



Respuesta productiva, fermentación cecal y morbilidad diarreica en conejos alimentados con complementos bacterianos de *Clostridium sordellii* o *Peptostreptococcus tetradius*

Productive response, cecal fermentation and diarrheic morbidity in rabbits fed with bacterial supplements of *Clostridium sordellii* or *Peptostreptococcus tetradius*

Carlos Gutiérrez Olvera* Mario A. Cobos Peralta** Adriana Ducoing Watty***
David Hernández Sánchez** Raymundo Rodríguez de Lara†

Abstract

A bacterial strain of *Clostridium sordellii* and another one of *Peptostreptococcus tetradius* (isolated in a previous study, from the cecum of fattening rabbits) were evaluated as supplements, administered by means of food aspersion on a commercial feed for weaned fattening white New Zealand rabbits. The study was carried out in a rabbit fattening farm with 60% morbidity and 50% mortality due to unspecific diarrheas. Three experimental groups were formed: the first group was fed normal commercial feed, the second commercial feed inoculated with *C. sordellii* and the third, inoculated with *P. tetradius*. Daily weight gain, feed consumption and feed efficacy were evaluated during five weeks, and three tests of apparent digestibility were made. In addition, the mortality and the morbidity caused by unspecific diarrheas during the same period were quantified. After the rabbits were euthanized, total and cellulolytic bacteria concentration, pH and ammonium concentration were measured from samples taken from the cecal appendix, thirteenth cecal loop and colon. The results did not show significant difference ($P > 0.05$) between the treatments for any of the production variables measured. Statistical differences ($P < 0.05$) were found in pH and ammonium concentration in the cecal appendix between the group with *C. sordellii* and the other two groups, while in the thirteenth cecal loop differences were found ($P < 0.05$) in ammonium concentration between the group with *P. tetradius* and the other two groups. In regard to total bacteria, differences ($P < 0.05$) were found at the cecal appendix level between the control group and the one that received *P. tetradius*, and at the colon level between the group that received *P. tetradius* and the one that received *C. sordellii*. *C. sordellii* supplementation was associated with lower diarrheal morbidity (35%), as compared with that observed in the control group (80%), and that of the group receiving the *P. tetradius* supplement (80%) ($P < 0.05$).

Key words: RABBITS, BACTERIAL SUPPLEMENTS, CECAL MICROFLORA, CECOTROPHS, *CLOSTRIDIUM SORDELLII*, *PEPTOSTREPTOCOCCUS TETRADIUS*, PROBIOTICS.

Resumen

Se evaluó una cepa bacteriana de *Clostridium sordellii* y otra de *Peptostreptococcus tetradius* (aisladas en un trabajo previo, a partir del ciego de conejos en engorda) como complementos, suministrados mediante aspersión en alimento comercial para conejos Nueva Zelanda, blancos, recién destetados y en etapa de engorda. El trabajo se llevó a cabo en un centro de engorda cunícola en el cual se presentaba morbilidad de 60% y mortalidad de 50% a causa de diarreas inespecíficas. Se crearon tres grupos experimentales: al primero se le proporcionó alimento comercial sin inocular, al segundo se le proporcionó alimento comercial adicionado con *C. sordellii* y al tercero, adicionado con *P. tetradius*. Se evaluó ganancia diaria de peso, consumo de alimento y eficiencia alimenticia durante cinco semanas, además se realizaron tres ensayos de digestibilidad aparente. Asimismo, se cuantificó la mortalidad y la morbilidad causada por diarreas inespecíficas durante el periodo señalado. Después del sacrificio de los conejos, se midió la concentración de bacterias totales y celulolíticas, pH y amonio en muestras del apéndice cecal, treceava asa cecal y colon. Los resultados no mostraron diferencia significativa ($P > 0.05$) entre los tratamientos para ninguna de las variables productivas medidas. Se encontraron diferencias estadísticas ($P < 0.05$) en el pH y la concentración de amonio a nivel del apén-

Recibido el 6 de septiembre de 2007 y aceptado el 25 de agosto de 2008.

*Departamento de Nutrición Animal y Bioquímica, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D. F.

**Programa de Ganadería, Colegio de Postgraduados, 56230, Montecillo, Texcoco, Estado de México, México.

***Departamento de Genética y Bioestadística, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D. F.

†Departamento de Zootecnia, Universidad Autónoma de Chapingo, Km 38.5, carretera México-Texcoco, 56230, Chapingo, Estado de México, México.

dice cecal entre el grupo al que se le suministró *C. sordellii* y los dos grupos restantes, mientras que a nivel de la treceava asa cecal se encontraron diferencias ($P < 0.05$) en la concentración de amonio entre el grupo que recibió *P. tetradius* y los otros dos grupos. En lo referente a bacterias totales se encontraron diferencias ($P < 0.05$) a nivel de apéndice cecal entre el grupo testigo y el que recibió *P. tetradius*, y a nivel de colon distal entre el grupo que recibió *C. sordellii* y *P. tetradius*. La administración de *C. sordellii* estuvo asociada a una morbilidad diarrea más baja (35%) que la observada en el caso del grupo testigo (80%) y del grupo que recibió complemento de *P. tetradius* (80%) ($P < 0.05$).

Palabras clave: CONEJOS, COMPLEMENTOS BACTERIANOS, MICROFLORA CECAL, CECOTROFOS, *CLOSTRIDIUM SORDELLII*, *PEPTOSTREPTOCOCCUS TETRADIUS*, PROBIÓTICOS.

Introduction

In 1998, the European Union banned the use of certain antibiotics in animal feed as growth promoters, creating the need to look for alternatives to substitute said products. One alternative is the use of viable microbial supplements (probiotics), exogenous enzymes and prebiotics applied in food.^{1,2} Microbial supplements are feed additives that have a beneficial effect on the receptor, promoting at the enteric level an appropriate microbial balance.³ Experimentally, as well as commercially, different bacteria have been evaluated (*Lactobacillus* spp, *Bacillus subtilis* and *Streptococcus* spp), fungi (*Aspergillus oryzae*) and yeast (*Saccharomyces cerevisiae*).⁴ Among the benefits produced by microbial supplements the following should be underlined: enteric disease control,^{5,6} immune system stimulation and modulation,⁷ control of certain types of cancer,^{8,9} competitive exclusion of pathogenic microorganisms,¹⁰ recuperation of enteric microflora after antibiotic treatments,¹¹ as well as an increase in weight gain,¹² milk production,^{13,14} meat production¹⁵ and feed efficacy rate.^{16,17} Nevertheless, results are variable and inconsistent, which demonstrates that there is still much to be researched about their therapeutic, prophylactic, and growth promotion potential.⁴

In rabbits, microbial cultures have been used to reduce incidence and death by diarrhea, as well as increase conversion rate. Studies have been directed at intestinal pH control using bacteria that are foreign to rabbit microflora. Cheeke *et al.*¹⁸ evaluated the effect of Lacto-Sacc®* (*Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus faecium* and *Bacillus subtilis*) and Acid-Pak 4-Way®* (*Streptococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*), as rabbit feed supplements; finding that post-weaning mortality was reduced 50% and 21%, respectively; also, Acid-Pak 4-Way improved conversion rate. Using the same products, Hollister *et al.*^{19,20} reduced mortality by enteritis, 45% and 22% in recently weaned rabbits with a conversion rate improvement between 13.2% and 16.9% as compared with the control group. Post-weaning enteric disease mortality reduction has been related to a competitive inhibition mechanism, which reduces proliferation of pathogenic microorganisms such as *Clostridium* spp and *E. coli*, besides favoring

