

Efecto de la suplementación de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* encapsulada en los parámetros productivos y morfología de las vellosidades intestinales en conejos

Jossy Edith Martínez Licona,¹ Alejandro Azaola Espinosa,² Francisco Héctor Chamorro Ramírez¹ y José Fernando González Sanchez¹

Resumen. *El uso de antibióticos ha dado lugar a la resistencia bacteriana a los medicamentos y residuos en alimentos, por lo cual la tendencia actual es encontrar nuevas alternativas, una de éstas son los probióticos. El principal problema es el suministro del probiótico a los animales, por lo cual hay que buscar maneras adecuadas para dosificarlos y que los consuman de una manera natural; la técnica de encapsulación es un método para lograrlo. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de Bifidobacterium animalis subs. Lactis (BB12), encapsulada en pajillas de avena en los parámetros productivos y morfología de las vellosidades intestinales en conejos. Se utilizaron 45 conejos recién destetados de la raza Nueva Zelanda, los cuales se dividieron en tres grupos aleatoriamente, con 3 repeticiones de 5 conejos cada uno: grupo control (GC), grupo antibiótico (GA) y grupo probiótico (GP). Se suministró a todos agua y alimento ad libitum. Se determinó el consumo de alimento, la ganancia de peso y la conversión alimenticia, cada semana durante un mes. A las ocho semanas se sacrificó humanitariamente*

¹ Departamento de Producción Agrícola y Animal, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco.

² Departamento de Sistemas Biológicos, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, e-mail: jfgonzal@correo.xoc.uam.mx.

a los conejos de acuerdo con la norma oficial mexicana (NOM-033-ZOO-1995) y se obtuvieron los intestinos para realizar el estudio histológico. La viabilidad de las bacterias encapsuladas se mantuvo estable (10×10^{10} UFC/mL) a lo largo del experimento, lo cual demuestra que este tipo de encapsulación es recomendable para garantizar la supervivencia de las bacterias. La ganancia de peso fue mayor en los grupos GA y GP ($P < 0.05$) en comparación al grupo de control. No obstante, la conversión alimenticia no mostró diferencias ($P > 0.01$) entre el grupo antibiótico y el de probiótico. En cuanto a las vellosidades del intestino, el grupo con antibiótico presentó las de menor tamaño, mientras que el de probiótico modula el crecimiento de éstas. Se concluye que el uso de bifidobacterias encapsuladas en conejos tiene un efecto similar al del antibiótico, por lo que pueden usarse como una alternativa a éstos.

Palabras Clave: Probióticos, Bifidobacterias, Encapsulación, Conejos, Morfología intestinal.

Abstract. The use of antibiotics has given rise to the existence of bacteria resistance to medication and residues in food thus creating the current trend of finding new alternatives, one of them being probiotics. The main problem is the supply of probiotic to animals; thereby the need of finding a proper way to ration them out and have them consume it naturally arises. Encapsulation is a technique to achieve this challenge. The objective of this study was to evaluate the effect of *Bifidobacterium animalis* subs. *Lactis* (BB12), which was encapsulated in oat straws, on the productive parameters and morphology of intestinal villi in rabbits. Forty-five wean rabbits of the New Zealand breed were used. These were randomly divided in three groups with three repetitions of five rabbits for each group; control group (CG), antibiotic group (AG), and probiotic group (PG). All were supplied with food and water ad libitum. Food supply, weight gain and feed conversion were recorded in a weekly basis for a month. After eight weeks, a group of randomly selected rabbits were slaughtered humanely in accordance with the official Mexican standard (NOM-033-ZOO-1995) and the intestines were obtained to carry out a histological study. The viability of the encapsu-

lated bacteria remained stable (10×10^{10} UFC/mL) throughout the experiment, demonstrating that this type of encapsulation is recommendable in ensuring the survival of bacteria. Weight gain was higher in the AG y PG groups ($P < 0.05$) in comparison to the control group. However, feed conversion did not show any differences ($P > 0.01$) between the antibiotic and probiotic groups. In reference to intestinal villi, the antibiotic group showed the smallest size and the probiotic group demonstrated growth modulation. It was concluded that the use of encapsulated bifidobacterium in rabbits has a similar effect to that of antibiotics, hence it can be used as an alternative to them.

