando la mayor relación (9.67 μm), significativamente mayor ($P < 0.05$) en comparación con la menor relación (7.05 μm) del T3.

Cuadro 11. Resultados de mediciones histológicas de codornices de tamaño pequeñas (Bloques 1 y 2) alimentadas con dietas en las que se sustituyeron 0, 33, 67 y 100% de minerales de Cu, Zn y Se inorgánicos por minerales quelatados.

| Corte Intestinal/Variable % de sustitución | T1 0 | T2 33 | T3 67 | T4 100 | EEM | P Valor |
|--|-------------------|--------------------|-------------------|--------------------|--------|---------|
| Duodeno (n= 18) | | | | | | |
| Altura vellosidad (μm) | 367 ^{ab} | 285 ^b | 409 ^a | 379 ^a | 35.336 | 0.013 |
| Ancho de vellosidad (μm) | 62 | 61 | 64 | 71 | 9.185 | 0.536 |
| Profundidad cripta (μm) | 43 | 43 | 41 | 49 | 5.819 | 0.309 |
| Relación A/Prof Cripta ($\mu\text{m}/\mu\text{m}$) | 9.00 | 7.18 | 10.66 | 8.76 | 1.419 | 0.139 |
| Yeyuno (n= 32) | | | | | | |
| Altura vellosidad (μm) | 250 | 250 | 296 | 303 | 31.259 | 0.126 |
| Ancho de vellosidad (μm) | 60 ^{ab} | 48 ^b | 77 ^a | 52 ^b | 9.338 | <0.001 |
| Profundidad cripta (μm) | 27 ^b | 37 ^{ab} | 44 ^a | 33 ^b | 4.449 | <0.001 |
| Relación A/Prof Cripta ($\mu\text{m}/\mu\text{m}$) | 9.67 ^a | 7.57 ^{ab} | 7.05 ^b | 9.55 ^{ab} | 1.134 | 0.005 |
| Íleon (n= 24) | | | | | | |
| Altura vellosidad (μm) | 178 ^c | 219 ^b | 252 ^a | 162 ^c | 13.672 | <0.001 |
| Ancho de vellosidad (μm) | 58 | 57 | 66 | 60 | 6.481 | 0.670 |
| Profundidad cripta (μm) | 29 ^b | 35 ^{ab} | 44 ^a | 27 ^b | 4.836 | 0.003 |
| Relación A/Prof Cripta ($\mu\text{m}/\mu\text{m}$) | 6.42 | 7.02 | 7.17 | 6.70 | 0.973 | 0.836 |

^{abcd}: Letras diferentes indican diferencias entre tratamientos

EEM= error estándar de la media

En íleon de las aves pequeñas, la altura de vellosidad fue mayor ($P < 0.05$) en T3 (252 μm), significativamente mayor en comparación con T1 (178 μm) y T4 (162 μm ; $P < 0.05$). Por otro lado, no se observaron diferencias significativas en el ancho de la vellosidad entre los tratamientos ($P > 0.05$). En cuanto la profundidad de la cripta, se observó la misma

tendencia que en yeyuno siendo menor en T1 (29 μm) y T4 (27 μm) respecto a T3 (44 μm) ($P < 0.05$). La relación entre la altura de vellosidad y la profundidad de la cripta fue similar ($P > 0.05$) entre tratamientos.

7.4. Discusión

En la presente investigación se obtuvieron resultados que muestran que la sustitución del 67% de las fuentes inorgánicas de cobre, zinc y selenio por sus fuentes orgánicas (Dieta T3) mejoró la viabilidad, el peso del ave y el aumento diario de peso (GDP) en las codornices en comparación con la dieta T1 sin sustitución.

En el presente trabajo la tasa de viabilidad (98.6%) fue significativamente más alta en el grupo alimentado con dieta con 67% de sustitución respecto a la dieta control (92.9%) con solo minerales inorgánicos. Ray *et al.* (2014) reportaron una tasa de viabilidad (98.6%) mayor en el grupo de aves en cuya dieta se sustituyó el 50% de las fuentes inorgánicas de zinc, cobre, y manganeso, en comparación con la viabilidad (92.9%) del grupo de aves alimentadas con la dieta control sin inclusión de minerales orgánicos.

En este estudio, la sustitución del 100% del cobre, zinc y selenio inorgánicos por minerales quelatados (T4) dio lugar a una tasa de viabilidad inferior (95,0%) en comparación con T3, pero superior al tratamiento T1. Teniendo en cuenta estos resultados, el cálculo de la dosis óptima se complementó mediante regresión lineal. Este análisis determinó que la sustitución del 57.4% de los minerales inorgánicos por cobre, zinc y selenio quelatados representa la dosis fisiológica óptima para maximizar los beneficios en términos de tasa de viabilidad.

La viabilidad es un parámetro productivo de gran importancia económica y de bienestar animal (Echeverry *et al.*, 2016). Una mejoría en esta variable podría estar fundamentada en el aumento del sistema inmunitario y la consecuente resistencia a enfermedades en las aves, ya que de este efecto benéfico sobre dichas características por parte de los minerales

orgánicos se encuentran diversos antecedentes (Świątkiewicz *et al.*, 2014; Echeverry *et al.*, 2016).

En diversos estudios se han reportado mejoras en el rendimiento productivo de aves de corral al utilizar minerales orgánicos en comparación con minerales inorgánicos. Por ejemplo, El-Husseiny *et al.* (2012) encontraron que reemplazar parcialmente los minerales inorgánicos por orgánicos en la dieta de pollitos de engorda mejoró significativamente el peso de las aves y la ganancia de peso. De manera similar, Feng *et al.* (2010) reportaron que pollos de engorda que recibieron alimentos con 120 mg de glicinato de zinc (Zn-Gly)/kg, presentaban un mayor aumento de peso diario y una mejor eficiencia alimenticia frente a la fuente inorgánica de zinc; sin embargo, en la presente investigación no se registraron diferencias en la eficiencia alimenticia.

Los estudios de Abdallah *et al.* (2009), Zhao *et al.* (2010) y Rao *et al.* (2016), también reportaron mejoras en el rendimiento productivo de pollos de engorda que fueron alimentados con dietas que contenían minerales orgánicos en lugar de inorgánicos. La mejora en los datos productivos observada con la sustitución parcial de minerales orgánicos se atribuye generalmente a una mayor biodisponibilidad y absorción de estos minerales en comparación con las formas inorgánicas (Ao y Pierce, 2013).

Los minerales orgánicos son más estables en el tracto gastrointestinal porque su unión a moléculas orgánicas evita interacciones indeseadas, mejora su solubilidad y reduce la competencia con otros minerales por los transportadores intestinales, lo que permite que puedan tener una mayor capacidad de atravesar las membranas celulares y consecuentemente una mayor absorción de nutrientes y una mejor utilización de los mismos por el organismo (Bao *et al.*, 2009; Goff, 2018).

Sin embargo, los resultados de investigaciones de Ray *et al.* (2014) difieren con ello, pues reportan resultados similares en el peso vivo y GDP entre los grupos de codornices japonesas alimentados con diferentes niveles de sustitución de zinc, cobre y manganeso inorgánico por orgánico.

Existen múltiples mecanismos en los que están involucrados los minerales de zinc, cobre, y selenio. En primer lugar, el zinc está involucrado en el crecimiento, metabolismo, sistema inmune y cicatrización, formando parte de la enzima antioxidante superóxido dismutasa (Suttle, 2010). El cobre interviene en el desarrollo óseo y de tejidos, es componente de metalo-enzimas antioxidantes como la citocromo oxidasa y superóxido dismutasa, además de mejorar la respuesta inmune (Sharma *et al.*, 2005). Selenio es esencial en las seleno-proteínas como glutatión peroxidasa, las cuales protegen contra el daño oxidativo al eliminar radicales libres y preservar la integridad celular (Wang, 2008).

La tasa de utilización de MS, proteína, energía, manganeso y zinc registrada en el presente trabajo en codornices en crecimiento fue similar entre tratamientos. Estos resultados son consistentes con lo reportado por Zhao *et al.* (2010), quienes no encontraron efectos significativos de la suplementación de minerales orgánicos en la utilización de nutrientes en aves. En el presente trabajo se registraron diferencias significativas en la tasa de utilización del cobre y el hierro, lo que sugiere que la fuente mineral (orgánica o inorgánica) puede afectar la absorción y utilización del propio mineral, así como la de otros minerales y nutrientes (Goff, 2018). Lo anterior concuerda con estudios previos que han reportado en aves una mayor biodisponibilidad y absorción de minerales orgánicos en comparación con las formas inorgánicas (Ao y Pierce, 2013; Vieira *et al.*, 2020; Khatun *et al.*, 2019).

La tasa de utilización del hierro registrada en este estudio fue significativamente mayor en el tratamiento T4 en comparación con T2. Esto podría sugerir una mejora en la absorción del hierro cuando se suplementa con mayor proporción de fuentes orgánicas de minerales (Goff, 2018), eventualmente como consecuencia de menos interacciones negativas entre minerales (Goff, 2018., Khatun *et al.*, 2019).

En este estudio se detectó un incremento significativo en el peso de la tibia de codornices en crecimiento, al incluir fuentes orgánicas de minerales a la dieta, respecto al tratamiento control. El peso de la tibia se ha utilizado frecuentemente en la nutrición mineral de aves de producción como un indicador de la salud ósea (Shim, 2012). Esto sugiere un efecto estimulante de estos minerales traza en el desarrollo óseo, considerando que, además de

los macrominerales como el calcio y el fósforo, la disponibilidad de minerales traza (Cu, Zn, Se, Mn, Fe) son cruciales para el desarrollo óseo (Yenice *et al.*, 2015).

El zinc tiene función importante en el anabolismo óseo, incrementando la actividad de osteoblastos, así como en la síntesis de colágeno y reduciendo la resorción ósea mediada por osteoclastos (Gaffney, 2019). El cobre, por su parte, es un cofactor esencial para la superóxido dismutasa, una enzima antioxidante que disminuye la activación de los osteoclastos y la resorción ósea (Goff, 2018). El selenio, debido a su capacidad antioxidante, reduce la presencia de especies reactivas de oxígeno, inhibiendo de esta forma la activación de los osteoclastos y favoreciendo la diferenciación de los osteoblastos (Goff, 2018; Gaffney, 2019).

El efecto positivo de los minerales orgánicos no se observó en las variables largo y ancho de la tibia. También El-Husseiny *et al.* (2012), informaron que pollos de engorda en crecimiento a los que se les ofreció una dieta con sustitución de 50% de Zn, Mn y Cu con fuentes orgánicas no tuvieron ningún efecto sobre las variables morfológicas de la tibia. Las mediciones histomorfológicas de este estudio indican que la altura de las vellosidades fue mayor en el duodeno y disminuyó progresivamente en dirección caudal a lo largo del intestino delgado. Wilkinson *et al.* (2018), analizaron mediante microscopía óptica y electrónica de barrido cortes intestinales de codornices japonesas sanas, y observaron que la altura de las vellosidades alcanza su máximo en el yeyuno, reduciéndose gradualmente hasta ser más cortas y menos profundas en el íleon.

Los valores de longitud de vellosidades correspondientes al tratamiento T3 del presente estudio (665 μm en duodeno y 550 μm en yeyuno) superan los reportados por Rezaei *et al.* (2018), quienes registraron alturas de vellosidades entre 470 y 530 μm al agregar diferentes niveles de fibra de trigo micronizada a las dietas de codornices japonesas en crecimiento.

El tratamiento T4 mejoró significativamente la altura de las vellosidades en el yeyuno (555 μm), mientras que el tratamiento T2 lo hizo en el íleon (406 μm). El incremento en

la altura de las vellosidades está asociado con una mejor digestión y absorción de nutrientes, así como con un aumento en la actividad de las enzimas del borde de cepillo y los sistemas de transporte de nutrientes (Awad *et al.*, 2017).

Una superficie intestinal saludable está relacionada en forma directa con la eficiencia en la digestión y absorción (Collett, 2012), y, por ende, con el aumento de peso y la resistencia a afecciones intestinales. Por lo tanto, las mejoras en las características morfológicas de las vellosidades observadas en las codornices del grupo T3 podrían explicar en parte el aumento en el peso vivo, la ganancia de peso diario y la mejor salud general debido a la mayor viabilidad obtenida en este grupo de aves.

El ancho de las vellosidades en el íleon disminuyó significativamente en las aves del grupo T1, lo que podría indicar una morfología intestinal menos favorable para la absorción de nutrientes. Los tratamientos con algún nivel de sustitución de minerales orgánicos beneficiaron el ancho de las vellosidades, aumentando la superficie para la absorción (Awad *et al.*, 2017), sin embargo, los segmentos de duodeno y yeyuno el ancho de vellosidades fue similar entre tratamientos.

En las aves del tratamiento T2, la profundidad de la cripta fue menor en el duodeno (58 μm) y en el yeyuno (48 μm), que, en los demás tratamientos, sugiriendo esto una mayor tasa de renovación celular y migración de células de la cripta hacia el epitelio (Xie *et al.*, 2021). Esto es beneficioso para la eficiencia de absorción de nutrientes de las aves, ya que las células epiteliales de las vellosidades están en contacto directo con el contenido luminal y son susceptibles a daños, como puede resultar una mayor pérdida de células epiteliales en casos de problemas de salud intestinal (Zhang *et al.*, 2015).

