

# Aislamiento y caracterización de dos bacterias cecales con potencial de uso en la alimentación del conejo

## Isolation and characterization of two rabbit cecum bacteria with potential use for rabbit feeding

Mario A. Cobos Peralta\*  
Carlos Gutiérrez Olvera\*\*  
David Hernández Sánchez\*\*\*  
Sergio S. González Muñoz\*\*\*  
Germán D. Mendoza Martínez\*\*\*

### Abstract

Two anaerobic bacteria were isolated from the bacterial mass of the soft feces, or cecotrophs. The bacteria were identified as *Clostridium sordellii* and *Petostreptococcus tetradius* by morphology, Gram stain and the RapID ANA II Identification System. Generation rate, antibiotic sensibility, crude protein (CP) and crude fat (CF) content, and amino acid profile were determined in both bacteria. An anaerobic closed system for the production of inoculants from this bacteria, and the inoculum stability measured using bacteria concentration and viability in commercial rabbit feed after 5 and 60 d following inoculation, were evaluated. Both *C. sordellii* and *P. tetradius* have an accelerated generation rate (18.15 and 21.6 min) and a high CP content (47.6 and 63.21%). The amino acid profile indicates that methionine is the first limiting amino acid. Both bacteria were susceptible to less than 4 µg mL<sup>-1</sup> of several antibiotics, including: ampicillin, metronidazole and tetracycline. Inoculum production was efficient with concentrations of 7.5 × 10<sup>11</sup> and 1.5 × 10<sup>12</sup> CFU g<sup>-1</sup> of lyophilized bacterial mass for *C. sordellii* and *P. tetradius*, respectively. The inoculants maintained their viability and concentration after 60 d following feed inoculation. It is concluded that isolation, production and feed inoculation with cecotroph-producing bacteria may be achieved. The possibility of evaluating these inoculants in rabbit feed with the goal of assuring cecotrophy advantages is discussed.

**Key words:** *CLOSTRIDIUM SORDELLII*, *PEPTOSTREPTOCOCCUS TETRADIUS*, INOCULANTS, CECAL BACTERIA, CECOTROPHY.

### Resumen

Se aislaron dos bacterias anaerobias de la masa bacteriana que componen los cecótrofos o heces blandas. De acuerdo con su morfología, tinción de Gram y el sistema de identificación RapID ANA II System, se identificaron como *Clostridium sordellii* y *Petostreptococcus tetradius*. En ambas bacterias se determinó la tasa de generación, sensibilidad a antibióticos, contenido de PC, EE y perfil de aminoácidos. También se evaluó un sistema anaerobio cerrado para producir inóculos con estas bacterias, y la estabilidad de los inóculos en cuanto a concentración y viabilidad bacteriana en alimento comercial para conejos después de 5 y 60 d de inoculado. Tanto *C. sordellii* como *P. tetradius* tienen una tasa de generación acelerada (18.15 y 21.6 min) y un contenido elevado de PC (47.6 y 63.27%). El perfil de aminoácidos indica que la metionina es el primer aminoácido limitante. Las bacterias resultaron susceptibles a dosis menores de 4 µg mL<sup>-1</sup> de varios antibióticos como ampicilina, metronidazol y tetraciclina. La producción de los inóculos resultó eficiente, con una concentración de 7.5 × 10<sup>11</sup> y 1.5 × 10<sup>12</sup> UFC g<sup>-1</sup> de masa bacteriana

Recibido el 3 de febrero de 2003 y aceptado el 18 de julio de 2003.

\* Autor para correspondencia. Programa de Ganadería, Colegio de Postgraduados, Km 36.5 carretera México-Texcoco, Montecillo, 56230, Estado de México, México. Correo electrónico: cobos@colpos.mx

\*\* Estudiante de doctorado, Programa de Ganadería, Colegio de Postgraduados, Km 36.5 carretera México-Texcoco, Montecillo, 56230, Estado de México, México.