Keywords: Probiotics, Bifidobacterium, Encapsulation, Rabbits, Intestinal morphology.

INTRODUCCIÓN

Los antibióticos han sido utilizados, en dosis bajas, como promotores de crecimiento en la producción animal, no obstante, actualmente y dada la presencia constante y en bajas concentraciones de antibióticos, se presenta la resistencia o multiresistencia a los antibióticos para algunas bacterias, con las consecuentes implicaciones en la salud pública (Huber *et al.*, 2011). En enero de 2006, la Unión Europea prohibió el uso de esos productos en la alimentación animal, creando la necesidad de buscar alternativas para sustituirlos (Cepero, 2006). Un sustituto de los antibióticos, con el mismo fin, son los probióticos que tienen beneficios, entre los que se destacan: el control de enfermedades entéricas, regulación de la microbiota intestinal, producción de vitaminas (sobre todo las del complejo B), reducción del colesterol y triglicéridos en la sangre y activación del sistema inmune (Gaggia *et al.*, 2010, Roberfroid *et al.*, 2010), así como el incremento de peso, la producción de carne y evitar la mortalidad en animales destetados (Kritas *et al.*, 2009).

Para obtener estos beneficios es necesario que la bacteria llegue al sitio de acción en cantidad suficiente y viable (Fuller, 1989), sin embargo, no existe una metodología o procedimiento adecuado que garantice esto; por ejemplo, algunos autores como Trocino *et al.* (2005) y Pascual *et al.* (2008) suplementaron esporas de *B. cereus* var. *toyoi* en el alimento de los conejos con una dosis de 1×10^9 esporas por gramo de alimento; ambos obtuvieron resultados diferentes en ganancia de peso; por otro lado, Marin *et al.* (2007) suplementaron el probiótico de *Lactobacillus acidophilus* por vía oral en lechones, para ello utilizaron jeringas con una dosis de 5 mL; en tanto que Osorio *et al.* (2010) utilizaron el probiótico Biomin® Poultry 5 Star (*Enterococcus faecium*, *Pediococcus acidilactici*, *Bifidobacterium animalis*, *Lactobacillus salivarius* y *Lactobacillus reuteri*), suministrado en el agua con una dosis de 20 g/500 mL. Los procedimientos anteriores no garantizan la cantidad que debe consumir el animal de forma natural, por lo que el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la suplementación *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, encapsulada sobre los parámetros productivos y la morfología de las vellosidades intestinales en conejos para garantizar el consumo de concentraciones altas y activas del probiótico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales y tratamiento

Se utilizaron 45 conejos de la raza Nueva Zelanda recién destetados. Los conejos fueron alojados en jaulas de 60x90x40 cm. Fueron identificados mediante marcaje con tinta indeleble en las orejas y se distribuyeron aleatoriamente en tres grupos, cinco conejos por grupo y su triplicado: Grupo antibiótico (GA), grupo Probiótico (GP) y grupo control (GC). A todos los animales se les proporcionó agua y alimento comercial *ad libitum*. Al GA se le suplementó antibiótico sulfametaxazol/Trimetropim

(Halvet), encapsulado con carragenina dentro de pajillas de avena para una dosis de 0.3 mL/animal. Al GP se le suplemento *bifidobacterium animalis* subsp *lactis*, encapsulada en carragenina dentro de pajillas de avena en una concentración de 1×10^9 UFC/mL por pajilla. Al GC se le suplemento como placebo solución salina, encapsulada en carragenina dentro de pajillas de avena.