7.5. Conclusiones Experimento 2

Sustituir las fuentes inorgánicas de cobre, zinc y selenio por formas quelatadas en la dieta de las codornices representa una estrategia nutricional efectiva para mejorar el rendimiento, la viabilidad, el desarrollo óseo tibial y la histomorfología intestinal. Entre los

cuatro niveles de sustitución evaluados, un reemplazo del 67% (OM67) mostró los mejores resultados en productividad y salud. Estos hallazgos están muy cerca del valor calculado como dosis fisiológica óptima, que es del 57.4% y demuestran que los minerales quelatados de cobre, zinc y selenio tienen un alto potencial para ser integrado en fórmulas de piensos comerciales, mejorando la productividad, la salud aviar y promoviendo un uso más eficiente de los recursos minerales en la industria.

VIII. EXPERIMENTO 3.

EFECTO COMBINADO DE LA INCLUSIÓN DE LEVADURA *Saccharomyces cerevisiae* Y LA SUSTITUCIÓN DE MINERALES INORGÁNICOS DE COBRE, ZINC Y SELENIO POR SUS FORMAS QUELATADAS EN LA DIETA DE CODORNICES EN CRECIMIENTO

8.1. Objetivo

Evaluar el efecto combinado de la adición de levadura *Saccharomyces cerevisiae* y de los minerales quelatados de cobre, zinc y selenio en la dieta de codornices japonesas en crecimiento sobre el rendimiento productivo, morfología de la tibia y abundancia relativa en microbiota intestinal de los géneros *Lactobacillus spp.*, *Bifidobacterium spp.*, y *Bacillus spp.*

8.2. Materiales y métodos

8.2.1. Ubicación y diseño experimental

La fase experimental se llevó a cabo en las instalaciones del Campus Escobedo de la Facultad de Agronomía UANL, ubicadas en Gral. Escobedo, Nuevo León, México. Se utilizó un diseño factorial 2 x 2 para evaluar dos niveles de adición de levadura viva (0 % y 0.45 % de levadura *Saccharomyces cerevisiae* con base en MS y dos niveles de sustitución de minerales quelatados (0 % y 67 % de sustitución de fuentes inorgánicas de cobre, zinc y selenio por fuentes de minerales quelatados) en la dieta de codornices en crecimiento.

Los niveles seleccionados en este experimento para ambos factores (levadura y minerales quelatados) correspondieron a los tratamientos con mejor rendimiento identificados previamente: el nivel óptimo de levadura viva del Experimento 1 y el nivel óptimo de minerales quelatados del Experimento 2.

Se realizó un bloqueo por peso vivo de las codornices, en los cuales se consideró un rango de peso para realizar la distribución de las aves y asignación de los tratamientos conformando 5 bloques. El experimento tuvo una fase de evaluación de 4 semanas, que inició cuando las aves tuvieron una edad inicial de 18 días.

Fueron destinadas un total de 179 codornices japonesas, las cuales fueron asignadas a 4 tratamientos, con 5 repeticiones por tratamiento en baterías de investigación (Figura 2, en experimento 1). Cada repetición fue conformada por entre 8-9 aves, excepto en el bloque 1 (las aves más pequeñas) en el que al iniciar el experimento se incluyeron 11 aves por jaula.). El experimento se dividió en dos etapas con su dieta correspondiente.

La primera etapa fue la de Iniciación, cuya dieta (Cuadro 12), fue ofrecida a las aves durante las 2 primeras semanas de experimento. La segunda etapa fue la de Desarrollo (Cuadro 13), esta dieta fue formulada según las necesidades nutrimentales de la fase de desarrollo.

8.2.2. Determinación del rendimiento productivo

En este experimento 3 se midieron variables productivas como el peso vivo, ganancia diaria de peso, el consumo de alimento, la eficiencia alimenticia y la tasa de viabilidad similar a lo descrito en Experimento 1 y 2.

8.2.3. Análisis morfológico de tibias

Se utilizó la metodología descrita en el Experimento 2 para el análisis de variables de morfología de la tibia.

Cuadro 12. Dietas experimentales en la etapa de Iniciación (10-24 días de edad) de codornices en crecimiento.

| Factor | T1 | T2 | T3 | T4 |
|--|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Mineral Quelatado | 0 | + | 0 | + |
| Levadura <i>S. cerevisiae</i> | 0 | 0 | + | + |
| Maíz | 522.00 | 522.00 | 522.00 | 522.00 |
| Harina de soya | 414.00 | 414.00 | 409.50 | 409.50 |
| Levadura (Base seca) | 0.00 | 0.00 | 4.50 | 4.50 |
| Aceite vegetal | 35.00 | 35.00 | 35.00 | 35.00 |
| Fosfato Monocálcico | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 |
| Carbonato de Calcio | 19.55 | 19.32 | 19.55 | 19.32 |
| Sal | 4.00 | 4.00 | 4.00 | 4.00 |
| Metionina (99%) | 2.70 | 2.70 | 2.70 | 2.70 |
| Sulfato ferroso (30% Fe) | 0.14 | 0.14 | 0.14 | 0.14 |
| Óxido de Manganeso (60% Mn) | 0.20 | 0.20 | 0.20 | 0.20 |
| Sulfato de cobre (25% Cu) | 0.04 | 0.01 | 0.04 | 0.01 |
| Sulfato de Zinc (36% Zn) | 0.20 | 0.07 | 0.20 | 0.07 |
| Selenito de sodio (1% Se) | 0.02 | 0.01 | 0.02 | 0.01 |
| EDDI (10% I) | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 |
| Optimín Cobre (15% Cu Quelatado) | 0.00 | 0.04 | 0.00 | 0.04 |
| Optimín Zinc (15% Zn Quelatado) | 0.00 | 0.32 | 0.00 | 0.32 |
| Optimín SeY (3000 ppm Se Quelat) | 0.00 | 0.04 | 0.00 | 0.04 |
| Cloruro de colina | 0.90 | 0.90 | 0.90 | 0.90 |
| Núcleo Vitamínico (250 g/ton) | 0.25 | 0.25 | 0.25 | 0.25 |
| Total | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 |
| <i>Composición química analizada (base seca)</i> | | | | |
| MS, % | 89.43 | 89.50 | 85.81 | 86.54 |
| Cenizas, % | 7.33 | 6.91 | 6.81 | 7.27 |
| Grasa, % | 1.31 | 1.44 | 1.52 | 1.35 |
| FDN, % | 11.34 | 12.59 | 12.92 | 13.53 |
| FDA, % | 3.24 | 3.94 | 4.63 | 3.62 |
| Lignina, % | 1.04 | 1.70 | 1.10 | 1.42 |
| Hemicelulosa, % | 8.10 | 8.65 | 8.29 | 9.90 |
| Celulosa, % | 2.12 | 2.24 | 3.52 | 2.20 |
| Proteína, % | 32.80 | 30.87 | 32.65 | 33.19 |
| Energía, kcal | 5177 | 5026 | 5111 | 5079 |

(0) = sin sustitución/suplementación, (+) = con sustitución/suplementación

Cuadro 13. Dietas experimentales en la etapa de Desarrollo (25-39 días de edad) de codornices en crecimiento.

| Factor | T1 | T2 | T3 | T4 |
|--|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Mineral Quelatado | 0 | + | 0 | + |
| Levadura <i>S. cerevisiae</i> | 0 | 0 | + | + |
| Maíz | 610.50 | 610.50 | 610.00 | 610.00 |
| Harina de soya | 340.00 | 340.00 | 336.00 | 336.00 |
| PlasYeast NA | 0.00 | 0.00 | 4.50 | 4.50 |
| Aceite vegetal | 19.96 | 19.72 | 19.96 | 19.72 |
| Fosfato Monocálcico | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 |
| Carbonato de Calcio | 18.60 | 18.60 | 18.60 | 18.60 |
| Sal | 4.00 | 4.00 | 4.00 | 4.00 |
| Lisina (78%) | 1.30 | 1.30 | 1.30 | 1.30 |
| Metionina (99%) | 2.40 | 2.40 | 2.40 | 2.40 |
| Treonina (99%) | 0.50 | 0.50 | 0.50 | 0.50 |
| Sulfato ferroso (30% Fe) | 0.14 | 0.14 | 0.14 | 0.14 |
| Óxido de Manganeso (60% Mn) | 0.20 | 0.20 | 0.20 | 0.20 |
| Sulfato de cobre (25% Cu) | 0.04 | 0.01 | 0.04 | 0.01 |
| Sulfato de Zinc (36% Zn) | 0.20 | 0.07 | 0.20 | 0.07 |
| Selenito de sodio (1% Se) | 0.02 | 0.01 | 0.02 | 0.01 |
| EDDI (10% I) | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 |
| Optimín Cobre (15% Cu Quelatado) | 0.00 | 0.04 | 0.00 | 0.04 |
| Optimín Zinc (15% Zn Quelatado) | 0.00 | 0.32 | 0.00 | 0.32 |
| Optimín SeY (3000 ppm Se Quelat) | 0.00 | 0.04 | 0.00 | 0.04 |
| Cloruro de colina | 0.90 | 0.90 | 0.90 | 0.90 |
| Núcleo Vitamínico (250 g/ton) | 0.25 | 0.25 | 0.25 | 0.25 |
| Total | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 |
| <i>Composición química analizada (base seca)</i> | | | | |
| MS, % | 88.97 | 88.90 | 85.60 | 85.65 |
| Cenizas, % | 6.70 | 6.44 | 6.92 | 5.70 |
| Grasa, % | 1.48 | 1.59 | 1.29 | 1.40 |
| FDN, % | 12.60 | 12.40 | 12.53 | 12.45 |
| FDA, % | 3.95 | 3.65 | 4.63 | 4.48 |
| Lignina, % | 1.77 | 0.98 | 1.36 | 1.25 |
| Hemicelulosa, % | 8.65 | 8.74 | 7.90 | 7.97 |
| Celulosa, % | 2.17 | 2.67 | 3.27 | 3.23 |
| Proteína, % | 27.45 | 28.04 | 28.05 | 28.80 |
| Energía, kcal | 4113 | 4489 | 4386 | 4218 |

(0)= sin sustitución/suplementación, (+) = con sustitución/suplementación

8.2.4. Cuantificación de abundancia relativa de géneros en microbiota intestinal

8.2.4.1. Obtención de muestras de contenido de los ciegos

Se analizó la microbiota intestinal a partir de muestras de contenido de cada par de ciegos de cada ave. Para ello, se tomaron muestras de 40 codornices macho seleccionadas al azar (n=10 por tratamiento), sacrificadas a los 53 días de edad. El contenido intestinal de los ciegos fue vertido en viales Eppendorf de 1.5 mL con tapa, y se conservaron a -20 °C hasta su análisis.

8.2.4.2. Extracción y purificación de ADN de muestras de contenido cecal

Posteriormente, se pesaron entre 10 y 20 mg de muestra de dichas muestras y se depositaron en tubos Eppendorf de 2 ml. Posteriormente, se añadieron 1000 µl de DNAzol® (Invitrogen, USA) y se agitó la mezcla con una puntilla para disolver completamente. La solución se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente, mezclándola por inmersión cada 2 minutos. Luego, se centrifugó a 10 RPM durante 2 minutos, y se recuperaron 800 µl del sobrenadante, los cuales se precipitaron con 500 µl de etanol al 100 %, mezclando nuevamente por inmersión. La mezcla se incubó durante 3 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 10 RPM por 10 minutos. Se descartó el sobrenadante y se lavó el pellet con 800 µl de etanol al 75 %, incubando 1 minuto a temperatura ambiente y centrifugando nuevamente a 10 RPM durante 10 minutos. Este proceso de lavado se repitió según fuera necesario, dependiendo de la limpieza y el aspecto del pellet.

Una vez limpio, se eliminó el sobrenadante y se dejó secar el pellet durante 5 minutos. Según el tamaño y la limpieza del pellet, se añadieron entre 20 y 50 µl de agua DEPC, agitándose la mezcla con una puntilla para facilitar la disolución, seguido de una centrifugación breve de 10 segundos. A continuación, se mezclaron 3 µl de buffer de corrida con 8 µl del extracto obtenido, homogenizando con la puntilla. Se tomaron 10 µl de esta mezcla y se depositaron en un pozo del gel de electroforesis configurado a 80 V durante 30 minutos, y se inició el proceso con el fin de observar las condiciones de integridad del

ADN purificado. Esto permitió determinar que las muestras de contenido cecal viables para la siguiente etapa correspondieron a un total de 16, con 4 muestras por tratamiento (1 muestra por ave).

8.2.4.3. Determinación de concentración y dilución de ADN genómico

La cuantificación de la concentración de ADN se llevó a cabo en un espectrómetro (Genesys 50, Thermo Scientific, EEUU) mediante mediciones de absorbancia a 260 nm. Primero, se rotularon tubos estériles con el ID correspondiente a cada muestra de ADN para realizar las diluciones necesarias. Cada dilución se preparó mezclando 597 μl de agua destilada con 3 μl de la muestra de ADN. Posteriormente, se encendió el equipo siguiendo las instrucciones del fabricante. Como primer paso, se midió el blanco utilizando una cubeta con 600 μl de agua destilada, realizando dos mediciones por cada muestra. Después, se repitió el proceso utilizando 600 μl de la dilución preparada para medir la absorbancia. Entre cada medición, se lavó cuidadosamente la cubeta con agua destilada para evitar contaminación entre muestras. Las diluciones a 50 $\text{ng}/\mu\text{l}$ se realizaron a partir de las lecturas de espectrometría anteriores, siguiendo la metodología que se describe en la Figura 7.