\*\*\* Programa de Ganadería, Colegio de Postgraduados, Km 36.5 carretera México-Texcoco, Montecillo, 56230, Estado de México, México.

lío-filizada (*C. sordellii* y *P. tetradus*, respectivamente). Los inóculos mantuvieron su concentración y viabilidad hasta el día 60 después de ser inoculados en el alimento. Se concluye que es posible aislar, producir e inocular alimento con bacterias productoras de cecótrofos. Se discute la posibilidad de evaluar dichos inóculos en la alimentación de conejos, con la finalidad de reforzar las ventajas de la cecotrofia.

**Palabras clave:** *CLOSTRIDIUM SORDELLII*, *PEPTOSTREPTOCOCCUS TETRADIUS*, INOCULOS, BACTERIAS CECALES, CECOTROFIA.

## Introduction

Cecotrophy is important because it allows rabbits to use nutrients of microbial origin called cecotrophs<sup>1</sup>, which are normally excreted with the feces. Cecotrophs are made of cecum bacterial mass and, to a lesser degree, by non digested feed. They are spherical or oval, about 3 to 8 mm of diameter, and several particles are joined by a mucilage of bacterial origin. Compared with hard feces, cecotrophs (soft feces) have more CP<sup>2</sup> (37.8 vs. 14.8%), less NDF, ADF, cellulose and lignin<sup>3</sup> (45.1 vs. 78.1; 26 vs. 47%; 20.3 vs. 35.8; 5.8 vs. 11%), and 3 to 6 times more niacin, riboflavin, pantothenic acid and cyanocobalamin<sup>2</sup>. Through cecotrophy, rabbit obtain all its requirements of water-soluble vitamins, as many as 20% of its CP requirements,<sup>4</sup> up to 30% of its energy requirements as VFA,<sup>1,5</sup> and 18% of its daily DM intake.<sup>6,7</sup> Increments in digestibility of OM (11.5%), and ADF (29.75%)<sup>7</sup> have been related with a larger cellulolytic-bacteria concentration in the cecum contents of rabbits that perform cecotrophy.<sup>8</sup>

The bacteria contained in cecotrophs have been related with bacteriostatic and immunologic effects, which avoid growth of pathogenic bacteria in the cecum, that can produce enteric diseases, like *Escherichia coli*.<sup>5,7</sup>

Cecotrophy decreases or is completely inhibited under intensive rabbit production in cages, because rabbits avoid the intake of cecotrophs excreted through the anus;<sup>2</sup> therefore, cecotrophy advantages are lost with a negative effect on rabbit production efficiency.

Isolation of cecum bacteria,<sup>6,9</sup> but not the potential of these bacteria as feed-inoculants, has been studied. If cecotrophy is a natural re-inoculation of viable bacteria through which, the rabbits obtain nutritive, digestive and immunologic advantages, then the inoculation of rabbit feed with cecotroph-producing bacteria would allow to obtain the advantages of cecotrophy on rabbit production. Therefore, the objective of the present study was to isolate and identify cecotroph-producing bacteria using laboratory techniques for anaerobic microorganisms. Also, since these bacteria are anaerobic, a bacteria inoculant production

## Introducción

La cecotrofia en conejos es importante porque le permite utilizar nutrientes de origen bacteriano denominados cecótrofos<sup>1</sup> que, de otra manera, serían eliminados en las heces. Los cecótrofos están formados por una masa de bacterias cecales y, en menor cantidad, por alimento no digerido. Su forma es oval o esférica y su diámetro aproximado es 3 a 8 mm. Varias de estas partículas se encuentran unidas mediante una mucosa de origen bacteriano. Comparadas con las heces duras, los cecótrofos (heces blandas) tienen un mayor contenido de PC<sup>2</sup> (37.8 vs 14.8%), y menor de FDN, FDA, celulosa y lignina<sup>3</sup> (45.1 vs 78.1; 26 vs 47%; 20.3 vs 35.8; 5.8 vs 11%). El contenido de niacina, riboflavina, ácido pantoténico y cianocobalamina es tres a seis veces mayor en los cecótrofos que en las heces duras.<sup>2</sup> Por medio de la cecotrofia, el conejo cubre sus requerimientos de vitaminas hidrosolubles, hasta 20% de la PC<sup>4</sup>, 30% de la energía en forma de AGV<sup>1,5</sup> y puede representar 18% del consumo de MS diaria.<sup>6,7</sup> Se ha registrado un aumento de 11.5 a 29.75% en la digestibilidad de la MO y FDA de la dieta,<sup>7</sup> debido a una mayor concentración de bacterias celulolíticas en el contenido cecal de conejos que realizan cecotrofia.<sup>8</sup>