Microorganismo, medio y condiciones de cultivo

Se utilizó un cultivo congelado de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (BB12) que fue obsequiado por Chr. Hansen de México. El cultivo (2g) fue suspendido en 18 mL de caldo MRS modificado (con 0.5, 0.2 y 0.1 g/L de cisteína, Na_2CO_3 y CaCl_2 respectivamente), y se usó para inocular (1%) tubos con 10mL de caldo MRS modificado, los cuales fueron incubados en condiciones anaeróbicas a 39° C (González-Sánchez *et al.*, 2010). Estos cultivos fueron utilizados para inocular (10%) viales de vidrio sellados que contenían 80mL de caldo TPYG, el cual contenía (g/L) peptona de soya 5, peptona de caseína 10, extracto de levadura 2.5, glucosa 10, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.5, K_2HPO_4 2.0, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0.25, CaCl_2 0.125, FeCl_3 0.003, Cisteína 0.5 y Tween 80. A cada vial se le inyectó CO_2 , se sellaron y se incubaron en agitación a 37° C y 180 rpm por 8 h (Azaola *et al.*, 1999). Las células fueron cosechadas por centrifugación (300 g por 15 min) y resuspendidas en solución salina estéril (0.9%) para una concentración alrededor de 1×10^9 UFC/mL y almacenadas a 3° C hasta su utilización. Para su almacenamiento en congelación (-70° C) se le adicionó glicerol al 20% (V/V).

Encapsulación de la bacteria

Se emplearon pajillas de avena de aproximadamente 9 cm de largo y 2 mm de diámetro; se esterilizaron en autoclave a 110° C por 10 min y se

almacenaron para su uso posterior a 3°C. Por otro lado, se prepararon 10 g de carragenina (C1013 SIGMA), se disolvieron en 100 mL de agua y se esterilizó a 110°C por 10 minutos; se bajó la temperatura a 40°C y se mezcló con 1 mL de células suspendidas como se describió anteriormente. La solución se mezcló utilizando un agitador vortex. La doble encapsulación se obtuvo inyectando 1 mL de la mezcla de carragenina-células dentro de las pajillas de avena y se sumergieron en una solución de cloruro de calcio 0.2M para que gelificaran. Las pajillas con la mezcla carragenina-células se almacenaron a 3°C, hasta su utilización en los conejos.

Para los grupos GA y GC se realizó el mismo procedimiento anterior, con la variante de que en vez de adicionar células, se adicionó 0.3 mL de sulfametaxazol/Trimetropim (Halvet) o solución salina estéril al 1%, respectivamente.

Viabilidad de las bifidobacterias encapsuladas

Las pajillas se abrieron y el gel de carragenina-células se extrajo y se disolvió en 10 mL de citrato de sodio 0.1M (Lee and Heo, 2000). Después de 2 min, se realizaron diluciones progresivas, y posteriormente se plantaron en agar MRS. Las colonias se contaron después de ser incubadas a 37°C por 48 horas bajo condiciones anaeróbicas.

Parámetros productivos

Se registró cada semana, de forma individual, el peso vivo de los conejos de cada grupo; se midió el consumo de alimento diario y se calculó la ganancia de peso por semana durante 4 semanas, y la ganancia de peso final. Se calculó la conversión alimenticia semanalmente, el alimento consumido por grupo por semana y se dividió entre la ganancia de peso que éstos tuvieron cada semana. El consumo de alimento fue calculado restando el alimento rechazado al suministro diario.

Morfología de las vellosidades intestinales

A los 28 días de finalizado el tratamiento, se seleccionaron al azar tres conejos de cada tratamiento, se sacrificaron de acuerdo con la NOM-033-ZOO-1995, se recuperaron los intestinos para realizar el estudio histológico, para lo cual se tomaron segmentos de aproximadamente cinco centímetros de la parte media del íleon, ciego e intestino grueso de cada conejo. Las muestras fueron abiertas longitudinalmente, se enjuagaron con solución salina fría y se fijó en una solución de formalina tamponada durante aproximadamente 4 h, y después se almacenaron en etanol /agua, 70/30 (V/V) hasta su posterior análisis. El análisis histológico se realizó de acuerdo con el procedimiento descrito por Goodlad *et al.* (1991). Las preparaciones se montaron entre el portaobjetos y cubreobjetos. La longitud y el ancho de las vellosidades se midieron de acuerdo con el procedimiento descrito por Hampson (1986), utilizando un microscopio marca Olympus BX50 con cámara digital motic y software motic images plus3.0 ® .