Introducción

En 1998 la Unión Europea prohibió el uso de algunos antibióticos en la alimentación animal como promotores del crecimiento, creando la necesidad de buscar alternativas para sustituir esos productos. Una es la utilización de complementos microbianos viables (probióticos), enzimas exógenas y prebióticos que se aplican en el alimento.^{1,2} Los complementos microbianos son aditivos alimenticios que afectan benéficamente al portador, promoviendo a nivel entérico un balance microbiano adecuado.³ Tanto experimental como comercialmente se han evaluado diferentes bacterias (*Lactobacillus* spp, *Bacillus subtilis* y *Streptococcus* spp), hongos (*Aspergillus oryzae*) y levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*).⁴ Entre los beneficios producidos por los complementos microbianos destaca el control de enfermedades entéricas,^{5,6} la estimulación y modulación del sistema inmune,⁷ el control de algunos tipos de cáncer,^{8,9} la exclusión competitiva de microorganismos patógenos,¹⁰ la recuperación de la microflora entérica después del tratamiento con antibióticos,¹¹ así como el incremento en ganancia de peso,¹² producción láctea,^{13,14} producción de carne¹⁵ y eficiencia alimenticia.^{16,17} Sin embargo, los resultados son variables e inconsistentes, lo cual muestra que todavía es necesario investigar su potencial profiláctico, terapéutico y como promotores del crecimiento.⁴

En conejos, los cultivos microbianos se han utilizado para reducir la incidencia y muerte por diarreas, así como para incrementar la eficiencia productiva. Los estudios se han encaminado hacia el control del pH intestinal utilizando bacterias ajenas a la microflora del conejo. Cheeke *et al.*¹⁸ evaluaron el efecto del Lacto-Sacc^{MR}* (*Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus faecium* y *Bacillus subtilis*) y Acid-Pak 4-Way^{MR}* (*Streptococcus faecium* y *Lactobacillus acidophilus*), como complementos en la alimentación de conejos; la mortalidad posdestete se redujo 50% y 21%, respectivamente; además, Acid-Pak 4-Way mejoró la eficiencia alimenticia. Usando los mismos productos, Hollister *et al.*^{19,20} redujeron 45% y 22% la mortalidad por ente-

*Lacto-Sacc® y Acid-Pak 4-Way®, Alltech Inc., Estados Unidos de América.

non-pathogenic enteric microorganisms' growth.

A mix of *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* or *Streptococcus faecium*, improved health, even though there was no effect on growth or feeding of the rabbits under study.²¹

In a previous study two bacteria were isolated: *Clostridium sordellii* and *Peptostreptococcus tetradius* from cecotrophs obtained from New Zealand breed rabbits.²² In another study it was determined that inoculation of these bacteria into compressed rabbit feed does not produce noxious effects or feed rejection from recently weaned rabbits. Likewise, cellulolytic bacteria concentration increased in cecal appendix and in *in vitro* digestion of dry matter;²³ nevertheless, the effect on the incidence of infectious diseases was not evaluated.

Experimentally, secondary metabolites produced by bacteria have been evaluated. For example, the addition of toyocerin (produced by *Bacillus toyoi*) in rabbit feed reduced the incidence of colitis and enteric infections.²⁴

Enteric diseases represent a relevant problem in rabbit production. Losses due to enteritis normally reach between 10% to 20% of the total amount of animals; although there are times when enteric processes may cause losses of up to 20%-60% of weaned animals. What causes these diseases is not known completely and prevention and treatment measures are not always effective.²⁵

Rabbit enteritis may be caused by several microorganisms and some predisposing factors. Among the main microorganisms that cause enteric diseases in rabbits are *Clostridium spiriforme*, *Escherichia coli*, rotavirus and coccidia. Factors that may predispose animals to enteric diseases are: feed (diets with low levels of fiber, high levels of carbohydrates), stress, antibiotics and genetics.²⁵

The rabbit farm where the animals for this study were lodged had a non-specific enteritis problem with 60% morbidity and mortality close to 50% in the first weeks after weaning. Sick animals had an abundant, mucoid diarrhea, anorexia, ataxia, dehydration and death happened between one to two days after showing symptoms. At necropsy, animals showed cecal inflammation and a large amount of accumulated gas in the whole large intestine, without apparent lesions in other organs.

In order to look for alternatives to the use of growth promoters that are now illegal, and reduce prevalence of diarrheas in rabbits, improving their productive parameters, the objective of this study was the evaluation of the effect of *Clostridium sordellii* and *Peptostreptococcus tetradius*, administered as dietetic supplements.

ritis en conejos recién destetados y mejoraron entre 13.2% y 16.9% la eficiencia alimenticia con respecto al tratamiento testigo. La disminución en mortalidad posdestete, por enfermedades entéricas, se ha relacionado con un mecanismo de inhibición competitiva, que reduce la proliferación de patógenos, como *Clostridium* spp y *E. coli*, además de que favorece el crecimiento de microorganismos entéricos no patógenos.

La utilización de una mezcla de *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* o *Streptococcus faecium*, mejoró la salud, aunque sin efecto en el crecimiento y alimentación de los conejos en estudio.²¹

En un trabajo previo se aislaron dos bacterias: *Clostridium sordellii* y *Peptostreptococcus tetradius* a partir de cecotrofos obtenidos de conejos de la raza Nueva Zelanda.²² En otro estudio se determinó que la inoculación de estas bacterias en alimento comprimido para conejo no produce efectos nocivos o rechazo en consumo de alimento en conejos recién destetados. Además se encontró aumento en la concentración de bacterias celulolíticas en apéndice cecal y en la digestión *in vitro* de la materia seca.²³ Sin embargo, no se evaluó su efecto en la incidencia de enfermedades infecciosas.

Experimentalmente, se ha evaluado el uso de metabolitos secundarios producidos por bacterias. Por ejemplo, la adición de toyocerina (producida por *Bacillus toyoi*) al alimento de conejos, disminuyó la incidencia de colitis e infecciones entéricas.²⁴

Las enfermedades entéricas representan un problema relevante en la producción de conejos. Las pérdidas por enteritis son normalmente de 10% a 20% del total de animales; aunque se llegan a presentar procesos entéricos (enteropatías) que provocan pérdidas de 20%-60% de los animales destetados. La causa de estas enfermedades no se conoce perfectamente y las medidas de prevención y tratamiento no son siempre efectivas.²⁵

La enteritis en los conejos puede ser causada por diversos microorganismos y algunos factores predisponentes. Entre los principales microorganismos causantes de enfermedades entéricas en conejos se encuentran *Clostridium spiriforme*, *Escherichia coli*, rotavirus y coccidias. Los factores que pueden predisponer a enfermedades entéricas son: alimenticios (bajos niveles de fibra, altos niveles de carbohidratos en la dieta), estrés, antibióticos y genéticos.²⁵

En el centro cunícola donde fueron alojados los animales utilizados en este estudio, se tenía el problema de enteritis inespecífica con morbilidad de 60% y mortalidad cercana a 50% en las primeras semanas posdestete. Los animales enfermos presentaban diarrea mucoide profusa, anorexia, ataxia, deshidratación y muerte entre uno y dos días después de presentados los signos clínicos. A la necropsia, los ani-

Material and methods

This study was carried out in the Ruminant Microbiology and Animal Nutrition laboratories of the Postgraduate College Livestock Program (IREGEP) and in the Rabbit Research Center (COCICEMAC), in Montecillo and Coatlinchan, respectively, Texcoco, State of Mexico, Mexico.

Sixty New Zealand white recently weaned, 38 days old male rabbits were used. Animals did not receive any treatment (antibiotics or anti-parasitic drugs) before participating in the experiment, in order to allow the infectious process to be expressed.

