

Nutrición

VALORACIÓN DEL IMPACTO DE DIETAS MEDICADAS SOBRE EL RITMO DE CRECIMIENTO Y LA FERMENTACIÓN CECAL DE CONEJOS EN CEBO

Impact valuation of medicated diets on caecal fermentation of growing rabbits

L. Abecia M. Fondevila, J. Balcells y A. Belenguer

Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos,
Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza,
Miguel Servet 177, 50013, Zaragoza

RESUMEN

Este trabajo estudia el impacto de la inclusión de antibióticos en dietas medicadas contra patógenos sobre la actividad fermentativa cecal de conejos en cebo intensivo. Se utilizaron 24 conejos neozelandeses destetados a los 28 días, con un peso inicial de 667 ± 25.5 g, agrupados en 4 tratamientos que consistieron en una dieta base (NAB) suplementada con 100 ppm de bacitracina (BAC), 400 ppm de clortetraciclina (CTC) o 100 ppm de tiamulina (TIA), antibióticos y dosis terapéuticas utilizados comúnmente. Las dietas se administraron *ad libitum* durante 28 días y los animales fueron pesados semanalmente. Los conejos fueron sacrificados al final del periodo experimental y su ciego muestreado. No se observaron diferencias en la tasa de crecimiento, aunque con la CTC tendió ($p=0.10$) a ser menor, mientras que el peso del ciego fue mayor ($p<0.01$). El tratamiento con CTC mostró una concentración de AGV numéricamente menor ($p<0.10$). La proporción de propionato fue mayor ($p<0.01$) y la de butirato menor ($p=0.03$) con la CTC respecto a TIA, mientras que los tratamientos NAB y BAC mostraron proporciones intermedias. Los tratamientos no afectaron a los recuentos totales de bacterias anaeróbicas ni a la actividad polisacaridasa de la población microbiana, aunque la actividad xilanasas fue más del doble con la dieta control que con la BAC. Los antibióticos evaluados no tuvieron un efecto importante en el ambiente microbiano cecal, observándose únicamente un incremento en la proporción de propionato con la CTC y una mayor proporción de butirato con la TIA que con CTC, que podría sugerir un efecto cualitativo a nivel de la biodiversidad bacteriana del ciego.

ABSTRACT

The possible side-effects of dietary inclusion of antibiotics in medicated diet against pathogens on microbial fermentative activity in the rabbit cecum were studied. Twenty-four growing New Zealand rabbits weaned at 28 days (667 ± 25.5 g initial weight) were allocated to 4 treatments of 6 rabbits. Diets consisted of a common mixed feed (NAB) as a control, supplemented with 100 ppm bacitracin (BAC), 400 ppm chlortetracycline (CTC) or 100 ppm tiamulin (TIA), antibiotics and doses commonly used in rabbit therapy. Rabbits were given the experimental diets *ad libitum* for 28 days, being weighed individually every week. Animals were slaughtered at the end of the experimental period and their cecum excised. No significant differences were found on growth rate, although with CTC it

tended ($p=0.10$) to be lower, whereas cecal weight was the highest with CTC ($p<0.01$). The CTC treatment showed a numerically lower VFA concentration ($p<0.10$). Propionate proportion was higher ($p<0.01$) and butyrate proportion lower ($p=0.03$) with CTC than TIA, with NAB and BAC recording intermediate proportions. Treatments did not affect either total anaerobic bacterial counts or polysaccharidase activity of microbial population, although xylanase activity with NAB was more than two-fold that with BAC. These antibiotics did not have a major effect on overall cecal microbial environment, and only an increase in propionate proportion with CTC and a higher butyrate proportion with CTC than TIA were noticeable, suggesting a qualitative effect on the caecal bacterial biodiversity.

■ INTRODUCCIÓN

El uso de piensos medicados en explotaciones intensivas de conejos se ha visto incrementado con la aparición de la Enteropatía Epizootica del Conejo (ECC). La utilización de dietas medicadas, además de un efecto sobre los microorganismos patógenos, puede también alterar el ambiente cecal y con ello la capacidad fermentativa del ciego. Los procesos de fermentación en dicho compartimento tienen un efecto fundamental en el animal hospedador, tanto por la fermentación de los carbohidratos estructurales que aporta ácidos grasos volátiles (AGV) como fuente de energía (hasta el 0.40 de las necesidades de mantenimiento, Marty y Vernay, 1984) como por el reciclaje de proteína microbiana cecal mediante la cecotrofia, fundamentalmente para la economía del nitrógeno en el conejo (García et al., 2000). La inclusión de sustancias antibióticas en la ración puede alterar cuantitativa y cualitativamente la población microbiana cecal y con ello minimizar este componente funcional, fundamental en la nutrición del conejo.