Análisis estadístico

Los resultados se expresan como el promedio de tres repeticiones, y las posibles diferencias entre tratamientos fueron evaluadas por un análisis de varianza (ANOVA) de un factor utilizando el proceso GLM (SAS Institute, 1999), de acuerdo con el siguiente modelo:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + u_{ij}$$

Donde:

Y_{ij} = Valor de la variable de respuesta (ganancia de peso, conversión alimenticia).

μ = Media general poblacional para ganancia de peso, conversión alimenticia.

T = efecto de la del tratamiento del probiótico, antibiótico, sobre la ganancia de peso y conversión alimenticia.

σ_{ij} = error experimental, asociado a las variables.

RESULTADOS Y DISCUSION

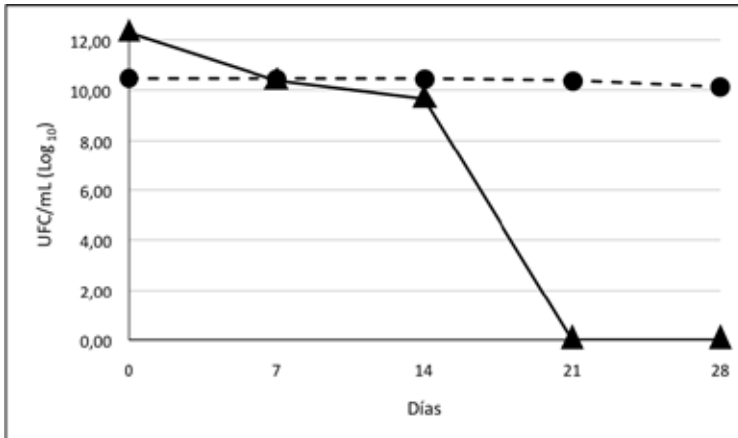
La viabilidad de las bacterias encapsuladas se mantuvo estable (10×10^{10} UFC/mL) a lo largo del experimento, en comparación a las bacterias libres en las cuales la viabilidad empieza a disminuir una unidad logarítmica a partir de los 7 días, y a los 21 días la viabilidad es nula (Figura 1), lo cual demuestra que este tipo de encapsulación es recomendable para garantizar la supervivencia de las bacterias. Este resultado está de acuerdo con lo mencionado por Shi *et al.* (2013), quienes comprobaron que la encapsulación con carragenina mejora la viabilidad de *L. bulgaricus* hasta por 30 días. La encapsulación es una herramienta útil para garantizar la supervivencia de varios tipos de células y garantizar su estabilidad durante el almacenamiento y en condiciones ácidas (Adhikary *et al.*, 2003).

Los cultivos probióticos que son encapsulados mejoran la resistencia a la acidez del medio ambiente gástrico y a las soluciones biliares (Chandramouli, 2004); otros estudios *in Vitro* e *in vivo* han mostrado que las bacterias encapsuladas mantienen su integridad en condiciones gástricas simuladas, pero subsecuentemente son liberadas en el tracto intestinal, con lo cual se garantiza que lleguen vivas al sitio de acción (Iyer, 2004).

La supervivencia de las cepas probióticas en diferentes partes del TGI es importante, puesto que éstas deben de realizar varios efectos fisiológicos en diferentes partes del mismo, hasta llegar a implantarse en el intestino; sin embargo, esta supervivencia varía: algunas cepas se mueren rápidamente en el estómago debido a que el jugo gástrico del estómago contiene ácido clorhídrico, pepsina y renina, mientras que otras pueden pasar en alto número al intestino delgado, y posteriormente al

intestino grueso. En el intestino delgado, principalmente en el duodeno, algunas cepas también pueden ser objeto de eliminación debido a que en esta parte se lleva a cabo otra hidrólisis producida por el líquido pancreático, el líquido intestinal y las sales biliares; la sobrevivencia de las bifidobacterias en esta parte es de suma importancia, puesto que la actividad metabólica que exhiben casi todas las bifidobacterias es la desconjugación de las sales biliares (Tanaka y col., 2000).