Rabbits were lodged in galvanized steel mesh cages measuring 60 cm in width, 90 cm in length and 40 cm in height. Each cage had an automatic drinker and two galvanized steel feeders with a capacity for 2 kg of compressed feed.

Under each cage, a polyester mesh was placed, in order to retain animal excrement for later weighing. Each day animals were inspected and cleaning was carried out.

Three experimental groups of 20 rabbits each were formed. Four animals were placed in each cage per experimental unit, so that each treatment had five repetitions.

Animals were identified with indelible ink marks and distributed randomly in the cages, and then they were subjected to the different experimental treatments.

Animals had water and food available *ad libitum*. Used commercial feed was "Conejitina 715",* that contains 88.72% DM, 16.49% CP, 23.95% ADF, 42.45% NDF and 10.01% ash.

The three evaluated treatments consisted of feeding weaned rabbits with compressed commercial feed specific for the fattening phase, as control group (T1); with compressed commercial feed previously inoculated by aspersion with *Clostridium sordellii* at a concentration of 1×10^8 bacteria per g^{-1} of feed (T2) and compressed commercial feed previously inoculated by aspersion with *Peptostreptococcus tetradii*, at a concentration of 1×10^8 bacteria per g^{-1} of feed (T3).

Responses of the following variables were measured:

Feed consumption. Offered and rejected feed per cage was weighed each week and difference was estimated. Data obtained were divided by number of animals per cage to establish average feed consumption per animal.

Daily weight gain. Each animal was weighed two consecutive times and data was divided by the number of days between each weighing (seven days). Rabbits were weighed in the morning before feeding at the

males presentaban inflamación cecal y gran cantidad de gas acumulado en todo el intestino grueso, sin presencia de daños aparentes a otros órganos.

Con el proposito de buscar alternativas al uso de promotores del crecimiento ilegales, para disminuir la prevalencia de diarrea en conejos y mejorar sus parámetros productivos, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de *Clostridium sordellii* y *Peptostreptococcus tetradii*, administrados como complementos dietéticos.

Material y métodos

Este trabajo se llevó a cabo en los laboratorios de Microbiología Ruminant y Nutrición Animal, del Programa de Ganadería (IREGEP) del Colegio de Postgraduados, y en el Centro de Investigación Cunicola (COCICEMAC), en Montecillo y Coatlinchán, respectivamente, en Texcoco, Estado de México, México.

Se utilizaron 60 conejos machos de la raza Nueva Zelanda blanco, recién destetados, de 38 días de edad. Los animales no recibieron ningún tratamiento (desparasitantes, antibióticos) antes de entrar al trabajo experimental, con la finalidad de que se expresara cualquier proceso infeccioso.

Los conejos fueron alojados en jaulas de alambre galvanizado de 60 cm de ancho, 90 cm de largo y 40 cm de alto. Cada jaula contó con un bebedero automático y dos comederos de lámina galvanizada, con capacidad para 2 kg de alimento comprimido.

Bajo cada jaula se colocó una malla de poliéster, con el fin de detener el excremento de los animales para su posterior pesaje. Cada día se llevó a cabo la limpieza e inspección de los animales.

Se conformaron tres grupos experimentales de 20 conejos cada uno. Se alojaron cuatro animales por jaula (unidad experimental), por lo que cada tratamiento contó con cinco repeticiones.

Los animales fueron identificados mediante marcaje con tinta indeleble y distribuidos aleatoriamente en las jaulas, y éstas, a su vez, a los diferentes tratamientos experimentales.

A los animales se les proporcionó agua y alimento *ad libitum*. Como alimento se utilizó "Conejitina 715",* que contiene 88.72% de MS, 16.49% de PC, 23.95% de FDA, 42.45% de FDN y 10.01% de cenizas.

Los tratamientos evaluados consistieron en alimentar a los conejos destetados con alimento comercial comprimido para fase de engorda (T1), este grupo se consideró como testigo; alimento comercial comprimido previamente inoculado por aspersion con *Clostridium sordellii* a concentración de 1×10^8 bacterias g^{-1} de alimento (T2) y alimento comercial comprimido previamente inoculado por aspersion con *Peptostrepto-*

*Hacienda, México.

beginning of the experiment and after that once every week.

Conversion rate. It was estimated by dividing weight gain by total consumed feed.

Carcass yield. Recently processed carcass (without head, viscera, skin and legs) was weighed and relationship with total weight before sacrifice was estimated.

Feces production. During the experimental study, feces from the animals were collected and weighed daily. Every week a sample was taken from feces and from offered feed (20 g to 30 g) to quantify dry matter content (DM).

Apparent digestibility. Apparent digestibility at fifth week of the experiment was quantified for dry matter (DM) organic matter (OM), crude protein (CP), neutral detergent fiber (NDF) and acid detergent fiber (ADF). Quantification of DM, OM, and CP in feces and feed was carried out according to methodology described by AOAC; and for NDF and ADF, Van Soest *et al.*²⁶ methodology was used.

Animals were observed daily to record deaths, and verify health status of the animals checking for the presence of diarrhea, vomit, depression, sneezing, tearing, coughing, etc.

Five weeks after the beginning of the fattening period, four rabbits were euthanized per each treatment (a total of 12 rabbits randomly chosen). Each rabbit's digestive tract was extracted in order to aseptically collect samples from cecum appendix, third cecal loop and colon (distal portion). Samples were deposited in sterile jars.

Each sample was tested for the following:

Total bacteria. Most probable number technique was used (MPN).²⁷ Serial dilutions were carried out from 10^{-1} to 10^{-14} of each sample from cecum appendix, third cecal loop and distal colon from each one of the 12 euthanized animals. Dilutions were carried out in 13×100 mm culture tubes with 4.5 mL culture medium for anaerobe bacteria (Table 1).

Cellulolytic bacteria. MPN technique was also used. Serial dilutions were carried out from 10^{-1} to 10^{-10} in 13×100 mm culture tubes with 4.5 mL culture medium for anaerobe bacteria similar to the one used for total bacteria, adding a Whatman number 541 paper strip (0.5×1.5 cm), instead of glucose, cellobiose and starch.²⁸

Ammonium. Two grams of sample were taken and mixed with 0.5 mL meta-phosphoric acid, in 2 mL vials to determine ammonium nitrogen. The samples were centrifuged* at 16 500 g for three minutes and supernatant was deposited in 2.5 mL vials for analysis by visible ultraviolet spectrometer absorbency.**

pH. In order to measure pH, a gram of sample was taken and diluted in 9 mL of distilled water, homogenized and allowed to rest for 15 to 30 min, to then

coccus tetradius, a concentración de 1×10^8 bacterias g^{-1} de alimento (T3).

Se midieron como respuesta, las siguientes variables:

Consumo de alimento. Se pesó semanalmente el alimento ofrecido y el rechazado por jaula y se calculó la diferencia entre ambos. Los datos se dividieron entre el número de animales alojados en cada jaula, calculándose así el consumo promedio de alimento por animal.

Ganancia diaria de peso. Se calculó mediante la diferencia obtenida de dos mediciones de peso consecutivas de cada animal y la división de ésta entre el número de días transcurridos entre cada pesaje (siete días). Los conejos se pesaron al principio del trabajo experimental y después semanalmente; el pesaje se llevó a cabo por la mañana antes de proporcionar el alimento.

Eficiencia alimenticia. Se calculó a partir de la ganancia de peso, dividida entre el alimento total consumido por cada animal.

Rendimiento de la canal. Se calculó con base en el peso de la canal caliente (sin cabeza, vísceras, piel y extremidades), y en relación con el peso total del animal antes del sacrificio.

Producción de heces. Durante el trabajo experimental se recolectaron las heces de los animales y se pesaron diariamente. Semanalmente se tomó una muestra de heces y del alimento ofrecido (20 g a 30 g) para determinar su contenido de materia seca (MS).

