

Efecto de las dietas medicadas con clortetraciclina, bacitracina o ácido fumárico sobre el ecosistema cecal de conejos en crecimiento

_____ L. Abecia, A. Belenguer, J. Bacells, M. Fondevila y M. Decoux

Abecia¹, L., Belenguer¹, A., Bacells¹, J., Fondevila¹, M. y Decoux², M.

1 - Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos. Facultad de Veterinaria. Miguel Servet 177. 50013 Zaragoza.

2 - Cargill S.L. Passeig de Sant Joan 184. Barcelona

Resumen

Se utilizaron 72 conejos en crecimiento distribuidos en lotes de 8 individuos, a los que se administraron nueve dietas similares, formuladas en base a cebada, heno de alfalfa, pulpa de remolacha y soja, y suplementadas con diferentes dosis de clortetraciclina (200, 400 y 800 ppm), bacitracina (25, 50 y 100 ppm) y ácido fumárico (500 y 1000 ppm).

El pH cecal (6.04) y la concentración de amoníaco (4.34 ± 1.1 mg/100ml) no fueron modificados por el tratamiento experimental. A su vez, el contenido cecal tendió a ser superior cuando los animales recibían clortetraciclina como aditivo, mientras que el peso del órgano vacío presentó un valor aparentemente superior con el ácido fumárico. Las dietas con clortetraciclina indujeron una mayor concentración bacteriana y un mayor número de bacterias amilolíticas frente a las raciones con bacitracina o ácido fumárico. Sin embargo, el conteo de bacterias celulolíticas fue superior en animales que recibieron el ácido fumárico como aditivo respecto a los dos antibióticos, aunque sólo con el mayor nivel de inclusión.

Por el contrario, los niveles de excreción de derivados púricos fueron superiores cuando los animales ingerían las dietas suplementadas con bacitracina, indicando un mayor consumo/producción de cecotrofos en estos animales

Abstract

Seventy-two growing rabbits, divided in eight animal groups, were fed nine similar diets based on barley, alfalfa hay, sugar beet pulp and soya bean meal, and supplemented with different doses of chlortetracycline (200, 400 y 800 ppm), bacitracin (25, 50 y 100 ppm) and fumaric acid (500 y 1000 ppm).

Caecal pH (6.04) and ammonia concentration (4.34 ± 1.1 mg/100ml) were not modified by the experimental treatment. Caecal contents tended to be higher when animals received chlortetracycline as additive, although empty caecum weight was apparently higher with fumaric acid. Chlortetracycline diets induced a bigger bacterial concentration and higher number of amylolytic bacteria against diets supplemented with bacitracine or fumaric acid. However, cellulolytic bacteria were more numerous in animals fed diet with fumaric acid against both antibiotics, but this effect occurred only when level of inclusion was high.

On the contrary, purine derivatives excretion was higher in animals receiving bacitracin diet, pointing out that caecotrophes intake/production was more positive in those animals.

Introducción

Uno de los factores que más limitan el desarrollo de la cunicultura intensiva es la susceptibilidad de esta especie a las alteraciones digestivas, principal causa de mortalidad (Morisse et al., 1984). Con el objeto de minimizar la aparición de este tipo de sintomatologías se incorporaron antibióticos en el pienso en forma de aditivos a concentraciones subterapéuticas, y actualmente su uso está controlado por la legislación europea. La inclusión de antibióticos en el pienso de los conejo en cebo debe ser considerada bajo una doble perspectiva, la primera es la medida en que las diferentes sustancias son capaces de evitar la proliferación de especies patógenas sin que el nivel de residuos en la canal limiten su consumo. La segunda es el efecto de dichas sustancias sobre los procesos de fermentación y biosíntesis que se producen de forma fisiológica en el ciego-colon y cuyo contribución al metabolismo energético y proteico es fundamental para esta especie (Marty y Vernay, 1984; Carabaño y Fraga, 1989).

El objetivo del presente estudio es analizar el efecto sobre la fermentación cecal de dos antibióticos, bacitracina y clortetraciclina, y un acidificante cuando estos son administrados a diferentes dosis.