Las bacterias presentes en cecótrofos se han relacionado con un efecto bacteriostático o inmunológico, que evita la proliferación de bacterias patógenas en la mucosa del ciego, causantes de enfermedades entéricas, como la *Escherichia coli*.<sup>5,7</sup>

A pesar de su importancia, la cecotrofia disminuye o se inhibe por completo en condiciones de cría intensiva en jaulas, debido a que el conejo evita consumir los cecótrofos que se desprenden de la región anal;<sup>2</sup> así, se pierden las ventajas de la cecotrofia y se afecta negativamente la eficiencia productiva del conejo.

Se han aislado bacterias cecales,<sup>6,9</sup> pero no se ha estudiado su potencial como inóculos bacterianos alimenticios. Si se considera la cecotrofia como una reinoculación natural de bacterias viables, mediante la cual el conejo obtiene ventajas nutritivas, digestivas e inmunológicas, es posible que al inocular alimento para conejos con bacterias productoras de cecótrofos

system and the bacteria viability after inoculation of rabbit's feed, stored under natural atmospheric conditions, were evaluated.

## Material and methods

This experiment was carried out at the Laboratories of Rumen Microbiology and Animal Nutrition, of the Cattle Production Program of the Genetic Resources and Productivity Institute of the Postgraduate College located in Montecillo, Texcoco, State of Mexico.

### Isolation of cecum bacteria

For cecotroph-producing bacteria (CPB) isolation, five New Zealand male rabbits (from a population of 100), with outstanding characteristics on health, weight gain and feed conversion, were selected at the end of the fattening period; they were fed with a finishing rabbit feed\* (88% DM, 17% CP, 16% CF, 1% Ca, 0.6% P). At the end of the finishing period the rabbits (77 d old) were slaughtered without fasting, and cecotrophs were collected from the cecum and rectum.

For CPB isolation, an anaerobic culture medium based on glucose, cellobiose, starch and rumen fluid (GCS-RF) was used (Table 1), according to Hungate<sup>10</sup> as modified by Bryant.<sup>11</sup> In sterile culture tubes (18 × 150 mm) 9 mL of GCS-RF were deposited, under CO<sub>2</sub> flow. Then, 1 g of cecotrophs was inoculated into the culture tubes, and serial dilutions from 10<sup>-1</sup> to 10<sup>-12</sup> were done, with three repetitions per sample.

se obtengan las ventajas de la cecotrofia. Por tanto, el objetivo del presente estudio fue aislar e identificar bacterias productoras de cecótrofos mediante técnicas de laboratorio para microorganismos anaerobios. Además, se evaluó un sistema de producción de inóculos y la viabilidad de estas bacterias una vez inoculadas en alimento para conejos almacenado en condiciones atmosféricas naturales.

## Material y métodos

El experimento se realizó en los Laboratorios de Microbiología Ruminal y Nutrición Animal del Programa de Ganadería, Instituto de Recursos Genéticos y Productividad del Colegio de Postgraduados, en Montecillo, Texcoco, Estado de México.

### Aislamiento de bacterias cecales

Para el aislamiento de bacterias formadoras de cecótrofos (BFC), se seleccionaron al final del periodo de engorda, cinco conejos machos (de un total de 100 conejos) Nueva Zelanda con características sobresalientes en salud, ganancia de peso y conversión alimentaria. Se usó un alimento comercial\* para conejos en engorda (88% MS, 17% PC, 16% FC, 1% Ca, 0.6% P). Los conejos se sacrificaron sin previo ayuno al final de la engorda (77 d de edad) y se recolectaron cecótrofos del ciego y recto.