Digestibilidad aparente. Se evaluó la digestibilidad aparente de la MS, materia orgánica (MO), proteína cruda (PC), fibra detergente neutra (FDN) y fibra detergente ácida (FDA) a la quinta semana de comenzado el trabajo experimental. La determinación de MS, MO y PC en heces y alimento, se hizo mediante la metodología descrita por la AOAC y la FDN y FDA, siguiendo la metodología de Van Soest *et al.*²⁶

Se verificó diariamente el estado de salud de los animales (presencia de diarreas, vómitos, depresión, estornudos, lagrimeo, tos, etc.) y se registraron las muertes.

Se sacrificaron cuatro conejos de cada tratamiento (12 conejos en total, elegidos aleatoriamente) cinco semanas después de que inició el periodo de engorda. A cada conejo se le extrajo el tubo digestivo con el propósito de recolectar, de forma aséptica, muestras del apéndice cecal, ciego (tercer asa cecal) y colon (sección distal). Las muestras se depositaron en frascos estériles. A cada muestra se le determinó:

Bacterias totales. Se utilizó la técnica del número más probable (NMP).²⁷ Se realizó una serie de diluciones de 10^{-1} hasta 10^{-14} para cada muestra recolectada de apéndice cecal, tercer asa cecal y colon distal de cada uno de los 12 animales sacrificados. Las dilu-

obtain the pH reading by potentiometer*** calibrated to pH 4 and 7.

Data was analyzed by totally random design of the three treatments (diets) with five repetitions per treatment (cages with four animals each) according to the following model:

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

where:

Y_{ij} = apparent digestibility of DM, OM, CP, NDF, ADF of animals of jth cage of treatment ith.

$j = 1, \dots, 5$

$i = 1, \dots, 3$

μ = general mean

T_i = effect of treatment i-th

ε_{ij} = experimental error of jth cage of treatment i-th.

Initial live weight was used as co-variable for daily weight gain, feed consumption, conversion rate, and carcass yield.

$$Y_{ij} = \mu + T_i + \beta (X_{ij} - \bar{X}) + \varepsilon_{ij}$$

where:

Y_{ij} = daily weight gain, feed efficacy, carcass yield of animals of jth cage of treatment i-th.

$j = 1, \dots, 5$

$i = 1, \dots, 3$

μ = general mean

T_i = effect of treatment i-th

β = effect of initial weight

ε_{ij} = experimental error of j-th cage of treatment i-th.

Information analysis was carried out by the SAS statistical software,²⁹ using GLM procedure. For multiple comparisons Tukey's test was used.

In cases where expected homogeneity of variance and normality did not happen, the non-parametric Kruskal-Wallis test was carried out.³⁰

Methodology proposed by Harrigan and McCance²⁶ was used to quantify the number of total and cellulolytic bacteria.

Results

T2 animals (*C. sordellii*) had 35% non-specific diarrheas morbidity that was statistically lower ($P < 0.05$) than morbidity found in the other two groups (80%). Mortality in T2 was 25%, lower than in the other two groups (45% for T1 and 75% for T2) with 0.067 significance (Table 2).

In general there were no statistically significant differences between treatments ($P < 0.05$) in relation to productive variables (weight gain, feed consumption, conversion rate and carcass yield) (Tables 3, 4 and 5).

ciones se realizaron en tubos de cultivo de 13×100 mm, con 4.5 mL de medio de cultivo para bacterias anaerobias (Cuadro 1).

Bacterias celulolíticas. Se utilizó también la técnica del NMP. Se realizaron diluciones de 10^{-1} hasta 10^{-10} , en tubos para cultivo de 13×100 mm con 4.5 mL de un medio de cultivo similar al utilizado para bacterias totales, en el cual se adicionó una tira de papel (0.5 $\times$ 1.5 cm) Whatman número 541, en lugar de glucosa, celobiosa y almidón.²⁸

Amonio. Para determinar nitrógeno amoniacal se tomaron 2 g de cada muestra y se mezclaron con 0.5 mL de ácido metafosfórico, en viales de 2 mL. Posteriormente las muestras se centrifugaron* a 16 500 g durante tres minutos y se depositó el sobrenadante en viales de 2.5 mL para luego analizarlo mediante absorbancia en un espectrómetro de luz ultravioleta visible.**

pH. Con el propósito de medir el pH se tomó un gramo de muestra, se diluyó en 9 mL de agua destilada, se homogeneizó y se dejó reposar durante 15 a 30 min, para después obtener la lectura del pH en un potenciómetro*** calibrado a pH 4 y 7.

El análisis de los datos corresponde al de un diseño completamente al azar con tres tratamientos (dietas) y cinco repeticiones por tratamiento (jaulas con cuatro animales cada una). El modelo que corresponde a dicho diseño es:

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

donde:

Y_{ij} = digestibilidad aparente de MS, MO, PC, FDN, FDA de los animales de la jaula j del tratamiento i.

$j = 1, \dots, 5$

$i = 1, \dots, 3$

μ = media general

T_i = efecto del tratamiento i

ε_{ij} = error experimental de la jaula j del tratamiento i.

Para el caso de ganancia diaria de peso, consumo de alimento, eficiencia alimenticia y rendimiento de canal, se utilizó el peso vivo inicial como covariable.

$$Y_{ij} = \mu + T_i + \beta (X_{ij} - \bar{X}) + \varepsilon_{ij}$$

donde:

Y_i = ganancia diaria de peso, eficiencia alimenticia, rendimiento de la canal de los animales de la jaula j del tratamiento i.

$j = 1, \dots, 5$

$i = 1, \dots, 3$

μ = media general

*Centrifuga Eppendorf Centrifuge 5804, Alemania.

**Perkin Elmer Lambda 40, Estados Unidos de América.

***Orion, Modelo 250^a, Estados Unidos de América.

Apparent digestibility assay carried out in the fifth week of study, did not show significant statistical differences between treatments (Table 6).

In relation to total bacteria, differences were found ($P < 0.05$) at the level of cecal appendix between the control group and the group that received *P. tetradius* and at the level of the distal colon between the groups that received *C. sordellii* and *P. tetradius* (Table 7).

In the cecal appendix, for pH (Table 8) as well as for ammonium (Table 9) there was significant statistical difference between T2 (*C. sordellii*) and the other two treatments, while at the level of the thirteenth cecal loop, differences were found ($P < 0.05$) in ammonium concentration between the group that received *P. tetradius* and the other two groups.

Discussion

As mentioned by Mateos,³¹ the basic idea behind the addition of bacterial supplements to rabbit diets is to avoid, by a competition mechanism the proliferation of germs that are harmful in the animal intestines. Cheeke *et al.*³² reports that in several studies bacterial

T_i = efecto del tratamiento i

β = efecto del peso inicial

ε_{ij} = error experimental de la jaula j del tratamiento i .

El análisis de la información se realizó mediante el paquete estadístico SAS,²⁹ utilizando el procedimiento GLM. Para comparaciones múltiples se usó la prueba de Tukey.

En los casos en los que los supuestos de homogeneidad de varianza y normalidad no se cumplieron, se realizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis.³⁰

Para medir el número de bacterias celulolíticas y totales se utilizó la metodología propuesta por Harri-gan y McCance.²⁶

Resultados

Los animales del T2 (*C. sordellii*) presentaron morbilidad de 35% por diarreas inespecíficas, que fue estadísticamente menor ($P < 0.05$) que la morbilidad encontrada en los otros dos grupos (80%). La mortalidad en T2 fue de 25%, menor que la de los otros dos grupos (45% para T1 y 75% para T2) con significancia de 0.067 (Cuadro 2).