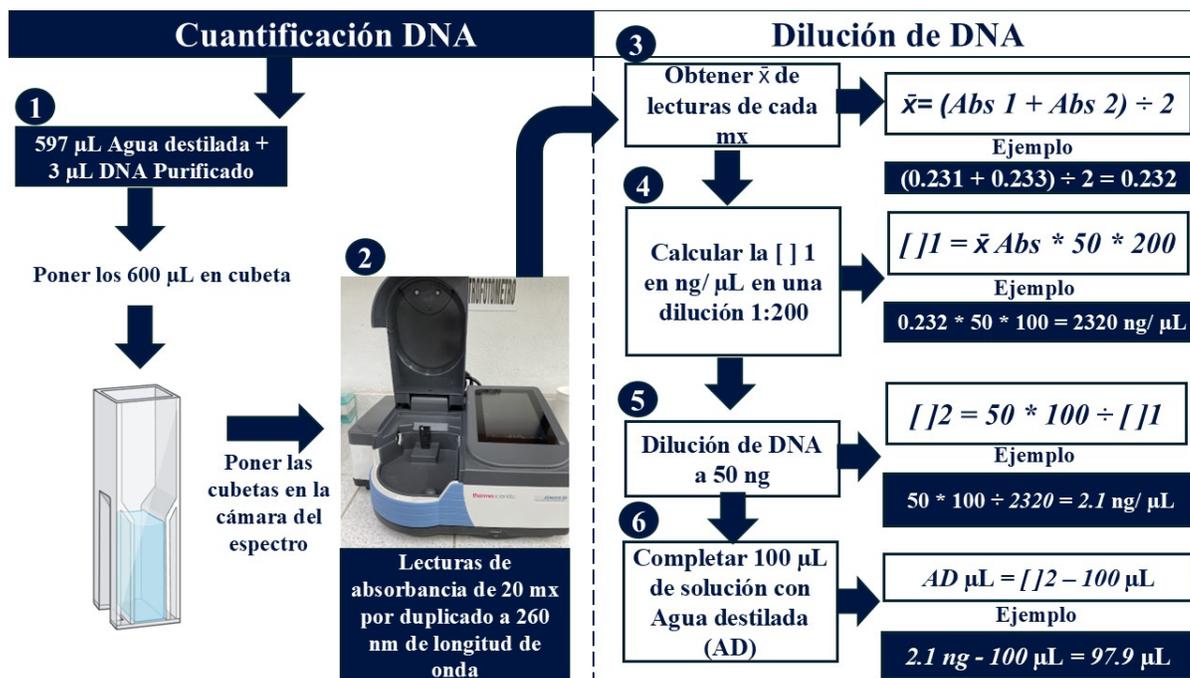


Figura 7. Determinación de concentración y dilución de ADN genómico.

8.2.4.4. Cuantificación de la abundancia relativa en microbiota intestinal por qPCR

Se emplearon oligonucleótidos específicos para identificar y cuantificar la presencia de *Lactobacillus sp.*, *Bacillus sp.*, *Bifidobacterium sp.* y el total de bacterias (ADN ribosomal 16S). Este último se utilizó como referencia para normalizar las variaciones en la cantidad de ADN. Las secuencias de los oligonucleótidos y sus referencias originales están detalladas en el Cuadro 14. La abundancia de los microorganismos se determinó mediante ensayos de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR) donde fue utilizado el kit comercial Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific).

Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador CFX96® Real-Time System C1000 Touch (BioRad, Herefordshire, Inglaterra) en microtubos de 200 µl con tapas ópticas (BioRad), con un volumen final de 25 µl. Cada reacción contenía 12.5 µl de SYBR Green Mix, 8.5 µl de agua libre de nucleasas, 3 µl de una mezcla de oligonucleótidos (Oligo Mix) con oligonucleótidos específicos en sentido y antisentido a una concentración de 5 µM cada uno, y 1 µl de ADN genómico a una concentración de 50 ng/µl. Todas las muestras se analizaron por duplicado junto con las bacterias totales (ARN ribosomal 16S) como referencia.

Se incluyeron controles negativos (blancos) por duplicado (Cuadro 15). El blanco 1 (SIN ADN) excluye el ADN de la mezcla, lo que permite descartar la contaminación por ADN en los reactivos o el equipo, y contiene 9.5 µl de agua DEPC, 12.5 µl de mezcla SYBR y 3.0 µl de oligo mix. El blanco 2 (SIN OLIGO) omite los oligonucleótidos específicos, lo que ayuda a confirmar que no haya amplificación inespecífica, y está compuesto por 11.5 µl de agua DEPC, 12.5 µl de mezcla SYBR y 1.0 µl de ADN a una concentración de 50 ng/µl.

Cuadro 14. Secuencias de oligonucleótidos utilizados para el análisis de abundancia relativa de microorganismos en contenido intestinal de codornices en crecimiento.

| Microorganismo | Secuencia | Fragmento amplificado (pb) | T° alineación (°C) | Referencia |
|-----------------------------|------------------------|----------------------------|--------------------|---------------------------------|
| <i>Lactobacillus spp.</i> | | | | |
| Sentido | CGATGAGTGCTAGGTGTTGGA | 186 | 56 | (Fu <i>et al.</i> , 2006) |
| Anti-sentido | CAAGATGTCAAGACCTGGTAAG | | | |
| <i>Bacillus spp.</i> | | | | |
| Sentido | ACGCCGTAAACGATGAGT | 424 | 60 | (Han <i>et al.</i> , 2012) |
| Anti-sentido | GTGTGTAGCCCAGGTCATAA | | | |
| <i>Bifidobacterium spp.</i> | | | | |
| Sentido | GATTCTGGCTCAGGATGAACG | 1400 | 56 | (Kaufmann <i>et al.</i> , 1997) |
| Anti-sentido | CGGGTGCTNCCCACCTTTCATG | | | |
| Bacterias totales | | | | |
| Sentido | GCAGGCCTAACACATGCAAGTC | 315 | 56 | Wong <i>et al.</i> , 2017 |
| Anti-sentido | CTGCTGCCTCCCGTAGGAGT | | | |

Por último, el blanco 3 (SIN SYBR) elimina la mezcla SYBR, excluyendo el marcador fluorescente para verificar que las señales de fluorescencia provengan únicamente de la amplificación, y contiene 21.0 µl de agua DEPC, 3.0 µl de oligo mix y 1.0 µl de ADN a una concentración de 50 ng/µl. Estos controles fueron importantes y considerados para garantizar que los resultados obtenidos fueran específicos.

El programa de reacción en el termociclador consistió en una desnaturalización inicial a 95 °C por 5 minutos, seguida de 44 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 15 segundos, alineación a una temperatura de 54-60 °C por 15 segundos y extensión a 72 °C por 30 segundos. La fluorescencia se midió al final de cada ciclo, y se realizó una curva de desnaturalización desde 65 °C hasta 95 °C, registrando la fluorescencia cada 0.5 °C. La abundancia relativa de los microorganismos se calculó siguiendo la metodología de Livak y Schmittgen (2001), utilizando la ecuación de diferencia del ciclo crítico de amplificación ($2^{-\Delta\Delta C_T}$).

Cuadro 15. Conformación de los controles negativos.

| Control Negativo | Componentes |
|-------------------------|---|
| | SIN ADN |
| Blanco 1 | 9.5 µl agua DEPC 12.5 µl sybr 3.0 µl oligo mix |
| | SIN OLIGO |
| Blanco 2 | 11.5 µl agua DEPC 12.5 µl sybr 1.0 ADN (50 ng/µl) |
| | SIN SYBR |
| Blanco 3 | 21.0 µl agua DEPC 3.0 µl oligo mix 1.0 µl ADN (50 ng/µl) |

8.2.5. Consideraciones éticas

Los procedimientos de manejo y sacrificio de 40 aves macho, realizados mediante dislocación cervical, se llevaron a cabo estrictamente conforme a los lineamientos establecidos en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. La metodología fue previamente revisada y aprobada por los Comités de Bioética y Bienestar Animal, así como de Bioseguridad e Higiene de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Nuevo León, quienes emitieron el dictamen aprobatorio con el folio 33/2022 y número de resolución 44/2022, con fecha del 29 de abril de 2022.

8.2.6. Análisis estadístico.

El análisis estadístico se llevó a cabo mediante un análisis de varianza (ANOVA) para cada variable continua, donde también se consideraron los resultados de la abundancia relativa de ADN (expresados como diferencia de Ct). La comparación entre medias se efectuó utilizando la prueba de Tukey, estableciendo un nivel de confianza del 95% y empleando el software estadístico SPSS® en su versión 25. Para evaluar la viabilidad, se aplicó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. Se consideraron estadísticamente significativas las diferencias con un valor de probabilidad inferior a 0.05.

8.3. Resultados

8.3.1. Rendimiento productivo

Un análisis inicial de las variables productivas, mostradas en el Cuadro 16 mostró solamente tendencias numéricas aparentes entre los tratamientos. Esto sugirió que la variabilidad y otros factores podían estar interfiriendo para detectar diferencias reales entre los tratamientos.

Por lo anterior, se implementó un procedimiento de ajuste en los datos con el objetivo de revelar resultados más precisos. El primer paso consistió en estandarizar la base de datos ajustando las repeticiones de cada tratamiento a $n=8$ aves, y se expresaron los resultados como valores relativos de las variables respecto al promedio de los bloques correspondientes. Además, se realizó un análisis para detectar y eliminar valores atípicos (outliers) en cada variable evaluada, utilizando el método del rango inter-cuartiles descrito por Kumar Dash *et al.* (2023). Finalmente, se volvieron a analizar los valores relativos de las variables productivas con esta base de datos ajustada. Este enfoque permitió evidenciar diferencias significativas entre los factores evaluados que no habían sido detectadas en el análisis inicial, mostrando un efecto importante de los tratamientos en las variables analizadas (Cuadro 17).

Las dietas que contenían los factores minerales quelatados y levadura *Saccharomyces cerevisiae* tuvieron un impacto favorable en las variables productivas evaluadas de las codornices en crecimiento. En el caso del peso vivo, las aves suplementadas con factor levadura *S. cerevisiae* mostraron valores relativos significativamente más altos (Pesos relativos = 101.05; $P < 0.05$) en comparación con 99.15 de las no suplementadas con levadura *Saccharomyces cerevisiae*. La inclusión de minerales quelatados no tuvo un efecto significativo en esta variable ($P > 0.05$).

Cuadro 16. Rendimiento productivo promedio y desviación estándar (SD) de codornices en crecimiento en cada tratamiento.

| Factor | T1 | T2 | T3 | T4 |
|-------------------------------|--------|--------|--------|--------|
| Mineral Quelatado | 0 | + | 0 | + |
| Levadura <i>S. cerevisiae</i> | 0 | 0 | + | + |
| Peso vivo, g | 106.03 | 102.61 | 109.88 | 110.20 |
| SD | 40.37 | 43.38 | 41.89 | 41.57 |
| GDP, g | 3.76 | 3.99 | 3.89 | 3.89 |
| SD | 0.81 | 0.62 | 0.75 | 0.95 |
| Consumo alimento, g | 15.73 | 15.10 | 16.76 | 17.48 |
| SD | 4.77 | 4.82 | 4.22 | 4.64 |
| Eficiencia alimenticia, g/g | 0.268 | 0.297 | 0.252 | 0.246 |
| SD | 0.113 | 0.121 | 0.092 | 0.102 |

(0) = sin sustitución/suplementación, (+) = con sustitución/suplementación

SD = Desviación estándar

Respecto a la ganancia diaria de peso, la interacción entre los factores minerales quelatados* levadura *S. cerevisiae* fue no significativa ($P > 0.05$). Tanto el factor levadura *S. cerevisiae* como factor Mineral quelatado influyeron significativamente ($P < 0.05$), siendo las codornices suplementadas con factor levadura *S. cerevisiae* las aves con mayor ganancia diaria de peso (103.66 con levadura *S. cerevisiae* frente a 100.58 en tratamientos sin levadura (Cuadro 17). Las codornices tratadas con factor de minerales quelatados también presentaron mejores resultados (Valor relativo 104.16; $P < 0.05$) que sin inclusión de minerales quelatados (100.29).

En el caso del consumo de alimento se detectó una interacción significativa ($P < 0.05$) de los factores minerales quelatados * levadura *S. cerevisiae*. Con adición de minerales quelatados a la dieta, la inclusión de levadura registró un mayor efecto estimulante del consumo de alimento, que sin la adición de minerales quelatados.

En cuanto a la eficiencia alimenticia la interacción entre los factores minerales quelatados * levadura *S. cerevisiae* fue no significativa ($P > 0.05$) (Cuadro 17). el factor levadura tuvo un efecto significativo ($P < 0.05$), observándose mejor eficiencia ($P < 0.05$) en las aves sin

inclusión de levadura *S. cerevisiae* (106.98) en comparación con las suplementadas (95.40). En cambio, la eficiencia alimenticia fue similar ($P > 0.05$) para las aves respecto al factor minerales quelatados.