\* Conejina 715, Hacienda

**Cuadro 1**  
MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS PARA EL AISLAMIENTO DE BACTERIAS CECALES  
CULTURE MEDIA USED FOR ISOLATION OF CECUM BACTERIA

<i>Component</i>	<i>Liquid media (100 mL)</i>	<i>Solid media (100 mL)</i>
Distilled water	52.6 mL	51.6 mL
Clarified ruminant fluid *	30.0 mL	30.0 mL
Mineral solution I **	5.0 mL	5.0 mL
Mineral solution II ***	5.0 mL	5.0 mL
0.1% resazurine	0.1 mL	0.1 mL
Soy bean triptone	0.2 g	0.2 g
Yeast extract	0.1 g	0.1 g
8% sodium carbonate †	5.0 mL	5.0 mL
Sulfide cysteine solution ‡	2.0 mL	2.0 mL
Glucose	0.06 g	0.06 g
Celobiose	0.06 g	0.06 g
Starch	0.06 g	0.06 g
Agar	0.00	1.0 g

\* Clarified ruminant fluid previously filtrated through a triple gauze and centrifugated at 23 000 g, for 15 minutes at 4°C, autoclavead for 20 minutes at 15 psi-121°C.

\*\* 6 g of K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> in 1 000 mL of destiled water.

\*\*\* 6 g of K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 6 g of (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 12 g of NaCl, 2.45 g of MgSO<sub>4</sub> and 1.6 g of CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O in 1 000 mL of destiled water.

† 8 g of sodium carbonate in 100 mL of destiled water.

‡ 2.5 g of L-cysteine (diluted in 15 ml of 2N, NaOH); 2.5 g of Na<sub>2</sub>S·9H<sub>2</sub>O, gauge to 100 ml with H<sub>2</sub>O, bubbled with CO<sub>2</sub> for 10 min and sterilized.

The inoculations (180 culture tubes) were incubated 48 h at 38°C. With the objective of isolating the cecum bacteria with highest concentration, at the end of the incubation period, the more diluted culture tubes showing bacterial growth (gas production and turbidity) were selected. From this sample, 1 mL was inoculated in 9 mL of anaerobic liquid medium GCS-RF<sup>12</sup>, the dilution series was repeated ( $10^{-1}$  to  $10^{-12}$ ) and incubated 24 h at 38°C. Finally, from the dilution series, the culture tubes with highest turbidity were selected and used for cecum bacteria isolation with the roll tube technique<sup>10</sup> inoculating 1 mL of the culture medium selected in 9 mL culture tubes containing solid medium GCS-RF with 1.5% agar (Table 1). The inoculated tubes were serially diluted from  $10^{-1}$  to  $10^{-12}$  and incubated 24 h at 38°C. The colonies with highest concentration were selected and used for the isolation of pure cultures.

### **Identification and characterization of the isolated microorganisms**

#### **Morphology and Gram staining**

From the isolated bacteria in the solid medium culture, two bacteria with the highest concentration (colony forming units, CFU mL<sup>-1</sup> of culture medium) were selected. These bacteria were characterized by their morphology, size and Gram staining following the methods described by Harrigan and McCance.<sup>13</sup>

#### **Identification of the isolated bacteria**

The identification of isolated bacteria was made according to Cobos *et al.*,<sup>14</sup> employing the semiautomatic RapID ANA II System technique.

#### **Growing curve of the isolated bacteria species**

A volume of 300 mL of GCS-FR anaerobic medium<sup>12</sup> was inoculated with 30 mL of fresh culture (24 h of incubation) of each isolated bacteria. The inoculated media were incubated in an orbital water bath (Lab-line) equilibrated at 38°C, and orbital speed adjusted to 200 g; ten mL samples were obtained every hour during 8 h and a final one after 24 h, in order to measure pH with a potentiometer (Orion) and absorbance at 630 nm of wave length in a spectrophotometer.\*