Cuadro 1

COMPOSICIÓN DEL MEDIO ANAEROBIO PARA BACTERIAS TOTALES

(POR CADA 100 mL DE MEDIO)

COMPOSITION OF ANAEROBE MEDIUM FOR TOTAL BACTERIA

(PER 100 mL OF MEDIUM)

Yeast extract, g	0.1
Trypticase - Peptone, g	0.2
Glucose, mg	60.0
Cellobiose, mg	60.0
Starch, mg	60
Mineral solution 1 ^a , mL	5.0
Mineral solution 2 ^b , mL	5.0
Clarified ruminal liquid ^c , mL	30.0
Sulfide cysteine solution ^d , mL	2.0
Sodium carbonate 8% solution, mL	5.0
Distilled water, mL	52.6
Rezarsurin solution, mL	0.1

^a Per each liter: K₂HPO₄, 6.0 g.

^b Per each liter: KH₂PO₄, 6.0 g; (NH₄)₂ SO₄, 6.0 g; NaCl, 12 g; MgSO₄, 2.45 g; CaCl₂·2H₂O, 1.6 g.

^c Previously filtered through gauze and centrifuged at 23,000 g for 20 min, at 8°C and sterilized at 15 psi for 15 min.

^d 2.5 g of L- cysteine -HCl·H₂O were dissolve in 50 mL in distilled H₂O, adjusting pH of the mix to 10 with NaOH (2N); 2.5 g of Na₂S·9H₂O were added and sufficient amount of distilled H₂O was added for 200 mL; the solution was kept 5 min under N₂ flow.

supplements have reduced the incidence of enteric infections and animal mortality.

Animals fed with *C. sordellii* showed more resistance to enteric infections, since morbidity ($P < 0.05$) and mortality ($P < 0.07$) were lower than in the other two treatments. Reduction of morbidity and mortality may be due to competitive inhibition, in the digestive tract by *C. sordellii* of pathogenic bacteria that occupy the same ecological niches. An advantage of *C. sordellii* over *P. tetradus* is that since it is a bacterium that sporulates, it has a higher probability of reaching the large intestine and colonize it in a similar manner as what has been reported for *Bacillus toyoi*,²⁴ supplements that have shown capability to colonize the large intestine of rabbits and act as competitive inhibitors that exclude pathogenic microorganisms such as *E. coli* and several species of clostridia, that cause post-weaning diarrhea.

According to the results, *P. tetradus* does not have an important effect on the prevention or protection against enteric diseases. Perhaps doses of these bacteria that were used were not capable of competing against other microorganisms.

In relation to productive variables, the only one to show statistically significant differences between treatments was weight gain in the second week (Table 3) and this was due to the loss of weight of group three (*P. tetradus*), since the animals were extremely affected by enteritis; which in turn directly affected feed consumption reducing it significantly in this treatment during the third week (Table 4). Even though from the third week conversion rate increased in T3 ($P < 0.05$), in relation to the other two treatments (prob-

En general no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos ($P > 0.05$) para las variables productivas (ganancia de peso, consumo de alimento, eficiencia alimenticia y rendimiento de la canal) (Cuadros 3, 4 y 5).

El ensayo de digestibilidad aparente que se llevó a cabo a la quinta semana de iniciado el trabajo experimental, no mostró diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos (Cuadro 6).

En lo referente a bacterias totales se encontraron diferencias ($P < 0.05$) a nivel de apéndice cecal entre el grupo testigo y el que recibió *P. tetradus* y a nivel de colon distal entre el grupo que recibió *C. sordellii* y *P. tetradus* (Cuadro 7).

En el apéndice cecal, tanto para pH (Cuadro 8) como para amonio (Cuadro 9) sí hubo diferencia estadística significativa entre el T2 (*C. sordellii*) y los otros dos tratamientos, mientras que a nivel de la 13 asa cecal se encontraron diferencias ($P < 0.05$) en la concentración de amonio entre el grupo que recibió *P. tetradus* y los otros dos grupos.

Discusión

Como menciona Mateos,³¹ la idea básica de la adición de complementos bacterianos a la dieta de los conejos es evitar, mediante un mecanismo de competición, la proliferación de gérmenes perjudiciales en el intestino del animal. Cheeke *et al.*³² comentan que varios estudios con complementos bacterianos han reducido la incidencia de infecciones entéricas y la mortalidad de los animales.

Los animales alimentados con *C. sordellii* mostraron

Cuadro 2
PORCENTAJE DE MORTALIDAD Y MORBILIDAD DIARREICA DURANTE EL PERIODO
EXPERIMENTAL DE CONEJOS ALIMENTADOS CON DIETA COMERCIAL,
SOLA O ADICIONADA CON COMPLEMENTOS BACTERIANOS
DIARRHEAL MORTALITY AND MORBIDITY PERCENTAGE OF RABBITS FED
COMMERCIAL DIET, ALONE OR WITH ADDED BACTERIAL SUPPLEMENTS

	T_1	T_2	T_3	ee
	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	
Mortality	45 ^a	25 ^a	75 ^a	13.23
Diarrheal	80 ^a	35 ^b	80 ^a	8.42
Morbidity				

T_1 = Commercial feed without inoculation.

T_2 = T_1 added with *Clostridium sordellii*.

T_3 = T_1 added with *Peptostreptococcus tetradus*

a,b = Means with different letter in a row, show statistically significant differences ($P < 0.05$).

ee = Mean standard error

Cuadro 3

PESO INICIAL, FINAL Y GANANCIA DIARIA DE PESO (g) POR SEMANA,
DE CONEJOS ALIMENTADOS CON UNA DIETA COMERCIAL, SOLA O
ADICIONADA CON COMPLEMENTOS BACTERIANOS
INITIAL AND FINAL WEIGHT AND DAILY WEIGHT GAIN (g) PER WEEK OF RABBITS
FED COMMERCIAL DIET, ALONE OR WITH ADDED BACTERIAL SUPPLEMENTS

	T_1	T_2	T_3
	$\bar{x} \pm ee$	$\bar{x} \pm ee$	$\bar{x} \pm ee$
Initial weight	833 $\pm$ 14.75 ^a	805 $\pm$ 14.75 ^a	783.75 $\pm$ 14.75 ^a
Final weight	1887.8 $\pm$ 74.86 ^a	1910.0 $\pm$ 66.95 ^a	1966.9 $\pm$ 74.86 ^a
daily weight gain (g) per week			
Week 1	28.8 $\pm$ 4.04 ^a	32.1 $\pm$ 3.62 ^a	39.8 $\pm$ 4.04 ^a
Week 2	27.7 $\pm$ 8.36 ^a	30.1 $\pm$ 7.48 ^a	-6.6 $\pm$ 8.36 ^b
Week 3	25.6 $\pm$ 5.63 ^a	35.6 $\pm$ 5.03 ^a	46.7 $\pm$ 5.63 ^a
Week 4	38.7 $\pm$ 3.95 ^a	31.8 $\pm$ 3.53 ^a	46.7 $\pm$ 3.95 ^a
Week 5	24.1 $\pm$ 6.81 ^a	25.2 $\pm$ 6.09 ^a	46.3 $\pm$ 6.81 ^a
Average	29.2 $\pm$ 1.97 ^a	30.9 $\pm$ 1.76 ^a	34.7 $\pm$ 1.97 ^a

T₁ = Commercial feed without inoculation.

T₂ = T₁ added with *Clostridium sordellii*.