Cuadro 17. Rendimiento productivo relativo al promedio del bloque correspondiente, de codornices alimentadas con una sustitución de minerales inorgánicos de Cu, Zn, y Se y la suplementación con levadura *S. cerevisiae* en la dieta de codornices en crecimiento.

| Factor | | Variable productiva ¹ | | | | | | | |
|--|--------------|----------------------------------|-----------|----|---------|----|---------------------|----|------------------------|
| Minerales quelatados | Levadura LSC | n | Peso vivo | n | GDP | n | Consumo de alimento | n | Eficiencia alimenticia |
| Sin MQ | Sin LSC | 24 | 98.94 | 17 | 98.90 | 20 | 96.13 | 19 | 102.95 |
| Con MQ | Sin LSC | 25 | 99.35 | 17 | 102.25 | 20 | 91.86 | 19 | 111.02 |
| Sin MQ | Con LSC | 25 | 100.78 | 19 | 101.53 | 20 | 103.93 | 20 | 102.95 |
| Con MQ | Con LSC | 23 | 101.35 | 16 | 106.20 | 20 | 108.06 | 18 | 95.03 |
| Media de efectos principales | | 97 | 100.09 | 69 | 102.14 | 80 | 100.00 | 76 | 101.19 |
| Factor MQ | | | | | | | | | |
| | Sin MQ | 49 | 99.88 | 36 | 100.29b | 40 | 100.03 | 39 | 99.25 |
| | Con MQ | 48 | 100.31 | 33 | 104.16a | 40 | 99.97 | 37 | 103.24 |
| Factor LSC | | | | | | | | | |
| | Sin LSC | 49 | 99.15b | 34 | 100.58b | 40 | 93.99b | 38 | 106.98a |
| | Con LSC | 48 | 101.05a | 35 | 103.66a | 40 | 106.00a | 38 | 95.40b |
| SEM | | | 1.0846 | | 2.9540 | | 3.9826 | | 4.9226 |
| Probabilidades de efectos principales (<i>P value</i>) | | | | | | | | | |
| Factor MQ | | | 0.325 | | 0.014 | | 0.974 | | 0.150 |
| Factor LSC | | | 0.000 | | 0.043 | | 0.000 | | 0.000 |
| Factor MQ*LSC | | | 0.865 | | 0.679 | | 0.038 | | 0.087 |

¹Medias de n = 5 réplicas por tratamiento (n = 8 aves/replica)

(Sin) = sin sustitución/suplementación, (Con) = con sustitución/suplementación

MQ = Minerales quelatados, LSC = Levadura *Saccharomyces cerevisiae*

EEM = Error estándar de la media

^{a,b} Medias en una columna con diferentes superíndices difieren ($P < 0.05$)

La tasa de viabilidad promedio de las codornices durante el periodo experimental de 4 semanas (Figura 8) no mostró diferencias significativas entre los tratamientos ($P > 0.05$).

Se registraron tasas de viabilidad del 99.6% en el tratamiento sin factor minerales quelatados ni factor levadura (T1), 98.4% en el tratamiento con solo el factor minerales quelatados (T2), y 100% tanto en el tratamiento con únicamente levadura (T3) como en el tratamiento combinado con ambos factores (T4).

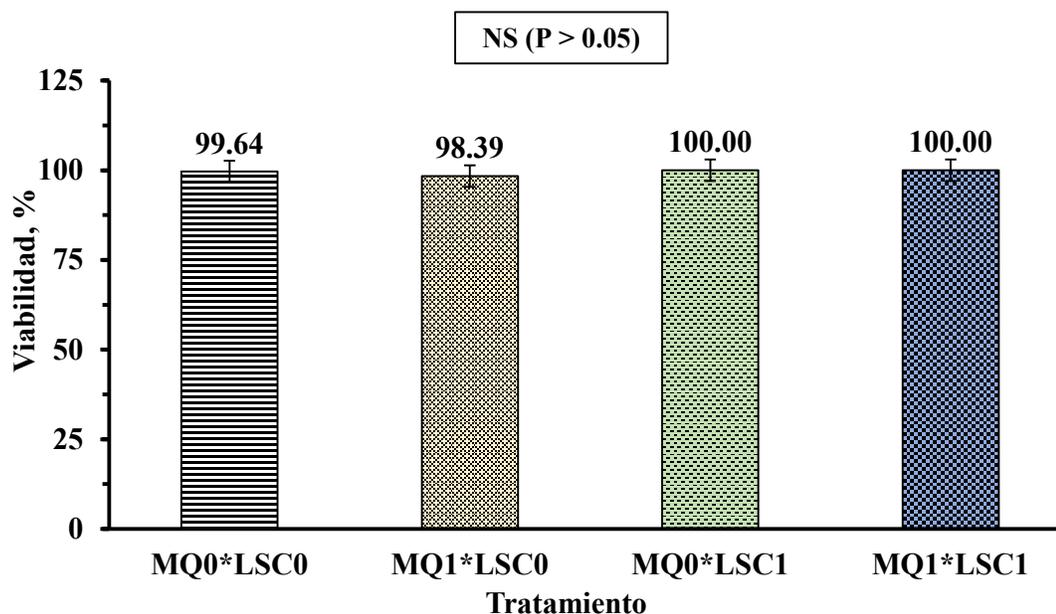


Figura 8. Tasa de viabilidad de codornices en crecimiento de Experimento 3. n = 25

8.3.2. Morfología de tibias

Los resultados del análisis de la morfología de las tibias de codornices en crecimiento (Cuadro 18) muestra que con la adición del factor levadura *S. cerevisiae* se obtuvieron efectos positivos en el largo y la diáfisis de las tibias, con valores significativamente mayores ($P < 0.05$) en aves suplementadas con este factor en comparación con las no suplementadas.

Se encontró que la sustitución de minerales quelatados redujo ($P < 0.05$) el largo de las tibias (47.9 mm) frente a las que no recibieron minerales quelatados (49.0 mm; $P < 0.05$). No se observaron diferencias significativas ($P > 0.05$) en el peso, el ancho o la diáfisis por efecto de minerales quelatados ($P > 0.05$). Se identificó una interacción significativa ($P >$

0.05) solamente entre los factores minerales quelatados * levadura *Saccharomyces cerevisiae* para la variable ancho de las tibias

Cuadro 18. Morfología de la tibia de codornices en crecimiento.

| Factor | | Variable morfológica ¹ | | | | | | | |
|--|-----------------|-----------------------------------|------------|----|--------------|----|--------------|----|-----------------|
| Minerales que- latados | Levadura LSC | n | Peso, g | n | Largo, mm | n | Ancho, mm | n | Diáfisis, mm |
| Sin MQ | Sin LSC | 20 | 0.589 | 20 | 48.29 | 20 | 2.50 | 10 | 37.94 |
| Con MQ | Sin LSC | 17 | 0.630 | 17 | 47.48 | 17 | 2.59 | 17 | 36.84 |
| Sin MQ | Con LSC | 19 | 0.620 | 19 | 49.82 | 19 | 2.62 | 19 | 39.12 |
| Con MQ | Con LSC | 16 | 0.603 | 16 | 48.43 | 16 | 2.51 | 16 | 39.01 |
| Media de efectos principales | | 72 | 0.610 | 72 | 48.54 | 72 | 2.56 | 72 | 38.23 |
| Factor MQ | | | | | | | | | |
| | Sin MQ | 39 | 0.604 | 39 | 49.04a | 39 | 2.56 | 39 | 38.51 |
| | Con MQ | 33 | 0.617 | 33 | 47.94b | 33 | 2.55 | 33 | 37.90 |
| Factor LSC | | | | | | | | | |
| | Sin LSC | 37 | 0.608 | 37 | 47.92b | 37 | 2.55 | 37 | 37.44b |
| | Con LSC | 35 | 0.612 | 35 | 49.19a | 35 | 2.57 | 35 | 39.07a |
| SD | | | 0.070 | | 2.280 | | 0.237 | | 3.542 |
| Probabilidades de efectos principales (<i>P value</i>) | | | | | | | | | |
| Factor MQ | | | 0.524 | | 0.027 | | 0.777 | | 0.376 |
| Factor LSC | | | 0.916 | | 0.013 | | 0.713 | | 0.015 |
| Factor MQ*LSC | | | 0.130 | | 0.555 | | 0.013 | | 0.465 |

(Sin) = sin sustitución/suplementación, (Con) = con sustitución/suplementación

MQ = Minerales quelatados, LSC = Levadura *Saccharomyces cerevisiae*

^{a,b} Medias en una columna con diferentes superíndices difieren ($P < 0.05$)

8.3.3. Abundancia relativa de microorganismos en microbiota intestinal

Los cambios en la abundancia relativa de ADN para los microorganismos *Lactobacillus spp.*, *Bacillus spp.* y *Bifidobacterium spp.* en respuesta a la suplementación con minerales quelatados y levadura *Saccharomyces cerevisiae* se presentan en la Figura 9.

En el caso de *Lactobacillus spp.*, los resultados indican que las diferencias observadas entre tratamientos son estadísticamente significativas, siendo el tratamiento con mineral quelatado y levadura de manera individual los que presentaron una reducción en comparación con el grupo testigo, con valores de 0.47 y 0.39, respectivamente. Sin embargo, la combinación de ambos (mineral quelatado + levadura) resultó en un aumento significativo (1.29) respecto a los valores individuales y al grupo control.

Para *Bacillus spp.*, el mineral quelatado (1.05) y la levadura (2.09) presentaron valores mayores respecto al control (1.0), pero la combinación de ambos tratamientos mostró una disminución notable (0.62). No obstante, el análisis estadístico indica que estas diferencias no son significativas ($P = 0.524$).

Finalmente, en *Bifidobacterium spp.*, tanto el mineral quelatado (0.39) como la levadura (0.42) mostraron valores menores en comparación con el testigo (1.0). Sin embargo, la combinación de ambos tratamientos (2.12) incrementó ($P > 0.05$) considerablemente los valores, superando incluso al grupo control.

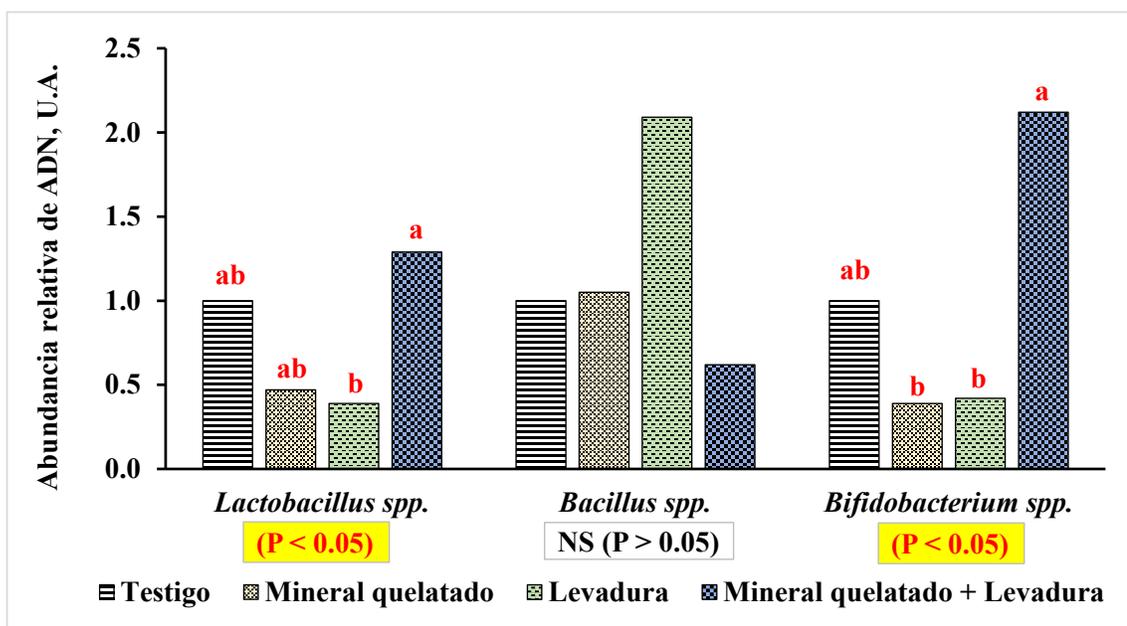


Figura 9. Abundancia relativa de ADN de los microorganismos objetivo en muestras de contenido cecal de codornices en respuesta al factor minerales quelatados y el factor levadura *S. cerevisiae*.

8.4. Discusión

En el estudio, se observaron valores relativos de pesos promedio a los 46 días más altos en las aves suplementadas con levadura *S. cerevisiae* al 0.45% (101.0 g) frente a aquellas sin levadura (99.1 g). Estos efectos positivos del factor levadura *S. cerevisiae* sobre el peso vivo concuerdan con los resultados reportados por El-Kelawy y Elnaggar (2016), quienes encontraron mejoras significativas en el crecimiento a 49 días de codornices japonesas suplementadas con 0.4% de *Saccharomyces cerevisiae* en la dieta, alcanzando pesos promedio de 228 g, en comparación con 199 g en aves sin suplementación.