Material y métodos

Animales y dietas

Se utilizaron 72 conejos machos de raza Neozelandesa con una edad aproximada de 50 días, distribuidos en lotes de 8 individuos. La dieta basal se formuló en base a cebada, heno de alfalfa, pulpa de remolacha y soja, y fue suplementada con tres niveles de clortetraciclina (200, 400 y 800 ppm), bacitracina (25, 50 y 100 ppm) o ácido fumárico (AF) (500 y 1000 ppm), resultando nueve raciones experimentales. Las dietas fueron distribuidas al azar, de forma que cada uno de los 8 animales que constituían cada lote experimental consumiese una ración diferente. Las raciones se administraron "ad libitum" y los animales tuvieron libre acceso al agua de bebida.

Tabla-1

Composición bromatológica (%) y química (%MS) de la ración experimental			
Ingredientes	Dieta	Composición	Dieta
Cebada	44	MS	90,21
Heno de alfalfa	24	MO	91,5
Pulpa	8,20	FND	26,98
Paja	6	FAD	15,53
Soja	15	LAD	2,69
CaCo ³	1,15	PB	17,04
Excipiente	0,90	Cenizas	8,5
Sal	0,30		

Desarrollo experimental

Cada periodo experimental tuvo una duración de 21 días, dividido en tres subperiodos de 7 días. En el primero, cada lote de animales permaneció en una jaula colectiva, se procedió a la adaptación de los animales a la ración experimental y se controlaron los pesos. En el segundo subperiodo los conejos se alojaron en jaulas individuales, se continuó con la adaptación de los animales, controlando el peso y la ingestión voluntaria. En el último subperiodo los animales fueron alojados en jaulas metabólicas y tras dos días de adaptación a las jaulas se procedió a la colección de orina. El peso de los animales se determinó al principio y final de cada subperiodo. Al final del periodo experimental se procedió al sacrificio de 4 animales de cada grupo con el fin de determinar diferentes parámetros cecales y microbiológicos.

Recogida y preparación de muestras

La orina se recogió diariamente en ácido sulfúrico 1 M, para mantener un pH inferior a 3. Una vez pesada, se diluyó hasta 1 litro en agua destilada para evitar la posible precipitación del ácido úrico, y de ahí se tomaron 200 ml para almacenar conjuntamente los 4 días de colección en congelación a -20°C .

De cada lote experimental (8 animales) se seleccionaron al azar 4 animales para su sacrificio. Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical, aislándose el tracto digestivo completo. El ciego se ligó, seccionó y se pesó el órgano completo y vacío; se determinó su pH y se tomaron muestras del contenido cecal: una de ellas (1 g) fue acidificada (1 ml HCl 0.2 N) para la determinación de NH_3 ; una segunda (2 g) se destinó a la determinación de la actividad enzimática y una tercera (2 g) para realizar contajes bacterianos. El recuento de bacterias cecales, totales, amilolíticas y celulolíticas se realizó según el método del número más probable (Dehority y col., 1989).

Análisis químicos

El contenido en materia seca (MS) del alimento se determinó mediante desecación en estufa (60°C 48 horas). Una vez secas, las muestras se molieron a 1 mm para el resto de determinaciones analíticas. El contenido en cenizas se determinó mediante incineración en mufla a 550°C durante 8 horas. La determinación de N total se llevó a cabo mediante el método Kjeldhal. La determinación de FND, FAD y LAD se realizó según el método propuesto por Van Soest y col. (1991), previa hidrólisis del almidón.

El amoníaco en el contenido cecal se analizó mediante la técnica colorimétrica descrita por Chaney y Marbach (1962). Los derivados púricos (DP) en orina (alantoína, ácido úrico, xantina, hipoxantina) fueron analizados por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Balcells et al., 1992). La extracción enzimática se llevó a cabo siguiendo la técnica descrita por Silva et al. (1987). Posteriormente en el extracto enzimático se evaluaron las actividades celulasa, xilanasas y amilasa respectivamente, siguiendo el método de Nelson-Somogy (Ashwell, 1957). La actividad enzimática (μmol azúcar/ml extracto enzimático por minuto) es expresada como actividad enzimática total (por g MS).

Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza, para estudiar el efecto tratamiento. Se empleó el programa estadístico SAS (2000) para establecer los siguientes contrastes: control vs bacitracina; fumárico vs bacitracina; fumárico vs clortetraciclina; bacitracina vs clortetraciclina; control vs clortetraciclina.

Resultados y discusión

No se observaron problemas de adaptación en los animales, ni a las raciones ni al tipo de jaulas utilizados durante los diferentes periodos experimentales.