En este trabajo se estudia, mediante diferentes parámetros de fermentación cecal, el impacto de algunos antibióticos utilizados ampliamente en piensos medicados en conejos en cebo.

■ MATERIAL Y MÉTODOS

Animales y Dietas

La ración experimental fue formulada en base a (g/kg): cebada, 440; heno de alfalfa, 240; pulpa remolacha, 82; harina de soja, 150; paja, 60 y 9 de complemento vitamínico mineral. Esta dieta fue administrada "*ad libitum*", sin suplementar con antibióticos (NAB) o con 100 ppm de bacitracina (BAC), 400 ppm de clortetraciclina (CTC) o 100 ppm de tiamulina (TIA). Los antibióticos y las dosis de administración se establecieron atendiendo a los criterios utilizados comúnmente en la formulación comercial de piensos medicados.

Las raciones se administraron durante el periodo de cebo (28 días) a 24 conejos machos de raza Blanco Neozelandés, destetados a las 4 semanas con un peso inicial de 667 ± 25.5 g, que fueron divididos al azar en cuatro lotes de 6 animales. Los animales fueron sometidos a un ciclo nicotemeral controlado (12h luz/oscuridad) sin ninguna limitación de acceso al agua de bebida.

Procedimiento experimental y recogida de muestras

Durante el periodo experimental, los animales fueron pesados cada 7 días. Tras este periodo fueron sacrificados por dislocación cervical, aislándose el tracto digestivo completo. El ciego se ligó, seccionó y se pesó el órgano completo; se determinó el pH del contenido cecal que se muestreo a continuación. Dos muestras cecales (1 g materia fresca, MF) fueron recogidas en 1 ml HCl 0.2 N o en 1 ml 0.5M H₃PO₄ y 50mM-3metil valerato para la determinación de nitrógeno amoniacal o AGV respectivamente. Una tercera muestra (2 g MF) se congeló inmediatamente para la posterior determinación de la actividad enzimática microbiana y una cuarta (2 g MF) para la realización de recuentos de bacterias.

Análisis químicos

La concentración de AGV en el contenido cecal se determinó mediante cromatografía de gases siguiendo la técnica descrita por Jouany (1982). El amoníaco en el contenido cecal acidificado y centrifugado tras su descongelación (13.200 r.p.m. durante 30 minutos) se analizó mediante la técnica colorimétrica descrita por Chaney y Marbach (1962), basada en la reacción de Berthelot (fenol-hipoclorito).

Las enzimas bacterianas fueron extraídas con lisozima de acuerdo con Silva et al. (1987), y su actividad se contrastó frente a carboximetilcelulosa y xilano como sustratos para evaluar la actividad celulasa y xilanasas respectivamente, siguiendo el método descrito por Nelson-Somogy (Ashwell, 1957). El tratamiento de las muestras y la metodología para la determinación de recuentos microbianos se realizó mediante diluciones seriadas y cultivo en medio completo. La concentración de bacterias en medio líquido se estimó a partir de la técnica del número más probable (Dehority et al., 1989) y los resultados se expresan en base logarítmica.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Dado que el diseño experimental no se enfocó explícitamente al estudio de los rendimientos productivos, los resultados de crecimiento obtenidos en este estudio deben analizarse con precaución. No obstante, el análisis de los resultados en el ritmo de crecimiento mediante contrastes ortogonales mostró una tendencia en el grupo de CTC a ser menor que el resto ($p=0.10$).

Tabla 1. Valores medios de los ritmos de crecimiento diarios (g/d), peso de ciego (g) y pH de los animales consumiendo cada ración experimental.