Generation rate of the bacteria was calculated in the exponential growing phase using the following formula:<sup>15</sup>

$$K = (\text{Log } 10 X_f - \text{Log } 10 X_o) / 0.301 t$$

Para el aislamiento de BFC se elaboró un medio de cultivo anaerobio a base de glucosa, celobiosa, almidón y fluido ruminal (GCA FR) (Cuadro 1), preparado con la metodología de Hungate,<sup>10</sup> modificada por Bryant.<sup>11</sup> Se depositaron 9 mL de medio GCA-FR en tubos de cultivo (18 × 150 mm) estériles, bajo flujo de CO<sub>2</sub>, se inocularon con 1 g de cecótrofos y se realizaron diluciones de  $10^{-1}$  a  $10^{-12}$ . Se hicieron tres repeticiones por cada muestra. Una vez inoculados los medios (180 tubos de cultivo), se incubaron a 38°C por 48 h. Al final de la incubación y para aislar las bacterias cecales de mayor concentración, se seleccionaron los tubos de cultivo más diluidos, que presentaron evidencias de crecimiento bacteriano (turbidez y producción de gas). Se tomó 1.0 mL, se inoculó en 9 mL de medio anaerobio líquido GCA FR,<sup>12</sup> se repitió la serie de diluciones ( $10^{-1}$  a  $10^{-12}$ ) y se incubó durante 24 h a 38°C. Se seleccionaron los tubos de cultivo con mayor turbidez y se utilizaron para el aislamiento de las bacterias cecales utilizando la técnica del tubo rodado,<sup>10</sup> para lo cual se inoculó 1.0 mL del medio de cultivo seleccionado en tubos de cultivo con 9 mL de medio sólido GCA-FR más 1.5% de agar (Cuadro 1). Los tubos de cultivo inoculados se diluyeron de  $10^{-1}$  a  $10^{-12}$  y se incubaron a 38°C por 48 h. De las colonias se seleccionaron las de mayor concentración para el aislamiento de cultivos puros.

### **Identificación y caracterización de microorganismos aislados**

#### **Morfología y tinción de Gram**

De las bacterias aisladas en los medios de cultivo sólido, se seleccionaron las dos que presentaron la máxima concentración (unidades formadoras de colonias, UFC mL<sup>-1</sup> medio de cultivo). Estas bacterias se caracterizaron por su morfología, tamaño y tinción de Gram, según Harrigan y McCance.<sup>13</sup>

#### **Identificación de las bacterias aisladas**

Se hizo según Cobos *et al.*,<sup>14</sup> empleando la técnica semiautomatizada RapID ANA II System.

#### **Curva de crecimiento de las especies bacterianas aisladas**

Se inocularon 300 mL del medio anaerobio GCA FR<sup>12</sup> con 30 mL de un cultivo fresco (24 h de incubación) de cada bacteria aislada. Los medios inoculados se incubaron en un baño orbital (Lab line) a 38°C, a una velocidad de agitación de 200 g. Se tomaron muestras de 10 mL del cultivo a intervalos de 1 h durante 8 h y

Where:

Xo = Cells concentration at initial time.

Xf = Cells concentration at final time.

t = Period of time from Xo to Xf, in h or min.

K = Growth constant, as the number of duplications per unit of time.

### **Antibiotic sensibility of the isolated bacteria**

The ANA MIC system\*\* was used, which includes ampicillin, cefoxitin, cefotetan, ceftizoxime, cefotaxime, chloramphenicol, clindamicyn, penicillin, metronidazole, tetracycline, piperacillin, ticarcillin and mezlocillin. For this test, pure cultures previously lyophilized of the selected bacteria were used, after incubation in GCS-RF media 24 h at 38°C.

### **Chemical characterization of the isolated bacteria**

In order to get enough sample of the bacterial cell mass, the bacteria were culture in 1000 mL of the anaerobic medium GCS-RF 24 h at 38°C. After that, the bacterial mass was recovered by centrifugation at 13,000 g for 10 min in a bench top centrifuge.\* The DM content of the fresh bacterial mass was measured by triplicate, placing 1.5 g samples in a humidity balance\*\* programmed at 80°C for 180 min. One fraction of the fresh bacterial mass (20 g) was lyophilized\*\*\* 24 h at -30 °C, and it was used to measure OM, ash, CP and crude fat (AOAC<sup>16</sup>).