Tabla-2

Efecto de la inclusión en la dieta de clortetraciclina, bacitracina o ácido fumárico sobre el peso total del ciego (p.c.), su contenido y el de la víscera vacía, el pH y la concentración de NH₃, registrados en el ciego tras el sacrificio de los animales.						
		P.C. (g)	Cont.Ciego	C. Vacío(g)	pH	NH₃
Dietas	Dosis ppm					
Control (C)		133,6	98,5	37,8	5,87	2,36
C+Clortetraciclín	200	141,9	102,8	39,1	5,92	3,40
	400	144,7	102,8	41,9	5,69	5,05
	800	148,7	108,2	40,5	5,87	4,81
C+Bacitracina	25	132,7	93,5	39,2	5,87	3,91
	50	118,7	81,2	37,5	6,07	6,44
	100	132,4	94,3	38,1	5,97	4,94
C+Fumárico	500	137,7	101,1	42,7	5,83	3,68
	1000	129,4	88,5	40,8	5,81	4,52
	RSD	25,2	23,46	4,47	0,25	3,34

Significación efecto:						
Contrastes						
Control <i>us</i> Bacitracina		NS	NS	NS	NS	NS
Fumárico <i>us</i> Bacitracina		NS	NS	T	NS	NS
fumárico <i>us</i> Cloritetraciclín		NS	NS	NS	NS	NS
Bacitracina <i>us</i> Clortetraciclín		T	NS	NS	NS	NS

RDS, Desviación estándar residual; NS, no significativo; T, (P<0,1).

Parámetros cecales

El peso medio del ciego fue de 135.53±8.33 g, el de la víscera vacía 39.73±1.49 g, y el del contenido cecal, por diferencia, de 97.6±7.82 g (Tabla 2). Estos valores se situaron en el rango descrito por Belenguer et al. (2002) y García et al. (1996), de 135 a 178 , y 39 a 49 g, para el órgano completo y vacío respectivamente. El tratamiento experimental solamente indujo una tendencia a un mayor peso del ciego completo y contenido cecal de aquellos animales que ingirieron las raciones con clortetraciclina. En relación al peso del ciego vacío los animales que recibieron AF mostraron un valor aparentemente superior. En cualquier caso nuestros resultados no permiten deducir ningún tipo de conclusión relativa a un hipotético efecto de la ingestión de antibiótico o AF sobre el desarrollo, peso o contenido cecal.

El pH cecal, se mantuvo prácticamente constante e independiente del tratamiento experimental. El pH registrado coincide con el obtenido por Belenguer et al. (2002) con raciones de las mismas características (pH = 6.04) o con el rango (entre 5.6 y 6.2) descrito en otros trabajos ingiriendo raciones similares (Candau et al., 1986; Carabaño et al., 1988; Padilha et al., 1995).

La concentración de amoníaco presentó un valor medio de 4.34 ± 1.1 mg/100ml y coincide con el rango descrito previamente en nuestro laboratorio por Belenguer et al. (2002)

(5.071 mg/100 ml) o en la bibliografía existente (3.5 hasta 12.5 mg/100 ml; Bellier y Gidenne, 1996; Carabaño et al., 1988; Morisse et al., 1985; Candau et al., 1980), aunque los valores registrados se situarían en la banda inferior del rango descrito.

Tabla-3

Efecto de la inclusión en la dieta de clortetraciclina, bacitracina o ácido fumárico sobre la concentración cecal de bacterias totales, celulolíticas y amilolíticas, y sobre la actividad metilcelulasa (CMC), xilanas (X) y amilasa del contenido cecal							
		Tot (10⁸/g)	Cel (10⁵/g)	Amil (10⁷/g)	CMC	X	NH₃
Dietas	Dosis (ppm)						
Control (C)		20,33	8,48	68,00	0,0872	0,1596	0,1178
C+Clortetraciclina	200	53,8	6,56	202,5	0,0681	0,1806	0,0774
	400	32,08	7,5	235,33	0,0872	0,1997	0,0567
	800	77,5	0,25	496,66	0,0667	0,1146	0,0362
C+Bacitracina	25	22,8	3,08	15,15	0,0606	0,1043	0,1484
	50	18,99	17,66	203,3	0,0555	0,1561	0,0329
	100	15,9	2,33	72,9	0,0867	0,1703	0,0569
C+Fumárico	500	16,42	5,53	236,1	0,0771	0,1602	0,1190
	1000	26,56	122,98	93,67	0,0694	0,1381	0,0848
	RSD	27,37	229,73	206,28	0,042	0,084	0,056