Figura 1. Viabilidad de las bacterias durante el almacenamiento



- *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* encapsulada en carragenina y en pajillas
- ▲ Bifidobacterias sin encapsular.

La ganancia de peso fue mayor en el GA y GP ($P < 0.05$) en comparación al grupo de control (Tabla 1), aun cuando la conversión alimenticia fue igual entre el grupo antibiótico y probiótico ($P > 0.05$). Esto concuerda con el trabajo realizado por Trocino *et al.* (2005), quienes suplementaron esporas de *B. cereus* var. *toyoi* en el alimento de los conejos, favoreciendo la ganancia de peso, la conversión de alimento, con disminución de la

morbilidad; sin embargo, en otro experimento realizado por Pascual *et al.* (2008), los cuales adicionaron 1×10^9 de esporas por gramo de alimento no encontraron diferencias significativas en el consumo de alimento y peso corporal entre los grupos. Por otra parte Kamra *et al.* (1996) evaluaron el efecto de *Lactobacillus acidophilus*/*Saccharomyces cerevisiae* adicionados en el alimento y no encontraron diferencias significativas en el consumo de alimento y peso corporal entre los grupos.

Tabla 1. Efecto de la suplementación de B. animalis encapsulada en los parámetros productivos de conejos Nueva Zelanda

	GC	GA	GP	EEM
Peso inicial (g)	602.87 ± 54.47	606.00 ± 34.59	629.33 ± 29.87	10.60
Peso final (g)	1262.13 ± 60.76 ^a	1650.67 ± 55.35 ^b	1679.29 ± 53.84 ^b	14.83
GDP (g)	23.54 ± 2.79 ^a	37.31 ± 1.44 ^b	37.57 ± 2.35 ^b	0.418
CA (g/g)	3.09 ± 0.46 ^a	2.47 ± 0.37 ^b	2.73 ± 0.55 ^{ab}	0.136

a,b Promedios con literales distintas dentro de la fila, son diferentes (P<0.05).

GDP = ganancia diaria de peso.

CA = conversión alimenticia.

GC= grupo control; GA Grupo antibiótico;

GP= grupo probiótico

EEM=Error estándar de la media

Morfología del intestino delgado. La longitud y ancho de las vellosidades (Tabla 2) del intestino delgado no mostraron cambios significativos (P>0.05) entre los grupos; sin embargo, las vellosidades del intestino del grupo control (GC) mostró necrosis en la submucosa y lámina muscular. Por otro lado, en el corte transversal del intestino delgado, la mucosa del grupo tratado con antibióticos presentó una ligera inflamación, pero en algunas zonas la submucosa se separó de la lámina muscular, además las vellosidades tenían un ligero desprendimiento y hemorragia, así

como poca presencia de macrófagos y eosinófilos. Por último, el grupo con probióticos tuvo la submucosa más homogénea, en comparación a los otros dos grupos, además algunas regiones presentaron zonas inflamadas. Las vellosidades fueron más grandes ($P < 0.05$) y con menor destrucción o desprendimiento.

Morfología del colon. La longitud y ancho de las vellosidades tienen diferencia significativa ($P < 0.05$) entre los grupos GC y GP, GC y GA (Cuadro 2). Así mismo, se observó una mayor presencia de placas de Peyer en el GP, en comparación a los otros dos grupos. El GC tuvo necrosis en áreas a nivel de la submucosa y lámina muscular, así como hemorragias de tamaño considerable. En el grupo con antibióticos, las vellosidades tenían superficie más amplia y menor necrosis. En el GP, las vellosidades estaban ramificadas, con amplia superficie de absorción, fusionadas y con gran cantidad de glándulas, visualmente parecen poseer un mayor número de infiltrados linfocitarios.

Morfología del ciego. El grupo GC presentó ligera inflamación a nivel de la submucosa, el GA no presentó lesiones y en el GP sólo se observa un incremento de vellosidades, pero no es significativa ($P > 0.05$).