En este estudio se observó un aumento en el consumo de alimento en aves suplementadas con levadura *S. cerevisiae* (106 g) en comparación con las no suplementadas (94 g). El-Kelawy y Elnaggar (2016) también reportaron un incremento significativo con suplementación de levadura, registrando valores de 791-808 g en aves suplementadas durante los días 14-49, frente a 774 g en aquellas sin suplementación. En pollos de engorda, Hoque *et al.* (2021) informaron que la suplementación con 1% de cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* incrementó el peso vivo entre los días 22 y 35 (1710 g en aves suplementadas frente a 1663 g en aves no suplementadas). Sin embargo, a diferencia de los resultados de este trabajo, no encontraron un efecto significativo en el consumo de alimento.

La eficiencia alimenticia reportada en este estudio fue menor en aves suplementadas con levadura *S. cerevisiae* (Valor relativo 95.4) en comparación con las no suplementadas (106.9). Esto contrasta con lo reportado por Hoque *et al.* (2021), quienes observaron que la suplementación con 1% de levadura mejoró la conversión alimenticia entre los días 22 y 35 de las aves que fueron suplementadas (1.658 g/g) frente a las no suplementadas (1.690 g/g).

La tasa de viabilidad observada en este estudio fue similar entre los tratamientos y no se vio afectada significativamente por los factores minerales quelatados o levadura *S. cerevisiae*. Sin embargo, estudios como el de Ray *et al.* (2014) reportaron una tasa de viabilidad superior (98.6%) en aves cuya dieta incluyó una sustitución del 50% de fuentes

orgánicas de zinc, cobre y manganeso, en comparación con el grupo alimentado con una dieta control sin inclusión de minerales orgánicos, que obtuvo una viabilidad del 92.9%. Quizá el hecho de que en el presente estudio incluso la viabilidad más baja registrada (98.39%) fue muy alta, haya contribuido a la ausencia de efecto significativo de la inclusión de levadura o de minerales quelatados para mejorar la viabilidad.

En este estudio, no se encontraron diferencias significativas en el peso de las tibias, cuyos valores oscilaron entre 0.59 y 0.60 g. Resultados similares (pesos de tibia entre 0.58 y 0.62 g, también sin diferencias estadísticas) fueron reportados por Muszynski *et al.* (2020), al suplementar dietas con 15 g/kg de *Saccharomyces cerevisiae* en codornices japonesas en crecimiento. Además, dichos autores no detectaron un efecto significativo en el largo de las tibias (46.0 - 46.3 mm). Sin embargo, en el presente trabajo, la suplementación con levadura mostró un efecto positivo en el largo de las tibias, registrándose valores significativamente mayores en las aves alimentadas con este factor (49.2 mm) en comparación con aquellas que no lo recibieron (47.9 mm).

Suzer *et al.* (2017) observaron que el peso y la longitud de la tibia en pollos de engorda fueron mayores en aves suplementadas con un 0.2 % y un 0.4 % de cultivo de levadura *Saccharomyces cerevisiae* en la dieta. Específicamente, reportaron un peso de tibia de 11.14 g en ambos niveles de suplementación, en comparación con 10.45 g en el grupo control. De manera similar, la longitud de la tibia fue superior en los grupos con 0.2 % y 0.4 % de levadura, con valores de 106.35 mm y 106.03 mm, respectivamente, frente a 103.77 mm en el grupo control.

Mecanismos por los cuales la levadura puede mejorar aspectos morfológicos del hueso, como el aumento del largo encontrado en este estudio, fueron propuestos por Ariyoshi *et al.* (2021), quienes evidencian que el β -glucano (polisacárido estructural de la pared celular) derivado de *Saccharomyces cerevisiae* puede suprimir la reabsorción ósea, a través de reducir la diferenciación de los osteoclastos y proteger contra la reabsorción ósea en modelos animales de osteoporosis y periodontitis (De O. Silva *et al.*, 2015, 2017). Además, múltiples investigaciones han demostrado que compuestos de β -glucanos son

eficaces para estimular la formación y regeneración ósea (Przekora y Ginalska., 2015; Klimek *et al.*, 2016).

En el presente estudio se observó un cambio significativo en la abundancia relativa de los géneros *Lactobacillus spp.* y *Bifidobacterium spp.*, dependiendo de los tratamientos empleados. De manera consistente con estos hallazgos, Mirza *et al.* (2020) informaron que el contenido de *Lactobacillus spp.* en muestras de contenido cecal de codornices japonesas en crecimiento aumentó significativamente en los grupos suplementados con un 1 % de *Saccharomyces cerevisiae*, en la dieta o en el agua de bebida. Los valores registrados expresados como logaritmos de CFU/g fueron de 9.43 y 9.30, respectivamente, en comparación con 8.71 del grupo sin suplementación.

Otra concordancia a estos resultados obtenidos en la combinación de factor levadura y minerales quelatados del presente estudio fue la reportada por Kim *et al.* (2022), quienes observaron que en pollos de engorde alimentados con 1g/kg de un cultivo líquido de levadura viva de *Saccharomyces cerevisiae* con concentración de 2.8×10^8 CFU/g. Ellos reportaron una mayor abundancia relativa de *Lactobacillus spp.* (24.7%) en comparación con las aves alimentadas con la dieta control (15 %).

La mejora en la abundancia relativa de los géneros *Lactobacillus spp.* y *Bifidobacterium spp.* observada únicamente en T4 del presente estudio, en el que se combinó la levadura y los minerales quelatados, sugiere la existencia de una posible sinergia entre los probióticos y los minerales quelatados. Este tratamiento mostró efectos más pronunciados en comparación con los grupos que recibieron solo uno de estos factores. Esta combinación nombrada bajo el término de “*preparado funcional*” podría representar mejor la interacción sinérgica entre dos componentes que benefician la salud del huésped, y que no se ajusta completamente a la definición de un simbiótico clásico, que se refiere a combinaciones sinérgicas entre prebióticos y probióticos (De Vrese y Schrezenmeir, 2008).

No se encontraron reportes de literatura que demuestren una sinergia específica entre la combinación de levadura y minerales quelatados en las codornices en crecimiento. Sin

embargo, los simbióticos que incluyen la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (como probiótico) y un prebiótico (componente alimentario no viable que beneficia la salud del huésped al modular la microbiota; Pineiro *et al.*, 2008), han mostrado capacidad para influir en la abundancia relativa de la microbiota.

Por ejemplo, Ślizewska *et al.* (2020) reportaron que el simbiótico C (a base de *Saccharomyces cerevisiae*, otros probióticos e inulina) aumentó significativamente las bacterias beneficiosas *Bifidobacterium spp.* y *Lactobacillus spp.* en la microbiota intestinal de pollos. En el yeyuno, los conteos de *Bifidobacterium spp.* fueron 2 órdenes de magnitud mayores y, en el ciego, 1 orden de magnitud mayor que en el grupo control, con valores de $1.47\text{--}6.43 \times 10^9$ CFU/g y $4.90\text{--}8.73 \times 10^9$ CFU/g respectivamente tras 42 días. *Lactobacillus spp.* también aumentaron entre 2 y 4 órdenes de magnitud, destacando en el ciego con 1.01×10^9 CFU/g para el simbiótico C frente a valores más bajos en los simbióticos A y B.

Egorova *et al.* (2016) reportaron resultados consistentes con los obtenidos en este estudio, al observar un aumento en el número de bacterias del género *Lactobacillus spp.* del 20.4% ($P < 0.05$) y 47.8 % ($P < 0.005$) en pollos de engorda en crecimiento suplementados con *Saccharomyces spp.* viva a una dosis de 1 g/kg y con el probiótico Cellobacterine-T (un probiótico basado en bacterias *Bacillus subtilis*) a una dosis de 1 g/kg, respectivamente, en comparación con el grupo control (sin suplementación). No obstante, en contraste con este trabajo, estos autores informaron una disminución en la cantidad de bacterias de la familia *Bifidobacteriaceae* del 44.9 % y 23.0 % en los grupos con *Saccharomyces spp.* y Cellobacterine-T, respectivamente.

Los beneficios observados en este estudio, tanto en el rendimiento productivo como en las características morfológicas y la modulación positiva de la microbiota intestinal, podrían atribuirse al potencial de *Saccharomyces cerevisiae* para mejorar la digestibilidad de los componentes dietéticos. Esta levadura también incrementa la producción de ácidos grasos volátiles en el intestino, lo que puede traducirse en un mejor desempeño general de las aves (Dias *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2023).

Además, se ha documentado que la levadura desempeña un papel en la modulación de la microbiota intestinal a través de diversos mecanismos, como la acidificación del ambiente intestinal mediante la producción de ácidos grasos volátiles, previamente mencionada (Dias *et al.*, 2018). En este estudio, se observó un aumento en la abundancia relativa de los géneros *Lactobacillus spp.* y *Bifidobacterium spp.*, lo que refuerza esta función moduladora de la levadura cuando se suplementa junto con los minerales quelatados.

Esto podría estar relacionado con los resultados beneficiosos observados, ya que *Lactobacillus spp.* son bacterias ácido-lácticas que fermentan carbohidratos en ácido láctico, contribuyendo al equilibrio de la microbiota intestinal. Estas bacterias no solo mejoran la digestión y aumentan la absorción de nutrientes, sino que también modulan el sistema inmunológico e inhiben patógenos intestinales, reduciendo así el riesgo de infecciones gastrointestinales (Lin *et al.*, 2023; Bastos *et al.*, 2023).

Otro género probiótico de gran relevancia, *Bifidobacterium spp.*, también contribuye a la salud intestinal al colonizar el intestino, inhibir patógenos y mejorar la digestión y absorción de nutrientes, especialmente carbohidratos. Estas bacterias producen enzimas que facilitan la descomposición de nutrientes y tienen efectos inmunomoduladores, fortaleciendo el sistema inmunológico del huésped (El-Sharkawy *et al.*, 2020; Tian *et al.*, 2022; Hernández-Granados *et al.*, 2022).

Consecuentemente, tanto el aumento de dichos géneros (*Lactobacillus spp.* y *Bifidobacterium spp.*) como los efectos benéficos sobre el rendimiento general de las codornices que consumieron la dieta de T4, pudieron haber sido incrementados sinérgicamente por los minerales quelatados de cobre, zinc y selenio, debido a que la literatura señala efectos de modulación de la microbiota intestinal por parte de estos micro minerales orgánicos en distintas especies:

Muhammad *et al.* (2021) compararon los efectos de diferentes fuentes de selenio (orgánicas e inorgánicas) en la población microbiana cecal de gallinas de postura. Encontraron que la suplementación con 0,3 mg/kg de selenio orgánico proveniente de levadura

enriquecida (10.47 Log^{10} número de copias/g ciego) y de *Stenotrophomonas maltophilia* (10.55 Log^{10} número de copias/g ciego) resultó en una población bacteriana total significativamente mayor en comparación con las fuentes inorgánicas (9.80 Log^{10} número de copias/g ciego) y el grupo sin suplementación de selenio (8.44 Log^{10} número de copias/g ciego).

Además, se encontraron resultados similares a los de este estudio pues los grupos tratados con selenio orgánico (levadura y *Stenotrophomonas maltophilia* enriquecida con selenio, mostraron poblaciones más altas de *Lactobacillus spp.* con 7.36 y 7.70 Log^{10} número de copias/g ciego respectivamente comparado con fuentes inorgánicas y sin suplementar con 6.65 y 6.42 Log^{10} número de copias/g ciego respectivamente. La población de *Bifidobacterium spp.* también aumentó significativamente, alcanzando 8.83 y 7.91 Log^{10} número de copias/g ciego en los grupos suplementados con levadura y *Stenotrophomonas maltophilia*, respectivamente. En comparación, los grupos inorgánico y control mostraron poblaciones de 6.18 y 5.67 Log^{10} número de copias/g ciego, respectivamente.

El quelato de zinc también podría haber desempeñado un papel sinérgico en la modulación de la microbiota. Según lo reportado por Diao *et al.* (2021), los lechones destetados que fueron suplementados con 100 mg/kg de lactato de zinc en la dieta presentaron una mayor población de *Lactobacillus spp.* (8.03 log copias/g de digesta cecal) en comparación con los grupos suplementados con zinc inorgánico y el grupo control, que mostraron 6.93 y 6.79 log copias/g de digesta cecal, respectivamente.

En cuanto al cobre Chen *et al.* (2023) reportaron que pollos de engorda desafiados con coccidia, la suplementación con 30 ppm de quelato de metionina hidroxianáloga de cobre disminuyó significativamente el C_T de *Lactobacillus spp.* (18.23) por ng de ADN cecal comparado con la dieta sin suplementación (20.26), lo que indica que aumentó la abundancia de este género benéfico en la microbiota de las aves, teniendo en cuenta que un valor de C_T más bajo significa que se necesitó menos ciclos para alcanzar el umbral, que estaría dado por mayor concentración del ADN objetivo (Livak y Schmittgen, 2001).

Se ha reportado que la suplementación de cerdos con un complejo de glicina-cobre (21% de cobre y 25% de glicina) incrementa la abundancia de la familia *Lactobacillaceae* en muestras fecales al día 14, en comparación con el día 0 de experimento. En contraste, esta misma familia bacteriana disminuyó cuando los cerdos fueron suplementados con sulfato de cobre inorgánico en dosis equivalentes (Lei *et al.*, 2023). Esto sugiere que el cobre quelatado en forma de glicina-cobre podría tener un efecto más beneficioso sobre la microbiota intestinal que su forma inorgánica, y haber contribuido sinérgicamente con los resultados obtenidos.