	Crecimiento	Peso ciego	pH
NBA	39,97	133,28 ^b	6,32
BAC	93,13	125,24 ^b	6,34
CTC	34,17	167,05 ^a	6,60
TIA	41,29	30,526 ^b	6,28
Media	38,64	138,96	6,38
E.S	1,55	9,51	0,07

Letras diferentes indican diferencias significativas ($p<0.05$)

El efecto de la CTC sobre el ritmo de crecimiento contrasta con los resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio, en los que no se pudo registrar ninguna diferencia entre los antibióticos a estudio (clortetraciclina y bacitracina; Abecia et al., 2005). Se debe mencionar que en dicho trabajo, aunque las dietas tenían características similares, los ritmos de crecimiento fueron inferiores (30 vs 38 g/d), diferencia que pudo deberse a que en ese experimento los animales fueron mantenidos en jaulas individuales y los niveles de adaptación no fueron nunca completos. Un hipotético efecto de la clortetraciclina que se manifieste sólo a ritmos elevados de crecimiento cuando es administrado a dosis comerciales debe ser confirmado experimentalmente.

La CTC también modificó algunos parámetros digestivos: el peso del ciego fue superior ($p<0.01$) y su contenido mostró un pH numéricamente más alto aunque sin alcanzar significación estadística. En lo relativo a la concentración de AGV (Tabla 2), la CTC mostró una concentración aparentemente inferior a los restantes tratamientos, aunque la falta de diferencias significativas puede deberse a la gran variabilidad individual registrada (coeficiente de variación, CV = 0.14) enmascarando el efecto real de dicho antibiótico sobre la flora cecal. La mayor proporción de propiónico se alcanzó

con CTC ($p < 0.01$) y la de butírico fue menor con CTC que con TIA ($p = 0.03$), no observándose diferencias entre las proporciones con NAB y BAC y los otros tratamientos. No hubo diferencias significativas entre tratamientos en la proporción de acético.

Tabla 2. Concentraciones (mM/L) de AGV totales y las proporciones molares (%) de los principales AGV en ciego de conejos en cebo con los diferentes tratamientos a estudio.

	AGV totales	Acético	Propiónico	Butírico
NBA	72.7	76.8	6.4 ^b	14.4 ^{ab}
BAC	81.5	77.2	4.8 ^b	17.0 ^{ab}
CTC	60.9	77.1	11.0 ^a	10.4 ^b
TIA	74.5	74.5	4.2 ^b	20.3 ^a
Media	72.43	76.44	6.65	15.56
E.S	4.2	0.63	1.53	2.10

Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

El perfil de AGV coincide en general con resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio (Belenguer et al., 2002; Abecia et al., 2005) y otros (Bellier and Gidenne., 1996). Los autores de la presente memoria no han podido validar sus resultados con otros trabajos de naturaleza similar. No obstante si la CTC redujese los niveles de fermentación, ello explicaría el aumento del contenido cecal, el menor nivel de pH registrado y la menor concentración aparente de AGV registrada con esta ración, y pudiera justificar un menor ritmo de crecimiento.

La predominancia de una fermentación acética en el ciego, con una proporción mayor de butírico que de propiónico, coincide con la mayor parte de la bibliografía consultada en lo que se refiere tanto a animales en crecimiento (García et al., 2000; Abecia et al., 2005) como en lactación (Belenguer et al., 2004). Las diferencias significativas observadas en las proporciones de propiónico y butírico, fundamentalmente entre clortetraciclina y tiamulina, indican una acción selectiva de cada uno de estos antibióticos sobre especies diferentes de bacterias cecales.

Los tratamientos no afectaron a los recuentos de bacterias anaerobias totales (Tabla 3). Anteriormente, con raciones de similares características incluyendo antibióticos las concentraciones (en base logarítmica) correspondieron a 9.32 para una dieta control y 9.51 y 9.20 para las dietas con clortetraciclina y bacitracina, respectivamente (Abecia et al., 2005). En el mismo sentido, no se detectaron diferencias significativas en la actividad polisacaridasa total de la población microbiana, aunque numéricamente ($p > 0.10$) la actividad xilanas microbiana en el grupo de animales que ingirieron la dieta NAB duplicó la registrada con aquellos que se alimentaban de la dieta BAC. Del mismo modo que para la concentración total de AGV, la ausencia de diferencias en la concentración total de bacterias anaerobias cecales y en su actividad enzimática total pudiera estar mediatizada por la amplia variabilidad inherente a las técnicas, registrada cuando se comparan diferentes trabajos o incluso dentro de ellos, lo que limitaría la utilización de este procedimiento para valorar las hipótesis planteadas en este experimento. A pesar de ello, los resultados parecen indicar que el efecto de algunos de los antibióticos evaluados (clortetraciclina y tiamulina) no tiene una repercusión cuantitativa importante sobre la población cecal o su actividad fermentativa, aunque pueden existir efectos cualitativos, manifestados en las proporciones de los AGV, relacionados con un impacto selectivo de dichos antibióticos sobre la biodiversidad bacteriana del ciego.