### **Amino acids profile of the isolated bacteria**

The amino acids profile (aspartic acid, glutamic acid, alanine, arginine, phenylalanine, glycine, histidine, isoleucine, leucine, lysine, methionine, serine, tyrosine, tryptophan and valine,) was determined by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) using the 2-mercaptoethanol, o-phthalaldehyde method.<sup>17,18</sup> A Varian chromatograph model 9010 with a fluorescence detector was used, with a wave length for excitation and emission of 360 and 455 nm.

### **Viable bacteria in the lyophilized**

The concentration of viable bacteria in the bacterial mass before (fresh) and after lyophilization was measured to verify if the process of centrifugation, freezing and lyophilization may negatively affect bacterial viability. Bacterial mass fresh and lyophilized were obtained as previously described. The bacteria concen-

un muestreo final a las 24 h, para hacer lecturas de pH en un potenciómetro (Orion) y de absorbencia a una longitud de onda de 630 nm en un espectrómetro.\*

Se calculó la tasa de generación en la fase de crecimiento exponencial de las bacterias en estudio, de acuerdo con la siguiente fórmula:<sup>15</sup>

$$K = (\text{Log } 10 \text{ Xf} - \text{Log } 10 \text{ Xo}) / 0.301 t$$

Donde:

Xo = Núm. de células en el tiempo inicial.

Xf = Núm. de células en el tiempo final.

t = Longitud de tiempo desde Xo a Xf, en horas o minutos.

K = Constante de crecimiento, como el número de duplicaciones por unidad de tiempo.

### **Sensibilidad a antibióticos de las bacterias aisladas**

Se empleó el sistema ANA MIC\*\* que incluye ampicilina, cefoxitina, cefotetan, ceftizoxima, cefotaxima, cloranfenicol, clindamicina, penicilina, metrodinazol, tetraciclina, piperacilina, ticarcilina y mezlocilina. Para esta prueba se utilizaron cultivos puros liofilizados de las bacterias seleccionadas, después de incubarlas en medio GCA-FR durante 24 h a 38°C.

### **Caracterización química de las bacterias aisladas**

Para contar con suficiente muestra de masa celular bacteriana, se cultivaron las bacterias en 1 000 mL de medio anaerobio GCA FR, por 24 h a 38°C. Posteriormente, la masa fresca bacteriana fue recuperada por centrifugación a 13 000 g por 10 min en una centrífuga de mesa.\*\*\* Se determinó el contenido de MS en la masa bacteriana fresca por triplicado, colocando 1.5 g de muestra en una balanza para humedad,† programada a 80°C por 180 min. Otra parte de la masa fresca bacteriana (20 g) se secó en una liofilizadora‡ durante 24 h a 30°C y se usó para medir la MO, cenizas, PC y extracto etéreo (AOAC<sup>16</sup>).

### **Perfil de aminoácidos en las bacterias aisladas**

El perfil de aminoácidos (ácido aspártico, ácido

\* Espectronic 20.

\*\* Inovative Diagnostic System, Inc.

\*\*\* Eppendorf, 5804.

† OHAUS, MB200.

‡ Labconco, Frezone 6L.

tration was calculated by the most probable number technique (MPN)<sup>13</sup> in a GCS-RF culture medium, and 10<sup>-1</sup> to 10<sup>-16</sup> dilutions with three repetitions per dilution.

### **Production of bacterial inoculants and their viability on sprayed feed**

An inoculum of each isolated bacterium was produced in an anaerobic closed system with GCS-RF as culture medium. Five round bottom Erlenmeyer flasks containing 1000 mL of culture medium, were inoculated with each bacterium (5 mL) and incubated 48 h at 39°C. The cultures were transferred (60 mL) to serologic vials (100 mL), frozen (24 h), and lyophilized as previously described.

For feed inoculation with the bacteria, 1 g of the lyophilized bacterial mass was diluted in 40 mL of water (distilled and sterilized) and sprayed on 1 kg of rabbit feed\* using an atomizer. The inoculated feed was dried in an oven (6 h, 70°C), packaged (three repetitions per bacterium) in paper bags and stored at room temperature. The room's temperature ranged between 16 to 22°C during the experimental period. Concentration of total bacteria was measured after 5 and 60 d of feed storage, by the MPN technique<sup>13</sup> and the GCS-RF liquid medium.