T₃ = T₁ added with *Peptostreptococcus tetradius*

a,b = Means with different letter in a row, show statistically significant differences (P < 0.05).

ee = Mean standard error

Cuadro 4

CONSUMO DE ALIMENTO DIARIO (g) EN CONEJOS ALIMENTADOS CON UNA DIETA
COMERCIAL SOLA O ADICIONADA CON COMPLEMENTOS BACTERIANOS
DAILY FEED CONSUMPTION (g) IN RABBITS FED COMMERCIAL DIET,
ALONE OR WITH ADDED BACTERIAL SUPPLEMENTS

	T_1	T_2	T_3
	$\bar{x} \pm ee$	$\bar{x} \pm ee$	$\bar{x} \pm ee$
Week 1	73.2 $\pm$ 5.9 ^a	73.3 $\pm$ 5.28 ^a	73.0 $\pm$ 5.9 ^a
Week 2	67.4 $\pm$ 8.16 ^a	68.7 $\pm$ 7.3 ^a	57. $\pm$ 8.16 ^a
Week 3	102.8 $\pm$ 9.56 ^{ab}	121.5 $\pm$ 8.57 ^a	77.6 $\pm$ 9.56 ^b
Week 4	140.1 $\pm$ 16.33 ^a	165.0 $\pm$ 14.6 ^a	148.9 $\pm$ 16.33 ^a
Week 5	141.1 $\pm$ 15.77 ^a	158.6 $\pm$ 14.1 ^a	147.1 $\pm$ 15.77 ^a
Average	107.7 $\pm$ 7.28 ^a	117.4 $\pm$ 6.51 ^a	101.2 $\pm$ 7.28 ^a

T₁ = Commercial feed without inoculation.

T₂ = T₁ added with *Clostridium sordellii*.

T₃ = T₁ added with *Peptostreptococcus tetradius*

a,b = Means with different letter in a row, show statistically significant differences (P < 0.05).

ee = Mean standard error

Cuadro 5			
EFICIENCIA ALIMENTICIA Y RENDIMIENTO DE CANAL (%) EN CONEJOS ALIMENTADOS CON UNA DIETA COMERCIAL, SOLA O ADICIONADA CON COMPLEMENTOS BACTERIANOS			
CONVERSION RATE AND CARCASS YIELD (%) IN RABBITS FED COMMERCIAL DIET, ALONE OR WITH ADDED BACTERIAL SUPPLEMENTS			
	T_1	T_2	T_3
	$\bar{x} \pm ee$	$\bar{x} \pm ee$	$\bar{x} \pm ee$
Week 1	398.4 $\pm$ 38.78 ^b	423.4 $\pm$ 34.69 ^b	546.5 $\pm$ 38.78 ^a
Week 2	332.1 $\pm$ 126.89 ^a	427.8 $\pm$ 113.49 ^a	-180.3 $\pm$ 126.89 ^b
Week 3	238.5 $\pm$ 122.09 ^b	291.1 $\pm$ 109.20 ^b	709.7 $\pm$ 122.09 ^a
Week 4	293.8 $\pm$ 33.12 ^a	195.9 $\pm$ 29.62 ^b	319.1 $\pm$ 33.12 ^a
Week 5	169.7 $\pm$ 41.36 ^b	148.3 $\pm$ 36.99 ^b	324.0 $\pm$ 41.36 ^a
Average	290.91 $\pm$ 21.93 ^a	297.38 $\pm$ 19.61 ^a	341.67 $\pm$ 21.93 ^a
Carcass yield	46.69 $\pm$ 0.1 ^a	47.09 $\pm$ 0.2 ^a	46.91 $\pm$ 0.4 ^a

T_1 = Commercial feed without inoculation.
 T_2 = T_1 added with *Clostridium sordellii*.
 T_3 = T_1 added with *Peptostreptococcus tetradius*.
a,b = Means with different letter in a row, show statistically significant differences (P < 0.05).
ee = Mean standard error.

Cuadro 6				
ENSAYO DE DIGESTIBILIDAD <i>in vivo</i> (%) DE LAS FRACCIONES DEL ALIMENTO DE CONEJOS ALIMENTADOS CON UNA DIETA COMERCIAL, SOLA O ADICIONADA CON COMPLEMENTOS BACTERIANOS				
DIGESTIBILITY <i>in vivo</i> (%) ASSAY OF FEED FRACTIONS OF A COMMERCIAL DIET, ALONE OR WITH BACTERIAL SUPPLEMENTS ADDED TO RABBITS DURING THE EXPERIMENTAL PERIOD				
	T_1	T_2	T_3	ee
	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	
DM*	61.15	64.26	64.71	2.92
OM*	66.84	68.07	67.60	2.62
CP*	73.97	76.84	74.75	1.99
NDF*	46.50	46.98	44.64	4.39
ADF*	20.23	19.94	24.66	6.32

T_1 = Commercial feed without inoculation.
 T_2 = T_1 added with *clostridium sordellii*.
 T_3 = T_1 added with *Peptostreptococcus tetradius*.
*There was no difference between treatments (P > 0.05).
ee = Mean standard error.

Cuadro 7

CONCENTRACIÓN DE BACTERIAS TOTALES POR GRAMO DE MUESTRA EN
APÉNDICE CECAL, DECIMOTERCER ASA CECAL Y COLON DISTAL EN CONEJOS
ALIMENTADOS CON UNA DIETA COMERCIAL, SOLA O ADICIONADA CON
COMPLEMENTOS BACTERIANOS

TOTAL BACTERIA CONCENTRATION PER GRAM OF SAMPLE IN CECAL APPENDIX,
THIRTEENTH CECAL LOOP, AND DISTAL COLON IN RABBITS FED COMMERCIAL
DIET, ALONE OR WITH BACTERIAL SUPPLEMENTS ADDED DURING THE
EXPERIMENTAL PERIOD

	T_1	T_2	T_3
Cecal appendix	3.5×10^{10a}	2.0×10^{10ab}	1.1×10^{10b}
13 th cecal loop	4.5×10^8a	15×10^8a	1.4×10^8a
Distal colon	20×10^7ab	14×10^7a	45×10^7b

T_1 = Commercial feed without inoculation.

T_2 = T_1 added with *Clostridium sordellii*.

T_3 = T_1 added with *Peptostreptococcus tetradius*.

a,b = Means with different letter in a row, show statistically significant differences ($P < 0.05$).

Cuadro 8

pH EN APÉNDICE CECAL, DECIMOTERCER ASA CECAL Y COLON DISTAL
EN CONEJOS ALIMENTADOS CON UNA DIETA COMERCIAL, SOLA O
ADICIONADA CON COMPLEMENTOS BACTERIANOS
CECAL APPENDIX, THIRTEENTH CECAL LOOP AND DISTAL COLON IN
RABBITS FED COMMERCIAL DIET, ALONE OR WITH ADDED BACTERIAL SUPPLEMENTS

	T_1	T_2	T_3	ee
	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	
Cecal appendix	7.15 ^b	7.65 ^a	7.16 ^b	0.099
13 th cecal loop	6.77 ^a	6.91 ^a	6.57 ^a	0.153
Distal colon	6.73 ^a	7.07 ^a	6.65 ^a	0.045

T_1 = Commercial feed without inoculation.

T_2 = T_1 added with *Clostridium sordellii*.