El suministro de la pajilla con carragenina brinda un aporte de fibra al conejo; la inclusión de fibra en la dieta podría minimizar el deterioro de las vellosidades intestinales y mantener la actividad de los enterocitos en el período post-destete, mientras que la adición de fibra lignificada puede llevar a la atrofia estructural, menor actividad de las células intestinales y la proliferación de *Cl. Perfringens* (De Blas *et al.*, 2012).

El efecto barrera generado por algunos probióticos puede derivar de una modulación positiva de la capa mucosa que separa el lumen intestinal de los colonocitos. De hecho, los probióticos pueden cambiar la barrera de la mucosa intestinal por estabilización de la mucosa intestinal, la regulación de la permeabilidad intestinal (Brandtzaeg *et al.*, 1989).

Tabla 2. Efecto de la suplementación de *B. animalis* encapsulada en la morfología de las vellosidades del intestino

	GC	GA	GP	EEM
Intestino delgado				
Longitud, μm	2623.4 \pm 231.29	2310.8 \pm 343.80	2451.4 \pm 284.93	96.78
Ancho, μm	378.43 \pm 160.24	320.88 \pm 87.45	368.31 \pm 145.69	44.95
Profundidad cripta, μm	114.57 \pm 87.40	57.78 \pm 11.22	78.97 \pm 59.93	20.51
Colon				
Longitud, μm	2385.4 \pm 301.57 ^a	1407.7 \pm 139.54 ^b	2365.3 \pm 32.14 ^a	88.80
Ancho, μm	171.09 \pm 48.99	205.87 \pm 163.28	217.63 \pm 96.41	37.69
Profundidad cripta, μm	98.40 \pm 17.32 ^a	67.87 \pm 13.32 ^b	79.39 \pm 20.12 ^{ab}	5.72
Ciego				
Longitud, μm	479.64 \pm 67.59	404.31 \pm 96.05	482.73 \pm 91.39	28.65
Ancho, μm	407.32 \pm 101.17	337.39 \pm 110.80	389.68 \pm 185.00	45.84
Profundidad cripta, μm	55.07 \pm 12.68	53.52 \pm 15.75	44.43 \pm 25.01	6.19

^{ab} Promedio con literales distintas dentro de la fila, son diferentes ($P < 0.05$)

GC= Grupo control

GA= Grupo antibiótico

GP= Grupo probiótico

EEM=Error estándar de la media

De acuerdo con Shah (2011), *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (BB12) modula el crecimiento de las vellosidades del intestino y favorece el desarrollo de las vellosidades intestinales, lo que explica, en parte, el efecto benéfico que poseen estos productos. Los componentes en los alimentos para conejos han demostrado afectar la morfología intestinal, sin embargo, es escasa la literatura sobre morfología intestinal de conejos alimentados con probióticos y prebióticos (Chiou *et al.*, 1994).

Las bifidobacterias regulan la fermentación colónica, esto es importante porque se estimula el crecimiento bacteriano (biomasa) y la producción de ácidos orgánicos (ácido láctico y ácidos grasos de cadena corta-AGCC), éstos son producidos, junto con los gases: H_2 , CO_2 y CH_4 . Los AGCC (principalmente acetato, propionato y butirato) son los principales productos finales de las reacciones fermentativas de las bacterias y los principales aniones en el intestino grueso (Mortensen, 1996). Todos los AGCC se absorben rápidamente en el intestino grueso y estimulan la absorción de agua y sal. Estos ácidos se metabolizan principalmente en el epitelio intestinal, hígado y músculo, y una de sus principales características es su efecto trófico sobre el epitelio intestinal. Además, el butirato es importante como fuente de energía para el epitelio colónico y regula la diferenciación y crecimiento celular (Bugaut y Bentejac, 1993). Aun cuando las bifidobacterias no producen directamente butirato, producen lactato, el cual puede ser transformado a butirato (Duncan *et al.*, 2004). Además de los productos de la fermentación, las bacterias del intestino, incluyendo las bifidobacterias, son capaces de sintetizar vitaminas, especialmente vitaminas del complejo B (Crittenden *et al.*, 2003).