Significación efecto:							
Contrastes							
Control <i>us</i> Bacitracina		NS	NS	NS	NS	NS	NS
Fumárico <i>us</i> Bacitracina		NS	T	NS	NS	NS	NS
Fumárico <i>us</i> Clortetraciclina		**	*	NS	NS	NS	NS
Bacitracina <i>us</i> Clortetraciclina		**	NS	*	NS	NS	NS
Control <i>us</i> Clortetraciclina		NS	NS	T	NS	NS	*

RDS, Desviación estándar residual; NS, no significativo; T, (P<0,1); *, (P<0,05); **, (P<0,01).

Microbiología

En la tabla 3 se presentan los contajes de bacterias y la actividad enzimática de los microorganismos cecales. Debido a problemas técnicos de congelación, el proceso de almacenamiento de las muestras enzimáticas, previo al análisis pudo no haber sido totalmente satisfactorio, por lo que es necesario tomar estos resultados con precaución.

La ingestión de antibióticos o de AF indujo diferencias en la concentración de bacterias totales (P<0.05), de modo que los animales que ingirieron clortetraciclina presentaron mayor concentración bacteriana que los que fueron alimentados con bacitracina (P<0.01) o AF (P<0.01). El recuento de bacterias amilolíticas reflejó una tendencia similar, y los animales alimentados con clortetraciclina presentaron mayores concentraciones que aquellos alimentados con bacitracina (P<0.05) o que la ración control (P<0.1). Los recuentos de bacterias celulolíticas presentaron tendencias opuestas. Así, el AF indujo un mayor número de bacterias celulolíticas en los animales que lo ingirieron respecto a aquellos que habían ingerido clortetraciclina (P<0.05) o bacitracina (P<0.1). Sin embargo, esta comparación viene condicionada por la elevada concentración registrada con el mayor nivel de inclusión de AF, sin que el nivel menor responda al mismo comportamiento.

Las concentraciones observadas fueron siempre inferiores a las recogidas por Emaldi et al. (1978) en lo que se refiere a contajes totales ($1.6 \pm 0.5 \times 10^{11}$) o celulolíticos ($3.7 \pm 1.2 \times 10^6$), Boulahrouf et al. (1987) obtuvieron también títulos superiores (1×10^7 /g MS) en esta especie.

Los recuentos reflejan mayores concentraciones bacterianas, y por tanto un mayor nivel de fermentación. Ello se puede concluir si asumimos que metodológicamente las poblaciones derivadas de la ración experimental tienen la misma viabilidad y que los contajes son representativos de la fermentación original. No existe evidencia experimental que pueda corroborar estas hipótesis. Sin embargo, la enorme variabilidad registrada, podría ser un indicio de cierta imprecisión metodológica que deberá ser considerada en estudios posteriores.

Excreción urinaria de derivados púricos

Los DP excretados en la orina reflejan la absorción duodenal de bases púricas (Ganuzá, 1998) dada la incapacidad orgánica de degradar completamente estos compuestos. En los animales cecotrofélicos, entre ellos el conejo, el flujo de bases púricas duodenales tiene dos componentes, las bases púricas dietéticas y una fracción mayoritaria cuyo origen es microbiano y procede de la ingestión de cecotrofos (Belenguer et al., 2002). En nuestro experimento los animales recibieron la misma ración experimental y no se registraron diferencias en el nivel de ingestión. Por tanto, las diferencias registradas en el flujo duodenal de bases púricas y en la excreción urinaria de sus derivados metabólicos deben reflejar los cambios en la producción/ingestión de cecotrofos debido a los aditivos en estudio.

Nuestros resultados confirmaron aquellos previos obtenidos en nuestro departamento (Ganuzá, 1998, Belenguer et al., 2002), de forma que la alantoína y ácido úrico (AU) representaron la práctica totalidad de DP urinarios, aunque en algunos cromatogramas se pudieron observar trazas de hipoxantina. En cualquier caso, la alantoína fue el DP mayoritario con 1.16 ± 0.16 mmol/d excretada de media y los niveles medios de excreción del ácido úrico son de 0.102 ± 0.018 mmol/d, alcanzándose una excreción media de DP totales de 1.270 ± 0.17 mmol/d (Tabla 4).