T_3 = T_1 added with *Peptostreptococcus tetradius*.

a,b = Means with different letter in a row, show statistically significant differences ($P < 0.05$).

ee = Mean standard error.

ably due to a compensatory effect), on average, considering the whole fattening period, there were no statistically significant differences ($P > 0.05$) between treatments. Likewise, significant differences in carcass yield were not found between the three treatments ($P > 0.05$). In this respect, several authors have reported no benefits on productive variables by the use of bacterial supplements, yet there were positive effects on animal health.¹⁹⁻²¹

Presence of high amounts of easily fermented car-

mayor resistencia a infecciones entéricas, siendo menor la morbilidad ($P < 0.05$) y la mortalidad ($P < 0.07$) que en los otros dos tratamientos. La disminución en la morbilidad y mortalidad puede deberse a inhibición competitiva, a nivel del tubo digestivo, de *C. sordellii* hacia bacterias patógenas que ocupan los mismos nichos ecológicos. Una ventaja de *C. sordellii* sobre *P. tetradius* es que al tratarse de una bacteria formadora de espora, tiene mayor probabilidad de alcanzar el intestino grueso y colonizarlo, como lo registrado con

Cuadro 9

CONCENTRACIÓN DE AMONIO (mg dL⁻¹) EN APÉNDICE CECAL, DECIMOTERCER ASA CECAL Y COLON DISTAL EN CONEJOS ALIMENTADOS CON UNA DIETA COMERCIAL, SOLA O ADICIONADA CON COMPLEMENTOS BACTERIANOS

AMMONIUM CONCENTRATION (mg dL⁻¹) IN CECAL APPENDIX, THIRTEENTH CECAL LOOP AND DISTAL COLON IN RABBITS FED COMMERCIAL DIET, ALONE OR WITH

ADDED BACTERIAL SUPPLEMENTS

	T_1	T_2	T_3	ee
	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	
Cecal appendix	17.61 ^b	24.8 ^a	15.78 ^b	3.46
13 th cecal loop	22.84 ^a	30.48 ^a	11.46 ^b	7.56
Distal colon	18.59 ^a	20.84 ^a	15.83 ^a	6.45

T_1 = Commercial feed without inoculation.

T_2 = T_1 added with *Clostridium sordellii*.

T_3 = T_1 added with *Peptostreptococcus tetradius*.

a,b = Means with different letter in a row, show statistically significant differences ($P < 0.05$).

ee = Mean standard error.

bohydrates in feed could have been one of the causes for the proliferation of bacteria such as *Clostridium* spp and *E. coli*, which possibly were the cause of enteritis in the rabbit farm where this study was carried out. Taking this context into consideration, *C. sordellii* supplement possibly reduced morbidity by competitive exclusion. The treatment with *C. sordellii* maintained metabolism at the cecal appendix level (where bicarbonate ions are secreted), at a more alkaline pH ($P < 0.05$) when compared to the other two treatments. This is related to a production increase of buffer substances, due to an increase in volatile fatty acids production derived from the easily fermentable carbohydrates, which are an ideal substrate for bacteria of the *Clostridium* genus. In the treatment with *C. sordellii* this same pH and higher concentration of ammonium ($P < 0.05$) were found in cecal appendix and this could promote an increase in the total amount of bacteria at this level as compared with the *P. tetradius* treatment ($P < 0.05$).

Participation of cecal bacterial in immunoglobulin production stimulation has been mentioned as a factor in the increase of animal defenses.³³ A relationship has been observed between ammonium concentration and pH of each one of the three regions, with a direct relationship between a more alkaline pH and ammonium concentration increase and vice-versa. This could indicate that medium pH may interfere with the use of ammonium by the bacteria present in these regions.

Lower concentration of total bacteria at the level

complementos de *Bacillus toyoi*,²⁴ que han mostrado capacidad para colonizar el intestino grueso del conejo y actuar como inhibidores competitivos de microorganismos patógenos como *E. coli* y varias especies de clostridios causantes de enteritis posdestete.

De acuerdo con los resultados, *P. tetradius* no tiene efecto importante en la prevención o protección contra enfermedades entéricas. Quizá la dosis utilizada de esta bacteria no compita contra otros microorganismos.

En las variables productivas, la única que mostró diferencia estadísticamente significativa entre tratamientos fue la ganancia de peso en la segunda semana (Cuadro 3) y ésta se debió a una pérdida de peso en los animales del grupo tres (*P. tetradius*), que fueron muy afectados por la enteritis; este resultado repercutió en forma directa en el consumo de alimento, que disminuyó de forma significativa para este tratamiento en la tercera semana (Cuadro 4). Aunque a partir de la tercera semana la eficiencia alimenticia se incrementó en T_3 ($P < 0.05$), con respecto a los otros dos tratamientos (debido probablemente a un efecto compensatorio), en promedio, considerando todo el periodo de engorda, no se encontraron diferencias estadísticas significativas ($P > 0.05$) entre los tratamientos. Tampoco se observaron diferencias significativas en el rendimiento de la canal entre los tres tratamientos ($P > 0.05$). Al respecto, varios autores han registrado nulos beneficios con el uso de complementos bacterianos en variables productivas, pero positivos en lo referente a la salud del animal.¹⁹⁻²¹

of colon in the treatment with *C. sordellii* as compared with *P. tetradius* ($P < 0.05$) could have been an important factor in the decrease of morbidity by non-specific diarrheas ($P < 0.05$) that the animals showed in this treatment.

None of both supplements showed capacity to improve productive variables in the rabbits; nevertheless, *C. sordellii* demonstrated capability to reduce the presence of enteric diseases and mortality, as compared with the other two groups. This result indicates that *C. sordellii* could be considered as a bacterial supplement with potential to be used for rabbits. *P. tetradius* did not benefit the animals in any aspect; therefore, any possible beneficial effect is discarded.

Even though the use of a *C. sordellii* based supplement shows potential to be used as a feed supplement, still more studies need to establish effective doses, duration of the protection against enteric diseases effect, immune system stimulation and economic repercussion on the different production system, before considering its possible commercial use.

Referencias

1. Mitsuoka T. History and future prospects of intestinal flora research, in Intestinal Flora and Immunity. Special Anniversary Edition of Healthist. Tokio Japan: Ed. Yakult Honsa Co. Ltd, 1997.
2. Escalante LA. El potencial de la manipulación de la flora intestinal por medios dietéticos sobre la salud humana. *Enferm Infect Microb* 2001;21:106-114.
3. Fuller R. Probiotics in man and animals. *J Appl Bacteriol* 1989;66:365-378.
4. Ewing WN, Cole DJA. The living gut. An introduction to microorganisms in nutrition. British library cataloguing, Dungannon, UK: Context Publication, 1994
5. Armuzzi A, Cremonini F, Bartolozzi F, Canducci F, Candelli M. The effect of oral administration of *Lactobacillus* GG on antibiotic-associated gastrointestinal side-effects during *Helicobacter pylori* eradication therapy. *Aliment Pharmacol Ther* 2001; 15: 163-169.
6. Pothoulakis C, Kelly CP, Joshi MA, Gao N. *Saccharomyces boulardii* inhibits *Clostridium difficile* toxin A binding and enterotoxicity in rat ileum. *Gastroenterology* 1993; 104: 1108-1115.
7. Pestka JJ, Ha CL, Warner RW, Lee JH, Ustunol Z. Effects of ingestion of yogurts containing *Bifidobacterium* and *Lactobacillus acidophilus* on spleen and Peyer's patch lymphocyte populations in the mouse. *J Food Prot* 2001; 64: 392-95.
8. De Roos NM, Kattan MB. Effects of probiotic bacteria on diarrhea, lipid metabolism and carcinogenesis: A review of papers published between 1988 and 1998. *Am J Clin Nutr* 2000; 71: 405-11.
9. Wollowski I, Rechkemmer G, Pool-Zobel BL. Protective role of probiotics and prebiotics in colon cancer. *Am J Clin Nutr* 2001;73: S451-S455.
10. Fuller R. Nature of the determinant responsible for the

La presencia de altas cantidades de carbohidratos de fácil fermentación en el alimento pudo ser una de las causas de la proliferación de bacterias como *Clostridium* spp y *E. coli*, posibles causantes de las enteritis que afectaban al centro cunícula en donde se desarrolló este estudio. En este contexto, el complemento a base de *C. sordellii* usado posiblemente disminuyó la morbilidad mediante procesos de inhibición competitiva. Metabólicamente, el tratamiento con *C. sordellii* mantuvo un pH más alcalino ($P < 0.05$) con respecto a los otros dos tratamientos, a nivel apéndice cecal (en el cual se secretan los iones bicarbonato), lo que se relaciona con un incremento en la producción de sustancias amortiguadoras, debido a un estímulo en la producción de ácidos grasos volátiles a partir de carbohidratos rápidamente fermentables, los cuales son un sustrato ideal para bacterias del género *Clostridium*. Este mismo pH y mayor concentración de amonio en el tratamiento con *C. sordellii* ($P < 0.05$) en apéndice cecal pudieron promover el incremento en la cantidad de bacterias totales a este nivel, en comparación con el tratamiento con *P. tetradius* ($P < 0.05$).