Los productos del metabolismo de los probióticos van desde ácidos grasos de cadena corta, hasta ácidos orgánicos esenciales como el ácido fólico y el ácido orótico. Estos compuestos crean un medio ácido en el intestino por la disminución del pH y, a su vez, modulan una serie de eventos fisiológicos y benéficos en el hospedero. La liberación de varias enzimas dentro del lumen intestinal por las bacterias probióticas ejerce efectos sinérgicos en la digestión y alivio de síntomas por la mala absorción intestinal (Naidu *et al.*, 1999).

CONCLUSIONES

Las bifidobacterias parecen ser capaces de modificar la morfología del intestino en animales sanos, mejorando la integridad de las vellosidades, sin que esto afecte el desarrollo normal de los animales.

La encapsulación propuesta es un vehículo ideal para mantener vivas las células probióticas y ser administradas de forma eficiente al animal. En relación a la cantidad de bacterias, es necesario probar con diferentes dosis para establecer cuál sería la óptima a suministrar y que provea el efecto benéfico deseable.

Este tipo de encapsulación puede utilizarse para administrar o probar medicamentos o suplementos en los conejos, garantizando que los consuman de forma natural.

BIBLIOGRAFÍA

- Adhikary, K. *et al.*, 2003, "Survival and Metabolic Activity of Microencapsulated *Bifidobacterium longum* in Stirred Yogurt", en *Food Microbiology and Safety* 1: 275-280.
- Azaola, A. *et al.*, 1999, "Use of surface response methodology to describe biomass production of *Bifidobacterium infantis* in complex media", en *Biotechnology Techniques* 13: 93-95.
- Brandtzaeg, P. *et al.*, 1989, "Immunobiology and immunopathology of human gut mucosa: Humoral immunity and intraepithelial lymphocytes", en *Gastroenterology* 97: 1562-84.
- Bugaut, M. y M. Bentejac, 1993, "Biological effects of short-chain fatty acids in nonruminant mammals", en *Annual Review of Nutrition*, 13:217-41.
- Chandramouli, C., *et al.*, 2004, "An improved method of microencapsulation and its evaluation to protect *Lactobacillus spp.* In simulated gastric conditions", en *Journal Microbiology Methods* 56:27-35.

- Cepero, R., 2006, "Retirada de los antibióticos promotores de crecimiento en la Unión Europea causas y consecuencias", en http://www.wpsa-aeca.es/aeca_imgs_docs/24_01_30_MEXICO05-RCB.pdf, consultado 20/03/16.
- Chiou, W. y L. Chang, 1994, "Effect of different components of dietary fiber on the intestinal morphology of domestic rabbits", en *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* 108: 629-6.
- Crittenden, G. *et al.*, 2003, "Synthesis and utilisation of folate by yoghurt starter cultures and probiotic bacteria", en *International Journal of Food Microbiology* 80: 217-22.
- De Blas, C. *et al.*, 2012, "Nutritional digestive disturbances in weaner rabbits", en *Animal Feed Science and Technology* 173: 102-110.
- Duncan, H. *et al.*, 2004, "Lactate-utilizing bacteria, isolated from human feces, that produce butyrate as a major fermentation product", en *Applied and Environmental Microbiology* 70: 5810-17.
- Fuller, R., 1989, "Probiotics in Man and Animals", en *Journal of Applied Bacteriology* 66: 365-378.
- Gaggia, F. *et al.*, 2010, "Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production", en *International Journal of Food Microbiology* 141 Suppl 1: S15-28.
- Gonzalez, F. *et al.*, 2010, "Viability of microencapsulated *Bifidobacterium animalis* ssp *lactis* BB12 in kefir during refrigerated storage", en *International Journal of Dairy Technology* 63: 431-436.
- Goodlad, A. *et al.*, 1991, "Morphometry and cell proliferation in endoscopic biopsies", en *Gastroenterology* 101: 1235-1241.
- Hampson, J., 1986, "Alterations in piglet small intestinal structure at weaning", en *Research Veterenary Science* 40: 32-38.
- Huber, H. *et al.*, 2011, "Prevalence and characteristics of methicillin resistant coagulase-negative staphylococci from livestock, chicken carcasses, bulk tank milk, minced meat, and contact persons", en *BMC Veterinary Research* 7: 6.