Tabla 3: Concentración total de bacterias (log/g MF) en contenido cecal y actividad enzimática xilanasa (Xasa) y carboximetil celulasa (CMCasa) de las bacterias cecales (μ mol de azúcar liberado por min/ g de contenido).

	Concentración de bacterias	Actividad Xasa	Actividad CMCasa
NBA	9.106	0.276	0.027
BAC	8.846	0.127	0.017
CTC	9.247	0.187	0.014
TIA	8.977	0.221	0.021
Media	9.044	0.2029	0.0195
E.S	0.271	0.0312	0.0028

■ IMPLICACIONES

En las condiciones experimentales de este trabajo, las dietas medicadas no mostraron variaciones cuantitativas relevantes respecto a la dieta control en los parámetros fermentativos, aunque sugieren un menor rendimiento con clortetraciclina. No obstante, las diferencias en las proporciones de propiónico y butírico entre las dietas que incluyeron clortetraciclina o tiamulina indican un efecto cualitativo sobre la población bacteriana cecal, que exigiría posteriores investigaciones.

■ AGRADECIMIENTOS

L. Abecia disfrutó una beca para la formación de investigadores del Gobierno Vasco.

REFERENCIAS

- ABECIA L., BALCELLS J., FONDEVILA M., BELENGUER, A., CALLEJA, L. 2005. Effect of therapeutic doses of antibiotics in the diet on the digestibility and caecal fermentation in growing rabbits. *Anim. Res.* 54: 307-314.
- ASHWELL G. 1957. Colorimetric analysis of sugars. In: *Methods in Enzymology*, vol 3, pp 85-86. S.P. Colowick and N.O. Kaplan (eds), Academic Press, New York.
- BELENGUER A., BALCELLS J., ABECIA L., DECOUX M. 2004. Efecto del tipo de carbohidrato sobre la producción de leche y el ambiente cecal en conejas en lactación. *XXIX Symposium de Cunicultura*, Lugo, 127-132.
- BELENGUER A., BALCELLS J., FONDEVILA M., TORRE C. 2002. Caecotrophes intake in growing rabbits estimated from urinary excretion of purine derivatives or from direct measurement using animals provided with a neck collar: effect of type and level of dietary carbohydrate. *Anim. Sci.* 74: 135-144.
- BELLIER R., GIDENNE T. 1996. Consequences of reduced fibre intake on digestion, rate of passage and caecal microbial activity in the young rabbit. *Br. J. Nutr.* 75: 353-363.
- CHANEY A.L., MARBACH E.P. 1962. Modified reagents for the determination of urea and ammonia. *Clin. Chem.* 8: 131-142.
- DEHORITY B.A., TIRABASSO P.A., GRIFO A.P. 1989. Most-probable number procedures for enumerating ruminal bacteria, including the simultaneous estimation of total and cellulolytic numbers in one medium. *Appl. Environ. Microb.* 55: 2789-2792.
- .., PEREZ-ALBA L., . 2000. Effect of fiber source on cecal fermentation and nitrogen recycled through cecotrophy in rabbits. 78: 638-646.
- JOUANY J.P. 1982. Volatile fatty acid and alcohol determination in digestive contents, silage juices, bacterial cultures and anaerobic fermentor contents. *Science des Aliments* 2: 131-144.
- MARTY J., VERNAY M. 1984. Absorption and metabolism of the volatile fatty acids in the hindgut of the rabbit. *Br. J. Nutr.* 51: 265-277.
- SILVA A.T., WALLACE R.J., ORSKOV, E.R. 1987. Use of particle-bound enzyme activity to predict the rate and extent of fibre degradation in the rumen. *Br. J. Nutr.* 57: 407-415.