8.5. Conclusiones Experimento 3

En conclusión, este estudio demuestra que la incorporación conjunta de *Saccharomyces cerevisiae* y minerales quelatados de cobre, zinc y selenio en la alimentación de codornices en crecimiento puede representar una estrategia nutricional prometedora, pues la levadura mostró un efecto positivo en el crecimiento y desarrollo óseo, mientras que los minerales quelatados contribuyeron significativamente a la ganancia de peso. Además, ambos factores favorecieron una alta viabilidad de las aves y, en combinación, promovieron un equilibrio positivo en la microbiota intestinal, incrementando la abundancia relativa de bacterias benéficas como *Lactobacillus spp.* y *Bifidobacterium spp.* Estos hallazgos resaltan el potencial de este preparado funcional para mejorar el rendimiento productivo y la salud intestinal en aves de corral, lo que podría traducirse en una mayor eficiencia en la producción avícola.

IX. CONCLUSIONES

La adición de 0.45% (base seca) de levadura *Saccharomyces cerevisiae* en la alimentación de codornices en crecimiento resultó en un aumento del consumo de alimento y mejoró tanto la supervivencia como la tasa de utilización de proteína en las aves, sin alterar el peso, la conversión alimenticia ni la ganancia de peso. Estos resultados prometedores subrayan la necesidad de continuar investigando y profundizando en los efectos de la levadura en la dieta de las codornices y otras aves en crecimiento.

Así mismo, la sustitución del 67% de minerales inorgánicos de cobre, zinc, selenio por sus formas quelatadas en la dieta de codornices en crecimiento puede ser una estrategia nutricional efectiva para mejorar el rendimiento productivo, la viabilidad y la utilización de minerales de gran importancia para el metabolismo de las aves como el cobre y el hierro. Asimismo, se observaron efectos positivos en el desarrollo óseo de la tibia con una sustitución parcial del 33%. Sin embargo, se requieren más investigaciones para comprender mejor las posibles interacciones entre los minerales orgánicos e inorgánicos a diferentes niveles de sustitución.

La suplementación con levadura *Saccharomyces cerevisiae* y minerales quelatados conjuntamente mostró efectos generalmente favorables en el rendimiento productivo de las codornices, donde la levadura destacó por mejorar el crecimiento y desarrollo óseo, mientras que los minerales quelatados benefició principalmente la ganancia de peso. Ambos factores mantuvieron una excelente viabilidad de las aves, evidenciando su potencial como alternativas prometedoras para optimizar la nutrición y el desarrollo en la producción avícola.

X. BIBLIOGRAFÍA

- Abd El-Wahab, A., Mahmoud, R., Marghani, B., Gadallah, H. 2020. Effects of yeast addition to the diet of Japanese quails on growth performance, selected serum parameters and intestinal morphology as well as pathogens reduction. *Pakistan Veterinary Journal*, 40(2), 219-223. <https://doi.org/10.29261/pak-vetj%2F2019.125>
- Abdallah, A., El-Husseiny, O., Abdel-Latif, K. 2009. Influence of some dietary organic mineral supplementations on broiler performance. *International Journal of Poultry Science*, 8(3), 291-298. <https://doi.org/10.3923/ijps.2009.291.298>
- Aksu, D., Aksu, T., Ozsoy, B. 2010. Effects of lower supplementation levels of organically complexed minerals (zinc, copper and manganese) versus inorganic forms on hematological and biochemical parameters in broilers. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 16(4), 553-559. <https://doi.org/10.9775/kvfd.2009.1131>
- American Veterinary Medical Association. 2020. Guidelines for the euthanasia of animals (2020 edición). <https://www.avma.org/sites/default/files/2020-02/Guidelines-on-Euthanasia-2020.pdf>
- Anee, I. J., Alam, S., Begum, R. A., Shahjahan, R. M., Khandaker, A. M. 2021. The role of probiotics on animal health and nutrition. *The Journal of Basic and Applied Zoology*, 82(52), 1-16. <https://doi.org/10.1186/s41936-021-00250-x>
- Ao, T., Pierce, J. 2013. The replacement of inorganic mineral salts with mineral proteinates in poultry diets. *World's Poultry Science Journal*, 69(1), 5–16. doi:10.1017/S0043933913000019
- Ariyoshi, W., Hara, S., Koga, A., Nagai-Yoshioka, Y., Yamasaki, R. 2021. Biological effects of β -Glucans on osteoclast genesis. *Molecules*. 26(7),1982. doi:10.3390/molecules26071982.
- Association of Official Analytical Chemists. 2005. Official Methods of Analysis, 16th edition. Association of Analytical Chemists. Rockville, MD, USA.

- Awad, W. A., Hess, C. Hess, M. 2017. Enteric pathogens and their toxin-induced disruption of the intestinal barrier through alteration of tight junctions in chickens. *Toxins*, 9(2), 1-22. <https://doi.org/10.3390/toxins9020060>
- Bao, Y. M., Choct, M. 2009. Trace mineral nutrition for broiler chickens and prospects of application of organically complexed trace minerals: A review. *Animal Production Science*, 49(4), 269-282. <https://doi.org/10.1071/EA08313>
- Bastos, T. S., Souza, C. M., Legendre, H., Richard, N., Pilla, R., Suchodolski, J. S., de Oliveira, S. G., Lesaux, A. A., Félix, A. P. 2023. Effect of yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a probiotic on diet digestibility, fermentative metabolites, and composition and functional potential of the fecal microbiota of dogs submitted to an abrupt dietary change. *Microorganisms*, 11(2), 1-20. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11020506>
- Byrne, L., Murphy, R. 2022. Relative bioavailability of trace minerals in production animal nutrition: A review. *Animals*, 12(15), 1-46. <https://doi.org/10.3390/ani12151981>
- Chen, J., Yan, F., Kuttappan, V. A., Wedekind, K., Vázquez-Añón, M., Hancock, D. 2023. Effects of bis-chelated copper in growth performance and gut health in broiler chickens subject to coccidiosis vaccination or coccidia challenge. *Frontiers in physiology*, 13, 1-13. 991318. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.991318>
- Chen, P., Shin, S., Choi, Y., Kim, E., Han, J., Lee, K. 2016. Overexpression of G0/G1 switch gene 2 in adipose tissue of transgenic quail inhibits lipolysis associated with egg laying. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(3), 1-9. <https://doi.org/10.3390/ijms17030384>
- Cheng, K., Bennett, D., Mills, A. 2010. The Japanese quail. En R. C. Hubrecht y J. Kirkwood (Eds.), *The UFAW handbook on the care and management of laboratory and other research animals* (8^a ed., pp. 655-673). Wiley-Blackwell.
- Collett, S. R. Nutrition and wet litter problems in poultry. 2012. *Animal Feed Science and Technology*, 173(1-2), 65-75. <http://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2011.12.013>
- Cruz, V., Fernández, I. 2011. Effect of organic selenium and zinc on the performance and egg quality of Japanese quails. *Brazilian Journal of Poultry Science*, 13(2), 91-95. <https://doi.org/10.1590/S1516-635X2011000200002>

- Cuevas-González, P. F., Liceaga, A. M., Aguilar-Toalá, J. E. 2020. Postbiotics and paraprobiotics: From concepts to applications. *Food Research International*, 136, 109502. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109502>
- Dalgaard, T., Briens, M., Engberg, R., Lauridsen, C. 2018. The influence of selenium and selenoproteins on immune responses of poultry and pigs. *Animal Feed Science and Technology*, 238, 73-83. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2018.01.020>
- Darvishi, Y., Shams, M., Hassani, S. 2020. Effect of organic or inorganic Zinc and Manganese sources on performance and egg quality traits of laying hens. *Journal of Advanced Pharmacy Education & Research*, 10(1), 22-28.
- Dash, C. S. K., Behera, A. K., Dehuri, S., Ghosh, A. 2023. An outliers detection and elimination framework in classification task of data mining. *Decision Analytics Journal*, 6, 100164. <https://doi.org/10.1016/j.dajour.2023.100164>
- De O. Silva, V., Lobato, R. V., Andrade, E. F., de Macedo, C. G., Napimoga, J. T., Napimoga, M. H., Messoria, M. R., Murata, R. M., Pereira, L. J. 2015. β -Glucans (*Saccharomyces cerevisiae*) reduce glucose levels and attenuate alveolar bone loss in diabetic rats with periodontal disease. *PLoS ONE*, 10(8), e0134742. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134742>
- De O. Silva, V., Lobato, R.V., Andrade, E. F., Orlando, D. R., Borges, B. D. B., Zangeronimo, M. G., de Sousa, R. V., Pereira, L. J. 2017. Effects of β -Glucans ingestion on alveolar bone loss, intestinal morphology, systemic inflammatory profile, and pancreatic β -cell function in rats with periodontitis and diabetes. *Nutrients*, 9(9), 1-13. <https://doi.org/10.3390/nu9091016>
- de Vrese, M., Schrezenmeir, J. 2008. Probiotics, prebiotics, and synbiotics. En U. Stahl, U. E. Donalies, y E. Nevoigt (Eds.), *Food biotechnology (Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology)*, vol. 111, pp. 1-66). Springer. https://doi.org/10.1007/10_2008_097
- Diao, H., Bai, S., He, J., Xu, Z., Zhang, H. 2021. Effects of dietary zinc sources on growth performance and gut health of weaned piglets. *Frontiers in Microbiology*, 12, 771617. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.771617>
- Dias, A. L. G., Freitas, J., Micai, B., Azevedo, R., Greco, L., Santos, J. 2018. Effect of supplemental yeast culture and dietary starch content on rumen fermentation and

- digestion in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 101(1), 201-221. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13241>
- Díaz, E., Ángel, I., Ángel B. 2017. Probióticos en la avicultura: una revisión. *Revista de Medicina Veterinaria*, 1(35), 175-189. <https://doi.org/10.19052/mv.4400>
- Dryden, G. 2008. Animal nutrition science. CABI
- Echeverry, H., Yitbarek, A., Munyaka, P., Alizadeh, M., Cleaver, A., Camelo-Jaimes, G., Wang, P., O, K., Rodriguez-Lecompte, J. C. 2016. Organic trace mineral supplementation enhances local and systemic innate immune responses and modulates oxidative stress in broiler chickens. *Poultry Science*, 95(3), 518-527. <https://doi.org/10.3382/ps/pev374>
- Egorova, T. A., Lenkova, T. N., Il'ina, L. A., Yildirim, E. A., Nikonov, I. N., Filipova, V. A., Laptev, G. Yu., Novikova, N. I., Grozina, A. A., Manukyan, V. A., Fisinin, V. I., Egorov, I. A. 2016. The *Saccharomyces sp.* and *Bacillus subtilis* based probiotics influence on chicken broiler productivity and caecum microbiome community. *Agricultural Biology*, 51(6), 891-902. <http://dx.doi.org/10.15389/agrobiol-ogy.2016.6.891eng>
- El-Husseiny, O. M., Hashish, S. M., Ali, R. A., Arafa, S. A., Abd El-Samee, L. D., Olemy, A. A. 2012. Effects of feeding organic zinc, manganese, and copper on broiler growth, carcass characteristics, bone quality, and mineral content in bone, liver, and excreta. *International Journal of Poultry Science*, 11(6), 368-377. <http://dx.doi.org/10.3923/ijps.2012.368.377>
- El-Kelawy, M. I., Elnaggar, A. S. 2016. Inclusion of *Saccharomyces cerevisiae* in diet of Japanese quail. Effect on growth performance, some blood plasma constituents and carcass characteristics. *Egyptian Poultry Science*, 36(6), 1269-1282.
- Elnesr, S., Mahmoud, B., da Silva Pires, P., Moraes, P., Elwan, H., El-Shall, N., El-Kholy, M., Alagawany, M. 2024. Trace minerals in laying hen diets and their effects on egg quality. *Biological Trace Element Research*, 202, 5664-5679. <https://doi.org/10.1007/s12011-024-04121-8>
- El-Sharkawy, H., Tahoun, A., Rizk, A. M., Suzuki, T., Elmonir, W., Nassef, E., Shukry, M., Germoush, M. O., Farrag, F., Bin-Jumah, M., Mahmoud, A. M. 2020. Evaluation of *Bifidobacteria* and *Lactobacillus* probiotics as alternative therapy for

- Salmonella typhimurium* infection in broiler chickens. *Animals*, 10(6), 1-12. <https://doi.org/10.3390/ani10061023>
- Englmaierová, M., Skřivan, M., Taubner, T., Skřivanová, V., Čermák, L. 2021. Effect of housing system and feed restriction on meat quality of medium-growing chickens. *Poultry Science*, 100(8), 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.101223>
- FAO. 2001. Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. <https://www.iqb.es/digestivo/pdfs/probioticos.pdf>
- Fathi, M., Al-Mansour, S., Al-Homidan, A., Al-Khalaf, A., Al-Damegh, M. 2012. Effect of yeast culture supplementation on carcass yield and humoral immune response of broiler chicks. *Veterinary World*, 5(11), 651–657. <https://doi.org/10.5455/VET-WORLD.2012.651-657>
- Feng, J., Ma, W. Q., Niu, H. H., Wu, X. M., Wang, Y., Feng, J. 2010. Effects of zinc glycine chelate on growth, hematological, and immunological characteristics in broilers. *Biological Trace Element Research*, 133, 203-211. <https://doi.org/10.1007/s12011-009-8431-9>
- Fu, C., Carter, J., Li, Y., Porter, J., Kerley, M. 2006. Comparison of agar plate and real-time PCR on enumeration of *Lactobacillus*, *Clostridium perfringens* and total anaerobic bacteria in dog faeces. *Letters in Applied Microbiology*, 42(5), 490-494. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765x.2006.01893.x>
- Fuller, R. 1992. Probiotics: The scientific basis. Chapman and Hall.
- Gaffney-Stomberg, E. 2019. The impact of trace minerals on bone metabolism. *Biological Trace Element Research*, 188, 26–34. <https://doi.org/10.1007/s12011-018-1583-8>
- Gao, J., Zhang, H. J., Yu, S. H., Wu, S. G., Yoon, I., Quigley, J., Gao, Y. P., Qi, G. H. 2008. Effects of yeast culture in broiler diets on performance and immunomodulatory functions. *Poultry Science*, 87(7), 1377–1384. <https://doi.org/10.3382/ps.2007-00418>
- Gaona Rodríguez, C. A., Bernal Barragán, H., Vásquez Aguilar, N. C., Hernández Escareño, J. J., Morales Trejo, A., Cervantes Ramírez, M. 2023. Effect of *Saccharomyces cerevisiae* dietary supplementation on productive parameters and nutrient utilization of growing Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*).