- Iyer, C. *et al.*, 2004. "Evaluation of survival and release of encapsulated bacteria in ex vivo porcine gastrointestinal contents using a green fluorescent protein gene-labelled *E. coli*.", en *Lebens Wissens Technology* 37: 639-642
- Kamra, N. *et al.*, 1996, "Influence of feeding probiotics on growth performance and nutrient digestibility in rabbits", en *World Rabbit Science* 4: 85-88.
- Kritas, K. *et al.*, 2009, "The effect of probiotics on microbiology, health and performance of fattening rabbits", en *Journal of Animal Science* 21: 1312-1317.
- Lee, K. y R. HEO, 2000, "Survival of *Bifidobacterium longum* immobilized in calcium alginate beads in simulated gastric juice and bile salt solution", en *Applied and Environmental Microbiology* 66: 869-873.
- Marin, A. *et al.*, 2007, "Estudio del efecto en lechones lactantes del probiótico de la biomasa proteica obtenida por la tecnología de cultivo de *Lactobacilli* y levaduras en miel 'B'", en *Livestock Research for Rural Development* 19: 230-235.
- Mortensen, B. y R. Clausen, 1996, "Short-chain fatty acids in the human colon: relation to gastrointestinal health and disease", en *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 216(suppl): 132-48.
- Naidu, S. *et al.*, 1999, "Probiotic Spectra of Lactic acid Bacteria (LAB)", en *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 38: 13-126.
- NOM-033-ZOO-1995. Norma Oficial Mexicana. Sacrificio humanitario de los animales domesticos y silvestres, Diario Oficial de la Federación, 16 de julio de 1997.
- Osorio, C. *et al.*, 2010, "Comparación del rendimiento productivo de pollos de carne suplementados con un probiótico versus un antibiótico", en *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú* 21: 219-222.
- Pascual, J. *et al.*, 2008, "Effects of dietary inclusion of *Toyocerin* (*Bacillus cereus* var. *toyo*) on performance, health and faecal nitrogen excretion in growing rabbits", en *9th World Rabbit Congress Verona Italy* [memorias].

- Pérez, M. *et al.*, 2002, "Evaluación de la actividad probiótica de un producto de exclusión competitiva sobre indicadores microbiológicos en el ciego de pollos de ceba", en *Revista Cubana de Ciencia Avícola* 26: 29-35.
- Roberfroid, M. *et al.*, 2010, "Prebiotic effects: metabolic and health benefits", en *British Journal of Nutrition* 104: S1-S63.
- Shah, P., 2011, "Bacteria, Beneficial | Bifidobacterium spp.: Morphology and Physiology", en Fuquay, W. (ed.) *Encyclopedia of Dairy Sciences*, 2a. ed., Academic Press, San Diego.
- Shi, L. *et al.*, 2013, "Encapsulation of Lactobacillus bulgaricus in carrageenan-locust bean gum coated milk microspheres with double layer structure", en *LWT-Food Science and Technology* 54: 147-151.
- Smirnov, A. *et al.*, 2005, "Mucin dynamics and microbial populations in chicken small intestine are changed by dietary probiotic and antibiotic growth promoter supplementation", en *Journal Nutrition* 135: 187-192.
- Tanaka, H. *et al.*, 2000, "Bile Salt Hydrolase of *Bifidobacterium longum*—Biochemical and Genetic Characterization", en *Applied Environmental Microbiology* 66: 2502-2512.
- Trocino, A. *et al.*, 2005, "Effect of diet supplementation with *Toyocerin*(*R*) (*Bacillus cereus* var. *toyoi*) on performance and health of growing rabbits", en *World Rabbit Science* 13:17-28.