El análisis por contrastes mostró que aquellos animales que ingirieron la ración con bacitracina presentaron mayores niveles de excreción de alantoína que aquellos que recibieron las raciones suplementadas con clortetraciclina (1.4028 vs 1.0103 mmol/d, $P < 0.01$), fumárico (1.1287 mmol/d, $P < 0.1$) o la ración control (1.0171 mmol/d, $P < 0.05$). Idénticas variaciones se registraron en la excreción de AU y por consiguiente en la de DP totales. Es necesario señalar que la variación residual fue muy importante (C.V= 40%) y ello podría explicar la ausencia de diferencias cuando se analiza el efecto de la ración como tal.

La mayor excreción de DP en aquellos animales que recibieron bacitracina debe ser interpretada como debida a un mayor consumo/producción de cecotrofos. La bacitracina administrada a dosis subterapéuticas dio lugar a una mayor digestibilidad cecal de la FND (Abecia et al., 2002). Ello se refleja en una mayor excreción de proteína bruta en los cecotrofos y en una mayor excreción urinaria de DP.

Tabla-4

Efecto de la inclusión en la dieta de clortetraciclina, bacitracina o ácido fumárico sobre la excreción renal de DP (mmol/día) en conejos Neozelandeses alimentados "ad libitum"				
		Alantoína	Ácido úrico	DP TOTALES
Dietas	Dosis (ppm)			
Control (C)		1,0171	0,0747	1,0918
C+Clortetraciclina	200	1,1772	0,1116	1,2888
	400	0,9259	0,0759	1,0018
	800	0,9279	0,0952	1,0231
C+Bacitracina	25	1,3573	0,1377	1,4950
	50	1,4092	0,1230	1,5322
	100	1,4420	0,1197	1,5617
C+Fumárico	500	1,1904	0,1037	1,2941
	1000	1,0671	0,0772	1,1443
	RSD	0,4852	0,0555	0,5320

Significación efecto: Contrastes			
Control <i>us</i> Bacitracina	*	*	*
Fumárico <i>us</i> Bacitracina	T	*	T
Fumárico <i>us</i> Clortetraciclina	NS	NS	NS
Bacitracina <i>us</i> Clortetraciclina	**	*	**

RDS, Desviación estándar residual; NS, no significativo; T, (P<0,1); *, (P<0,05); **, (P<0,01).

Una mayor eficiencia de producción de proteína microbiana en el ciego sería debida probablemente a una acción selectiva sobre especies bacterianas, lo que podría favorecer una fermentación más eficiente. Este efecto debería ser además independiente de las posibles modificaciones fisiológicas en la propia mucosa intestinal que conllevaría una disminución en los ritmos de renovación proteica (Ewing y Cole, 1994) y una mejora en la capacidad de los diferentes tramos del intestino de absorber diferentes nutrientes (King, 1976).

Implicaciones

Con las precaución derivada del escaso número de animales de nuestros resultados se puede concluir que la adición de clortetraciclina, bacitracina o ácido fumárico no modificó significativamente los parámetros cecales. Los recuentos microbianos reflejaron mayores concentraciones bacterianas con clortetraciclina, que se interpretaría como un mayor nivel de fermentación, aunque esta diferencia no se observó en las bacterias celulolíticas. No obstante, se apreció un efecto positivo en los animales que fueron alimentados con bacitracina en la excreción de DP, y en consecuencia en la ingestión de cecotrofos, mientras la clortetraciclina parecía ser inerte o incluso presentar la tendencia contraria.