## **Results**

Two cecotrophs producing bacteria (CPB) showing the highest concentration were isolated and characterized. According with the RapID ANA II System, the CPB isolated were identified as *Clostridium sordelli* and *Peptostreptococcus tetradius*. *C. sordelli* is rod shaped 0.5 µm diameter and 6 to 12 µm length, Gram positive, motile, anaerobic, with subterminal endospore. The biochemical analyses (included in the RapID ANA II System) pointed out that *C. sordelli* utilizes urea, α-glucose, nitrophenil phosphates, glycine and arginine. *P. tetradius* is a cocci 0.5 to 1.5 µm in diameter, Gram positive, anaerobic, non motile, arranged in pairs or four to eight cells chains; this bacterium utilizes urea, lactose, and β-glucose, phenylalanine and arginine.

The growing curve of *C. sordelli* showed a fast establishment of the lag phase during the first hour of incubation (Figure 1), which indicates a rapid recognition of substrates in the medium and synthesis of specific enzymes by the bacterium. According with the bacteria concentration per mL, after 2 h of incubation began the exponential growth, which was sustained after 4 h of incubation, and the death phase began after 5 h of incubation. The highest bacteria concentration was obtained after 4 h of incubation,

glutámico, alanina, arginina, fenilalanina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, serina, tirosina, triptofano y valina) se determinó por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), usando el método de 2-mercaptoetanol, o-phthalaldehído.<sup>17,18</sup> Se utilizó un cromatógrafo Varian modelo 9010 con detector de fluorescencia, a una longitud de onda de excitación y emisión de 360 y 455 nm.

### **Bacterias viables en el liofilizado**

Se midió la concentración de bacterias viables en la masa bacteriana antes (fresca) y después de liofilizar, para determinar si el proceso de centrifugación, congelación y liofilización afectan negativamente la viabilidad bacteriana. La masa bacteriana fresca y liofilizada se obtuvo de acuerdo con la metodología ya descrita. Para medir la concentración de bacterias se utilizó el medio de cultivo GCA-FR, diluciones de 10<sup>-1</sup> a 10<sup>-16</sup> con tres repeticiones por dilución y la técnica del número más probable (NMP).<sup>13</sup>

### **Producción de inóculos bacterianos y su viabilidad en alimento asperjado**

Se produjo un inóculo a partir de cada bacteria aislada en un sistema anaerobio cerrado y en un medio de cultivo GCA FR. Cinco matraces Erlenmeyer de fondo redondo con 1 000 mL de medio de cultivo, fueron inoculados con cada bacteria aislada (5 mL), e incubados a 39°C durante 48 h. Los cultivos obtenidos se transfirieron a viales serológicos de 100 mL (60 mL por vial), se congelaron por 24 h y se liofilizaron para su conservación siguiendo el procedimiento descrito anteriormente.

Para la inoculación del alimento con las bacterias, se diluyo 1 g de masa bacteriana liofilizada en 40 mL de agua (previamente destilada y esterilizada) y se asperjó con un atomizador sobre 1 kg de alimento para conejos.\* El alimento inoculado se secó en una estufa a 70°C durante 6 h, posteriormente se embolsaron (tres repeticiones por cada bacteria) en bolsas de papel y se almacenaron en un cuarto a temperatura ambiente. La temperatura fluctuó entre 16 y 22°C durante toda la prueba. La concentración de bacterias totales se midió a los 5 y 60 d de almacenaje, utilizando la técnica del NMP<sup>13</sup> y el medio líquido GCA-FR.

## **Resultados**

Se aislaron y caracterizaron las dos bacterias productoras de cecótrofos (BPC) con la mayor

\* Conejina 715, Hacienda.