- Archivos Latinoamericanos de Producción Animal, 31: 153–157.
<https://doi.org/10.53588/alpa.310527>
- Ghada, E. 2019. Effect of dietary zinc and manganese chelated with tryptophan and protein on growth performance and carcass traits of quail. *Egyptian Poultry Science Journal*, 39(2), 579-597. <https://dx.doi.org/10.21608/epsj.2019.40334>
- Ghosh, K., Halder, S., Bedford, M., Muthusami, N., Samanta, I. 2011. Assessment of yeast cell wall as replacements for antibiotic growth promoters in broiler diets: effects on performance, intestinal histo-morphology and humoral immune responses. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 96(2), 275–284. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0396.2011.01155.x>
- Gil de los Santos, J. R., Storch, O. B., Gil-Turnes, C. 2005. *Bacillus cereus var. toyoi* and *Saccharomyces boulardii* increased feed efficiency in broilers infected with *Salmonella enteritidis*. *British Poultry Science*, 46(4), 494-497. <https://doi.org/10.1080/00071660500181461>
- Goff, J. 2018. Invited review: Mineral absorption mechanisms, mineral interactions that affect acid–base and antioxidant status, and diet considerations to improve mineral status. *Journal of Dairy Science*, 101(4), 2763-2813. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13112>
- Gutiérrez-Ramírez, L., Montoya, O., Zea, M. 2013. Probiotics: an alternative for cleaner production and a possible replacement of the antibiotics as growth promoters in animal feeding. *Revista Producción + Limpia*, 8(1), 135-146.
- Hamilton-Miller, J. M., Shah, S., Smith, C. T. 1996. "Probiotic" remedies are not what they seem. *British Medical Journal*, 312(7022), 55-56. <https://doi.org/10.1136/bmj.312.7022.55c>
- Han, G. Q., Xiang, Z. T., Yu, B., Chen, D. W., Qi, H. W., Mao, X. B., Chen, H., Mao, Q., Huang, Z. Q. 2012. Effects of different starch sources on *Bacillus spp.* in intestinal tract and expression of intestinal development related genes of weanling piglets. *Molecular Biology Reports*, 39(2), 1869-1876. <https://doi.org/10.1007/s11033-011-0932-x>
- Han, X., Kong, J., Zheng, C., Yan, X., Qiu, T., Chen, Z., Zhang, H. 2024. The effects of a mixture of small peptide chelating minerals and inorganic minerals on the

- production performance and tissue deposition of broiler chickens. *Frontiers in Veterinary Science*, 11,1380911. <https://doi.org/10.3389/fvets.2024.1380911>
- Harash, G., Richardson, K., Alshamy, Z., Hünigen, H., Hafez, H., Plendl, J., Masri, S. 2020. Basic morphometry, microcomputed tomography and mechanical evaluation of the tibiotarsal bone of a dual-purpose and a broiler chicken line. *PLoS ONE*, 15(3), e0230070. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0230070>
- He, T., Mahfuz, S., Piao, X., Wu, D., Wang, W., Yan, H., Liu, Y. 2021. Effects of live yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) as a substitute to antibiotic on growth performance, immune function, serum biochemical parameters and intestinal morphology of broilers. *Journal of Applied Animal Research*, 49(1), 15-22. <https://doi.org/10.1080/09712119.2021.1876705>
- Hernández-Granados, M. J., Ortiz-Basurto, R. I., Jiménez-Fernández, M., García-Mun-
guía, C. A., Franco-Robles, E. 2022. Dietary encapsulated *Bifidobacterium ani-
malis* and Agave fructans improve growth performance, health parameters, and
immune response in broiler chickens. *Animal Bioscience*, 35(4), 587-595.
<https://doi.org/10.5713/ab.21.0213>
- Hoque, M. R, Jung, H., Kim, I. 2021. Effect of yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae*)
supplementation on growth performance, excreta microbes, noxious gas, nutrient
utilization, and meat quality of broiler chicken. *The Journal of Poultry Science*,
58(4), 216-221. <https://doi.org/10.2141/jpsa.0190144>
- Huang, S., Zhang, C., Xu, T., Shaukat, A., He, Y., Chen, P., Lin, L., Yue, K., Cao, Q.,
Tong, X. 2022. Integrated fecal microbiome and metabolomics reveals a novel
potential biomarker for predicting tibial dyschondroplasia in chickens. *Frontiers
in Physiology*, 13, 887207. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.887207>
- Kabir, S. 2009. The role of probiotics in the poultry industry. *International Journal of
Molecular Science*, 10(8), 3531-3546. <https://doi.org/10.3390/ijms10083531>
- Kaufman, P., Pfeffernkorn, A., Teuber, M., Meile, L. 1997. Identification and quantifica-
tion of *Bifidobacterium* species isolated from food with genus specific 16S rRNA-
targeted probes by colony hybridization and PCR. *Applied Environmental Microbi-
ology*, 63(4), 1268-1273. [https://doi.org/10.1128/aem.63.4.1268-1273](https://doi.org/10.1128/aem.63.4.1268-1273.1997)
.1997

- Kaur, S., Mandal, A. B., Singh, K., Kadam, M. 2008. The response of Japanese quails (heavy body weight line) to dietary energy levels and graded essential amino acid levels on growth performance and immuno-competence. *Livestock Science*, 117(2-3), 255-262. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2007.12.019>
- Khan, I., Zaneb, H., Masood, S., Ashraf, S., Rehman, H., Tahir, S., Rehman, H., Khan, A., Taj, R., Rahman, S., Shah, M. 2022. Supplementation of selenium nanoparticles-loaded chitosan improves production performance, intestinal morphology, and gut microflora in broiler chickens. *The Journal of Poultry Science*, 59(3), 272-281. <https://doi.org/10.2141/jpsa.0210026>
- Khan, K., Kaya, M., Fidan, E., Kilimci, F. 2023. Impact of litter on femur and tibial morphology, bone biomechanics, and leg health parameters in broiler chickens. *Animal Bioscience*, 36(9), 1393-1402. <https://doi.org/10.5713/ab.22.0335>
- Khatun, A., Chowdhury, S. D., Roy, B. C., Dey, B., Haque, A., Chandran, B. 2019. Comparative effects of inorganic and three forms of organic trace minerals on growth performance, carcass traits, immunity, and profitability of broilers. *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research*, 6(1), 66-73. <https://doi.org/10.5455/javar.2019.f313>
- Khosravi, H., Mehri, M., Bagherzadeh-Kasmani, F., Asghari-Moghadam, M. 2016. Methionine requirement of growing Japanese quails. *Animal Feed Science and Technology*, 212, 122-128. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2015.12.017>
- Kim, E., Kyoung, H., Hyung Koh, N., Lee, H., Lee, S., Kim, Y., Il Park, K., Min Heo, J., Song, M. 2022. Supplementation of live yeast culture modulates intestinal health, immune responses, and microbiota diversity in broiler chickens. *Journal of Animal Science*, 100(5), skac122. <https://doi.org/10.1093/jas/skac122>
- Klimek, K., Przekora, A., Pałka, K., Ginalska, G. 2016. New method for the fabrication of highly osteoconductive β -1,3-glucan/HA scaffold for bone tissue engineering: Structural, mechanical, and biological characterization. *Journal of Biomedical Materials Research*, 104(10 A), 2528-2536. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.35798>
- Lei, H., Du, Q., Lu, N., Jiang, X., Li, M., Xia, D., Long, K. 2023. Comparison of the microbiome-metabolome response to copper sulfate and copper glycinate in growing pigs. *Animals*, 13(3), 345. <https://doi.org/10.3390/ani13030345>

- Lin, Z., Wu, J., Wang, J., Levesque, C. L., Ma, X. 2023. Dietary *Lactobacillus reuteri* prevent from inflammation mediated apoptosis of liver via improving intestinal microbiota and bile acid metabolism. *Food Chemistry*, 404(B), 134643. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134643>
- Liu, C., Ma, N., Feng, Y., Zhou, M., Li, H., Zhang, X., Ma, X. 2023. From probiotics to postbiotics: Concepts and applications. *Animal Research and One Health*, 1(1), 92-114. <https://doi.org/10.1002/aro2.7>
- Liu, Y., Ban, Z., Li, P., Yan, X., Li, L., Liu, D., Yan, L., Guo, Y. 2022. Metabolizable and net energy values of expanded cottonseed meal for laying hens and broiler chickens. *The Journal of Poultry Science*, 59(2), 143–151. <https://doi.org/10.2141/jpsa.0210033>
- Livak, K. J., Schmittgen, T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25(4), 402-408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- McDonald, P., Edwards, R., Greenhalgh, J., Morgan, C. 2002. *Animal nutrition* (6th ed.). Pearson Education Limited.
- Mirakzehi, M. T., Agah, M. J., Baranzehi, T., Saleh, H. 2022. The effects of *Saccharomyces cerevisiae* and citric acid on productive performance, egg quality parameters, small intestinal morphology, and immune-related gene expression in laying Japanese quails. *Brazilian Journal of Poultry Science*, 24(4), <https://doi.org/10.1590/1806-9061-2022-1678>
- Mirza, R. E., Mirza, R. A., Muhammad, S. D., Kareem, K. Y. 2020. Effect of commercial baker's yeast supplementation (*Saccharomyces cerevisiae*) in diet and drinking water on productive performance, carcass traits, haematology, and microbiological characteristics of local quails. *Zanco Journal of Pure and Applied Sciences*, 32(3), 200-205. <http://dx.doi.org/10.21271/ZJPAS.32.3.21>
- Mona, M., Allababidy, T., Ramadan, E. 2015. The bioavailability of selenium in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annals of Agricultural Sciences*. 60(2), 307-315. <https://doi.org/10.1016/j.aos.2015.10.006>
- Muhammad, A. I., Mohamed, D. A., Chwen, L. T., Akit, H., Samsudin, A. A. 2021. Effect of selenium sources on laying performance, egg quality characteristics, intestinal

- morphology, microbial population and digesta volatile fatty acids in laying hens. *Animals*, 11(6), 1681. <https://doi.org/10.3390/ani11061681>
- Muszyński, S., Dobrowolski, P., Kasperek, K., Knaga, S., Kwiecień, M., Donaldson, J., Kutyla, M., Kapica, M., Tomaszewska, E. 2020. Effects of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) probiotics supplementation on bone quality characteristics in young Japanese quail (*Coturnix japonica*): the role of sex on the action of the gut-bone axis. *Animals*, 10(3): 440. <https://doi.org/10.3390/ani10030440>
- Nasrin, M., Siddiqi, M. N. H., Masum, M. A., Wares, M. A. 2012. Gross and histological studies of digestive tract of broilers during postnatal growth and development. *Journal of the Bangladesh Agricultural University*, 10(1), 69-77. <https://doi.org/10.3329/jbau.v10i1.12096>
- Navarro, O., Roa, V. 2020. Determination of in vitro digestibility of forage species used in ruminant feeding. *Tropical Animal Health Production*, 52, 3045-3059. <https://doi.org/10.1007/s11250-020-02325-3>
- Nollet, L., Van der klis, J., Lensing, M., Spring, P. 2007. The effect of replacing inorganic with organic trace minerals in broiler diets on productive performance and mineral excretion. *The Journal of Applied Poultry Research*, 16(4), 592-597. <https://doi.org/10.3382/japr.2006-00115>
- Peric, L., Nollet, L., Milosevic, N., Zikic, D. 2007. Effect of Bioplex and Sel-Plex substituting inorganic trace mineral sources on performance of broilers. *Archiv für Geflügelkunde*, 71(3), 122-129.
- Pineiro, M., Asp, N. G., Reid, G., Macfarlane, S., Morelli, L., Brunser, O., Tuohy, K. 2008. FAO Technical meeting on prebiotics. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 42(3), 156-159. <https://doi.org/10.1097/MCG.0b013e31817f184e>
- Prakatur, I., Miskulin, M., Pavic, M., Marjanovic, K., Blazicevic, V., Miskulin, I., Domacinovic, M. 2019. Intestinal morphology in broiler chickens supplemented with propolis and bee pollen. *Animals*, 9(6), 301. <https://doi.org/10.3390/ani9060301>
- Przekora, A., Ginalska, G. 2015. Enhanced differentiation of osteoblastic cells on novel chitosan/ β -1,3-glucan/bioceramic scaffolds for bone tissue regeneration.