Bibliografía

- ABECIA, L., BELENGUER, A, BALCELLS, J., FONDEVILA, M. Y DECOUX, M. (2002). Inclusión en la ración de diferentes sustancias medicamentosas o ácido fumárico. Efecto sobre diferentes parámetros productivos en conejos en cebo. XXVII Symposium de Cunicultura. Reus, Mayo de 2002, pp 145-153.
- ASHWELL, G. (1957). Colorimetric analysis of sugars. In: Colowick, S.P., Kalan, N.O. (Eds.), *Methods in Enzymology*, vol. 3. Academic Press Inc., New York. P. 85.
- BALCELLS, J., GUADA, J.A., PEIRÓ, J.M. Y PARKER, D.S. (1992). Simultaneous determination of allantoin and oxypurines in biological fluids by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, 575: 153-157.
- BELENGUER, A., BALCELLS, J., FONDEVILA, M. Y TORRE, C. (2002). Caecotrophes intake in growing rabbits estimated either 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. *Animal Science*, 74: 135-144.
- BELLIER, R. Y GIDENNE, T. (1996). Consequences of reduced fibre intake on digestion, rate of passage and caecal microbial activity in the young rabbit. *British Journal of Nutrition* 75: 353-363.
- BOULAHROUF, A., FONTY, G. AND GOUET, P. (1991). Establishment, counts and identification of the fibrolytic microflora in the digestive tract of the rabbit. Influence of feed cellulose content. *Current Microbiology*, 22:21-25
- CANDAU, M., FIORAMONTI, J. Y TOUITIN, M. (1980). Sites de degradation de l'urée dans le tube digestif du lapin. Second World Rabbit Congress, Barcelona. pp. 81-89.
- CANDAU, M., AUVERGNE, A., COMES, F. Y BOULLIER-ODOT, M. (1986). Influence de la forme de présentation et de la finesse de mouture de l'aliment sur les performances zootechniques et la fonction caecale chez le lapin en croissance. *Annales de Zootechnie*, 35, 373-386.
- CARABAÑO, R., FRAGA, M.J., SANTOMÁ, G. Y BLAS, J.C. (1988). Effect of diet on composition of caecal contents and on excretion and composition of soft faeces and hard faeces of rabbits. *Journal of Animal Science* 66, 901-910.
- CARABAÑO, R. Y FRAGA, M.J. (1989). Coprofagia. En: de Blas, C. (1989). *Alimentación del conejo*. Ediciones Mundi-Prensa.
- CHANEY, A.L. Y MARBACH, E.P. (1962). Modified reagents for determination of urea and ammonia. *Clinical Chemistry*, 8: 131-142.
- DEHORITY, B.A., TRASBASSO, P.A. AND GRIFO, A.P. (1989). Most-probable Number procedures for enumerating ruminal bacteria, including the simultaneous estimation of total and cellulolytic numbers in one medium. *Applied and Environmental Microbiology*, 55: 2789-2792.
- EMALDI, O., FRANCA CROCIANI Y MATTEUZZI, D. (1979). A note on the total viable counts and selective enumeration of anaerobic bacteria in the caecal content, soft and hard faeces of rabbit. *Journal of Applied Bacteriology* 46, 169-172.
- EWING, W.N. Y COLE, D.J.A. (1994). The use of antibiotics. *The Living Gut, Context, Northern Ireland* 75-89.
- GANUZA, J.M. (1998). La excreción urinaria de derivados metabólicos de las bases púricas como índice de la ingestión de proteína microbiana en animales cecotrofágicos. Tesina de Licenciatura, Universidad de Zaragoza.
- GARCÍA J., CARABAÑO R., PÉREZ-ALBA, L. Y DE BLAS J.C. (1996). Effect of fibre source on neutral detergent fibre digestion and caecal traits in rabbits. En: Lebas, F. (ed.)

Proceedings of the 6th World Rabbit Congress. Association Française de Cuniculture, Lempdes, pp. 175-180.

KING, J. (1976). The feeding of zinc bacitracin to growing rabbit. *Veterinary Record*, 99: 507-508.

MARTY J. Y VERNAY M. (1984). Absorption and metabolism of the volatile fatty acids in the hindgut of the rabbit. *British Journal of Nutrition* 51, 265-277.

MORISSE, J.P., L'HOSPITALIER, MAURICE, R. Y BOILLETOTET, E. (1984). Enquête écopathologique cunicule en region Bretagne. *Cuniculture* 11, 87-97.

MORISSE, J.P., BOILLETOT, E. Y MAURICE, R. (1985). Changes induced by feeding in intestinal enviroment of rabbits (VFA, NH₃, pH, flora). *Recueil de Médecine Vétérinaire*, 161: 443.

PADILHA, M.T.S., LICOIS, D., GIDENNE, T., CARRÉ, B. Y FONTY, G. (1995). Relationships between microflora and caecal fermentation in rabbits before and after weaning. *Reproduction, Nutrition and Development* 35, 375-386.

SILVA, A.T., WALLACE, R.J. Y ORSKOV, R.E. (1987). Use of particle-bound microbial enzyme activity to predict the rate and extent of fibre degradation in the rumen. *British Journal of Nutrition* 57, 407-415.

VAN SOEST P.J., ROBERTSON J.B. Y LEWIS R.A. (1991). Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and non starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science* 74, 3583-3597.