Se ha mencionado la participación de las bacterias cecales en el estímulo de la producción de inmunoglobulinas que a su vez aumentan las defensas del animal.³³ Se observa relación entre la concentración de amonio y el pH para cada una de las tres regiones, en la que a un pH más alcalino la concentración de amonio se incrementa y viceversa, lo que podría señalar que para las bacterias presentes en estas regiones el pH del medio puede interferir en la utilización y aprovechamiento del amonio.

La menor concentración de bacterias totales a nivel de colon en el tratamiento de *C. sordellii* en comparación con *P. tetradius* ($P < 0.05$) pudo ser factor importante en el decremento de la morbilidad por diarreas inespecíficas ($P < 0.05$) que presentaron los animales de este tratamiento.

Ninguno de los dos complementos mostró capacidad para mejorar las variables productivas de los conejos; sin embargo, *C. sordellii* mostró capacidad para disminuir la presencia de enfermedades entéricas y mortalidad, en comparación con los otros dos grupos, ese resultado permite seguir considerando a *C. sordellii* como un complemento bacteriano con potencial para conejos. *P. tetradius* no benefició en ningún aspecto a los animales, por lo que se descarta cualquier posible efecto benéfico.

Aunque el uso de un complemento a base de *C. sordellii* muestra potencial como complemento alimenticio, hacen falta más estudios sobre dosis efectiva, duración del efecto de protección contra enfermedades entéricas, estimulación del sistema inmune y repercusión económica en diferentes

- adhesión of lactobacilli to chicken crop epithelial cells. *J Gen Microbiol* 1975; 87: 245-250.
11. Mazza P. The use of *Bacillus subtilis* as an antidiarrhea microorganism. *Boll Chim Farm* 1994;133:3-18.
 12. Apgar GA, Kornegaay ET, Lindemaann MD, Wood CM. The effect of feeding various levels of *Bifidobacterium globosum* A on the performance, gastrointestinal measurements, and immunity of weanling pigs and on the performance and carcass measurements of growing-finishing pigs. *J Anim Sci* 1993; 71: 2173-2179.
 13. Jaquette RD, Dennis RJ, Coalson JA, Were DR, Manfredi ET, Red PI. Effect of feeding viable *Lactobacillus acidophilus* (BT1386) on the performance of lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 1988; 71: 1968-1972.
 14. Were DR, Red PI, Manfredi ET. Lactation performance of two large dairy herds of *Lactobacillus acidophilus* strain (BT1386). *J Dairy Sci* 1988; 71 (Suppl 1): 219 (Abstract).
 15. Fellner V, Phillip LE, Sebastian S, Idziak ES. Effects of a bacterial inoculant and propionic acid on preservation of high-moisture ear corn, and on rumen fermentation, digestion and growth performance of beef cattle. *Can J Anim Sci* 2001; 81: 273-280.
 16. Chesson A. Probiotics and other intestinal mediators. In: Cole DJA, Wiseman J, Varley MA, editors. *Principles of pig science*. Nottingham: Nottingham University Press, 1994: 197-214.
 17. King JLO. *Lactobacillus acidophilus* as a growth stimulant for pigs. *The Veterinarians* 1968; 5: 273-280.
 18. Cheeke PR, Hollister AG, Robinson KL. Improving feed efficiency and reducing mortality in rabbits: A case study for use in all species. In: Lyons TP, editor. *Biotechnology in Feed Industry*. Nicholasville Kentucky USA: Alltech Technical Publications, 1989: 253-259.
 19. Hollister AG, Cheeke PR, Robinson KL, Patton NM. Effects of water administered probiotics and acidifiers on growth, feed conversion and enteritis mortality of weanling rabbits. *J Appl Rabbit Res* 1989;12: 143-147.
 20. Hollister AG, Cheeke PR, Robinson KL, Patton NM. Effects of water administered probiotics and acidifiers on performance of weanling rabbits. *J Appl Rabbit Res* 1990;13: 6-9.
 21. Masoero G, Auxilia MT, Caroppo S, Toppino PM. The use of lactic acid bacteria in rabbit diet containing dried whey. *Dairy Sci* (Abstract) 1981;43: 8419.
 22. Cobos PMA, Gutiérrez OC, Hernández SD, González MSS, Mendoza MGD. Aislamiento y caracterización de dos bacterias cecales con potencial de uso en la alimentación del conejo. *Vet Méx* 2004; 35: 109-120.
 23. Hernández SD, Cobos PMA, González MSS, Bársena GR, Arcos GJL, Gallardo LF. Poblaciones microbianas y fermentación en el ciego de conejos en crecimiento alimentados con suplementos de bacterias cecales. *Interciencia* 2004; 29: 442-446.
 24. Hattori Y, Kozasa M, Brenes J. Effect of Toyocerin® (*Bacillus toyoi*) on the intestinal bacterial flora of rabbits. *Proceedings of the 3rd World Rabbit Congress*, 1984 April 4-8; Rome, Italy: World Rabbit Science Association, 1984: 279-286.
 25. Cheeke PR. *Alimentación y nutrición del conejo*. Zaragoza, España: Ed. Acribia, SA, 1995.
 26. Van Soest PJ, Robertson JB, Lewis BA. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J Dairy Sci* 1991; 74: 3583-3597.
 27. Harrigan WF, McCance E. *Métodos de Laboratorio en Microbiología de Alimentos y Productos Lácteos*. León, España: Ed. Academia, 1990.
 28. Cobos PM, Yokoyama MT. *Clostridium paraputrificum* var. *ruminantium*: colonization and degradation of shrimp carapaces *in vitro* observed by scanning electron microscopy. In: Wallace RJ, Lahlou Kassi A, editors. *Rumen Ecology Research Planning*. *Proceedings of a Workshop*; 1995 March 13-18; Addis Abeba, Ethiopia. Addis Abeba, Ethiopia: The International Livestock Research Institute, 1995:151-162.
 29. SAS. Institute Inc. SAS/STAT. Guide for Personal Computer. Version 6. Cary NC: SAS Institute. Inc, 1987.
 30. Daniel WW. *Bioestadística. Base para el análisis de las ciencias de la salud*. 4a ed. México DF: Ed. Limusa SA de CV, 2002.
 31. Mateos GG. Minerales, vitaminas, antibióticos, anticoccidílicos y otros. En: De Blas BC, editor. *Alimentación del Conejo*. Madrid, España: Ed. Mundi-Prensa, 1989; 96-98.
 32. Cheeke PR, Grobner MA, Patton N M. Fiber digestion and utilization in rabbits. *J Appl Rabbit Res* 1986; 9: 25-30.
 33. Green DH, Wakeley PR, Page A, Barnes A, Baccigalupi L, Rica E *et al*. Characterization of two *Bacillus* probiotics. *Appl Environ Microbiol* 1999; 65: 4288-4291.