- Biomedical Materials*. 10(1), 015009. <https://doi.org/10.1088/1748-6041/10/1/015009>
- Qi, P., Wang, L. 2024. Effect of adding yeast cultures to high-grain conditions on production performance, rumen fermentation profile, microbial abundance, and immunity in goats. *Animals*, 14(12), 1799. <https://doi.org/10.3390/ani14121799>
- Ramírez-Lozano, R. 2007. Los pastos en la nutrición de los rumiantes. México: Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Rao, S. V. R., Prakash, B., Raju, M. V. L. N., Panda, A. K., Kumari, R. K., Reddy, E. P. K. 2016. Effect of supplementing organic forms of zinc, selenium and chromium on performance, anti-oxidant and immune responses in broiler chicken reared in tropical summer. *Biological Trace Element Research*, 172(2), 511-520. <https://doi.org/10.1007/s12011-015-0587-x>
- Ray, S., Das, S., Mishra, S., Swain, R., Maity, A., Swain, P., Das, A. 2014. Performance of Japanese quail on organically complexed minerals by replacing inorganic sources. *Indian Journal of Animal Sciences*. 84(1), 60-67. <https://doi.org/10.56093/ijans.v84i1.37312>
- Rezaei, M., Karimi Torshizi, M. A., Wall, H., Ivarsson, E. 2018. Body growth, intestinal morphology and microflora of quail on diets supplemented with micronised wheat fibre. *British Poultry Science*, 59(4), 422-429. <https://doi.org/10.1080/00071668.2018.1460461>
- Rinttilä, T., Apajalahti, J. 2013. Intestinal microbiota and metabolites—Implications for broiler chicken health and performance. *Journal of Applied Poultry Research*, 22(3), 647-658. <http://dx.doi.org/10.3382/japr.2013-00742>
- Roy, B. C., Ray, B. C. 2023. Potentiality of *Saccharomyces cerevisiae* in replacing antibiotic growth promoters on growth, gut microbiology, histology, and serum antibody titers of commercial broilers. *Journal of Applied Poultry Research*, 32, 100352. <https://doi.org/10.1016/j.japr.2023.100352>
- Rychlik, I. 2020. Composition and function of chicken gut microbiota. *Animals*, 10(1), 103. <https://doi.org/10.3390/ani10010103>
- Salim, H., Jo, C., Lee, B. 2008. Zinc in broiler feeding and nutrition. *Avian Biology Research*, 1(1), 5-8. <https://doi.org/10.3184/175815508X334578>

- Santos, M., Widowski, T., Kiarie, E., Guerin, M., Edwards, A., Torrey, S. 2022. In pursuit of a better broiler: tibial morphology, breaking strength, and ash content in conventional and slower-growing strains of broiler chickens. *Poultry Science*, 101(4), 1-13. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2022.101755>
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. 1999. NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Diario Oficial de la Federación, México. <http://publico.senasica.gob.mx/?doc=743>
- Sharma, M. C., Joshi, C., Pathak, N. N., Kaur, H. 2005. Copper status and enzyme, hormone, vitamin and immune function in heifers. *Research in Veterinary Science*, 79(2), 113-123. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2004.11.015>
- Shen, Y. B., Piao, X. S., Kim, S. W., Wang, L., Liu, P., Yoon, I., Zhen, Y. G. 2009. Effects of yeast culture supplementation on growth performance, intestinal health, and immune response of nursery pigs. *Journal of Animal Science*, 87(8), 2614-2624. <https://doi.org/10.2527/jas.2008-1402>
- Shim, M. Y., Karnuah, A. B., Mitchell, A. D., Anthony, N. B., Pesti, G. M., Aggrey, S. E. 2012. The effects of growth rate on leg morphology and tibia breaking strength, mineral density, mineral content, and bone ash in broilers. *Poultry Science*, 91(8), 1790-1795. <https://doi.org/10.3382/ps.2011-01968>
- Shouzheng, X., Sung-Hyen, L., Hyun, S., Yeong, H., Bravo, D. 2015. Effects of dietary selenium on host response to necrotic enteritis in young broilers. *Research in Veterinary Science*, 98, 66-73. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2014.12.004>
- Ślizewska, K., Markowiak-Kopec P., Żbikowski, A., Szeleszczuk, P. 2020. The effect of synbiotic preparations on the intestinal microbiota and her metabolism in broiler chickens. *Scientific Reports*, 10, 4281. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-61256-z>
- Soren, S., Mandal, G. P., Mondal, S., Pradhan, S., Mukherjee, J., Banerjee, D., Pakhira, M. C., Amla, Mondal, A., Nsereko, V., Samanta, I. 2024. Efficacy of *Saccharomyces cerevisiae* fermentation product and probiotic supplementation on growth performance, gut microflora and immunity of broiler chickens. *Animals*, 14(6), 866. <https://doi.org/10.3390/ani14060866>

- Stanley, D., Geier, M., Denman, S., Haring, V., Crowley, T., Hughes, R., Moore, R. 2013. Identification of chicken intestinal microbiota correlated with the efficiency of energy extraction from feed. *Veterinary Microbiology*, 164(1-2), 85-92. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.01.030>
- Suárez-Machín, C., Garrido-Carralero, N., Guevara-Rodríguez, C. 2016. Levadura *Saccharomyces cerevisiae* y la producción de alcohol. Revisión bibliográfica. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, 50(1), 20-28.
- Sun, H., Tang, J., Fang, C. L. Yao, X. H., Wu, Y., Wang, X., Feng, J. 2013. Molecular analysis of intestinal bacterial microbiota of broiler chickens fed diets containing fermented cottonseed meal. *Poultry Science*, 92(2), 392-401. <https://doi.org/10.3382/ps.2012-02533>
- Suttle, N. F. 2010. *Mineral nutrition of livestock* (4th ed.). CABI. <https://doi.org/10.1079/9781845934729.0000>
- Suzer, B., Arican, I., Yesilbag, D., Yildiz, H. 2017. The effects of *Saccharomyces cerevisiae* on the morphological and biomechanical characteristics of the tibiotarsus in broiler chickens. *Archives Animal Breeding*, 60(4), 439-446. <https://doi.org/10.5194/aab-60-439-2017>
- Świątkiewicz, S., Arczewska-włosek, A., Józefiak, D. 2014. The efficacy of organic minerals in poultry nutrition: review and implications of recent studies. *World's Poultry Science Journal*, 70(3), 475-486. <https://doi.org/10.1017/S0043933914000531>
- Tian, P., Chen, Y., Zhu, H., Wang, L., Qian, X., Zou, R., Zhao, J., Zhang, H., Qian, L., Wang, Q., Wang, G., Chen, W. 2022. *Bifidobacterium breve* CCFM1025 attenuates major depression disorder via regulating gut microbiome and tryptophan metabolism: A randomized clinical trial. *Brain, Behavior, and Immunity*, 100, 233-241. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2021.11.023>
- Tomaszewska, E., Dobrowolski, P., Muszyński, S., Kwiecień, M., Kasperek, K., Knaga, S., Tomczyk-Warunek, A., Kowalik, S., Jeżewska-Witkowska, G., Grela, E. R. 2018. Intestinal mucosa develops in a sex-dependent manner in Japanese quail (*Coturnix japonica*) fed *Saccharomyces cerevisiae*. *British Poultry Science*, 59(6), 689-697. <https://doi.org/10.1080/00071668.2018.1523536>

- Vahdatpour, T., Nikpiran, H., Moshaveri, A., Ahmadzadeh, A., Riyazi, S., Vahdatpour, S. 2011. Effects of active, inactive and compounded *Saccharomyces cerevisiae* on growth-related hormones and performance of Japanese quails (*Coturnix japonica*). *African Journal of Biotechnology*, 10(67), 15205-15211. <https://doi.org/10.5897/AJB11.1012>
- Van Soest, P. J., Robertson, J. B., Lewis, B. A. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*, 74(10), 3583-3597. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78551-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2)
- Vásquez, N., Cervantes, M., Bernal, H., Rodríguez-Tovar, L., Morales, A. 2022. Short- and long-term exposure to heat stress differently affect performance, blood parameters, and integrity of intestinal epithelia of growing pigs. *Animals*, 12(19), 1-14. <https://doi.org/10.3390/ani12192529>
- Venglovska, K., Grešakova, L., Placha, I., Ryzner, M., Čobanova, K. 2014. Effects of feed supplementation with manganese from its different sources on performance and egg parameters of laying hens. *Czech Journal Animal Science*, 59(4), 147-155. <https://doi.org/10.17221/7338-CJAS>
- Venkatesh, G. P., Kuruvalli, G., Syed, K., Reddy, V. D. 2024. An updated review on probiotic production and applications. *Gastroenterology Insights*, 15(1), 221-236. <https://doi.org/10.3390/gastroent15010016>
- Vieira, R., Ferket, P., Malheiros, R., Hannas, M., Crivellari, R., Moraes, V., Elliott, S. 2020. Feeding low dietary levels of organic trace minerals improves broiler performance and reduces excretion of minerals in litter. *British Poultry Science*, 61(5), 574-582. <https://doi.org/10.1080/00071668.2020.1764908>
- Wang, W., Ren, W., Li, Z., Yue, Y., Guo, Y. 2017. Effects of live yeast on immune responses and intestinal morphological structure in lipopolysaccharide-challenged broilers. *Canadian Journal of Animal Science*, 97(1), 136-144. <https://doi.org/10.1139/cjas-2015-0148>
- Wang, Y. B., Xu, B. H. 2008. Effect of different selenium sources (sodium selenite and selenium yeast) on broiler chickens. *Animal Feed Science and Technology*, 144(3-4), 306-314. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2007.10.012>

- Wilkinson, N., Dinev, I., Aspden, W., Hughes, R., Christiansen, I., Chapman, J., Gangadoo, S., Moore, R., Stanley, D. 2018. Ultrastructure of the gastro intestinal tract of healthy Japanese quail (*Coturnix japonica*) using light and scanning electron microscopy. *Animal Nutrition*, 4(4), 378-387. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2018.06.006>
- Wong, S. H., Kwong, T. N. Y., Chow, T. C., Luk, A. K. C., Dai, R. Z. W., Nakatsu, G., Lam, T. Y. T., Zhang, L., Wu, J. C. Y., Chan, F. K. L., Ng, S. S. M., Wong, M. C. S., Ng, S. C., Wu, W. K. K., Yu, J., Sung, J. J. Y. 2017. Quantitation of faecal Fusobacterium improves faecal immunochemical test in detecting advanced colorectal neoplasia. *Gut*, 66(8), 1441-1448. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2016-312766>
- Xie. Y., Wen, M., Zhao, H., Liu, G., Chen, X., Tian, G., Cai, J., Jia, G. 2021. Effect of zinc supplementation on growth performance, intestinal development, and intestinal barrier function in Pekin ducks with lipopolysaccharide challenge. *Poultry Science*, 100(12), 101462. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.101462>
- Yadav, S., Jha, R. 2019. Strategies to modulate the intestinal microbiota and their effects on nutrient utilization, performance, and health of poultry. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 10, 2. <https://doi.org/10.1186/s40104-018-0310-9>
- Yamauchi, K. 2002. Review on chicken intestinal villus histological alterations related with intestinal function. *The Journal of Poultry Science*, 39(4), 229-242. <https://doi.org/10.2141/jpsa.39.229>
- Yaqoob, M., Wang, G., Sun, W., Pei, X., Liu, L., Tao, W., Xiao, Z., Wang, M., Huai, M., Li, L., Pelletier, W. 2020. Effects of inorganic trace minerals replaced by complexed glycines on reproductive performance, blood profiles, and antioxidant status in broiler breeders. *Poultry Science*, 99(5), 2718-2726. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2019.11.058>
- Yenice, E., Mızrak, C., Gültekin, M., Atik, Z., Tunca, M. 2015. Effects of organic and inorganic forms of manganese, zinc, copper, and chromium on bioavailability of these minerals and calcium in late-phase laying hens. *Biological Trace Element Research*, 167, 300-307. <https://doi.org/10.1007/s12011-015-0313-8>

- Zhang, J., He, H., Yuan, Y., Wan, K., Li, L., Liu, A. 2022. Effects of yeast culture supplementation on growth performance, nutrient digestibility, blood metabolites, and immune response in geese. *Animals*, 12(10), 1270. <https://doi.org/10.3390/ani12101270>
- Zhang, K., Hornef, M. W., Dupont, A. 2015. The intestinal epithelium as guardian of gut barrier integrity. *Cellular Microbiology*, 17, 1561–1569. <https://doi.org/10.1111/cmi.12501>
- Zhao, J., Shirley, R. B., Vazquez-Anon, M., Dibner, J. J., Richards, J. D., Fisher, P., Hampton, T., Christensen, K. D., Allard, J. P., Giesen, A. F. 2010. Effects of chelated trace minerals on growth performance, breast meat yield, and footpad health in commercial meat broilers. *Journal of Applied Poultry Research*, 19(4), 365-372. <https://doi.org/10.3382/japr.2009-00020>