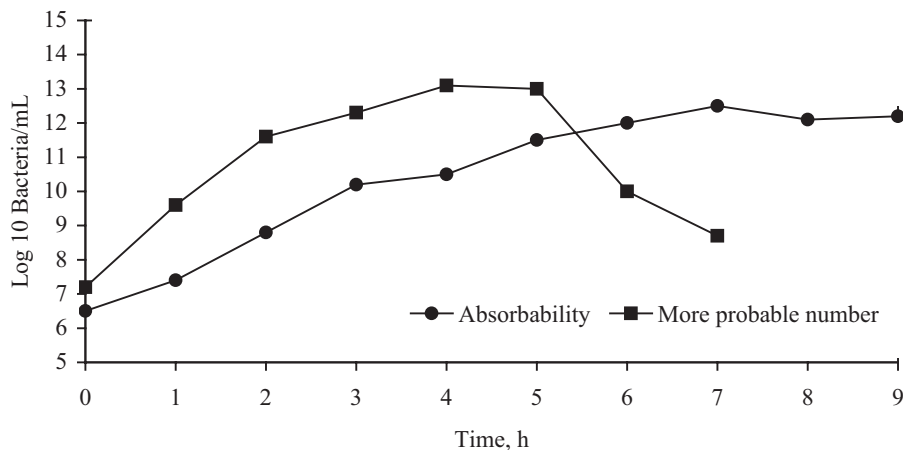
and the generation time, calculated with the bacteria concentration data between 3 and 4 h of incubation (exponential phase), was 21.6 min. Average pH ranged between 6.5 to 6.65; therefore, it did not have a negative effect on the growing curve.

For the growing curve in *P. tetradius* (Figure 2), there was an interpretation problem; according to absorbance the lag phase began after 3 h of incubation, but according with the concentration of viable bacteria the exponential phase began immediately. This differences may be explained by the fact that *P. tetradius* is a non motile bacterium, it tends to form cell chains; and the bacteria precipitate faster in solution affecting spectrophotometer readings. Therefore, in order to infer from the growing curve, only the concentration of viable bacteria per mL were used. The highest bacterial concentration was recorded after 4 h of incubation, after that the stationary phase was maintained for 3 h. The generation time, measured between 1 to 3 h of incubation was 18.15 min for this bacterium.

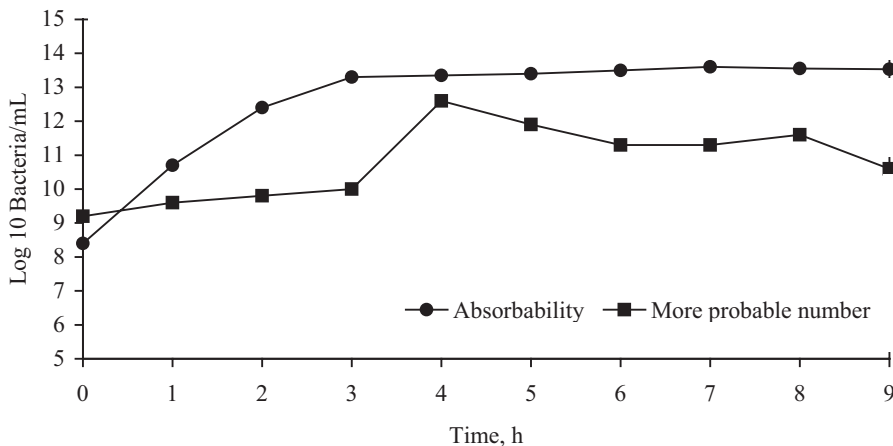
The antibiotic sensibility test (Table 2) showed that *C. sordelli* is highly sensible to doses lower than  $4 \mu\text{g mL}^{-1}$  of ampicillin, choramphenicol, metronidazole, and tetracycline; at the same doses, *P. tetra-*

concentración en pruebas sucesivas de aislamiento. De acuerdo con la prueba RAPID ANA II System, las BPC aisladas se identificaron como *Clostridium sordelli* y *Peptostreptococcus tetradius*. *C. sordelli* es un bacilo de  $0.5 \mu\text{m}$  de diámetro y de 6 a  $12 \mu\text{m}$  de longitud, Grampositiva, móvil, anaerobia, con espora subterminal. El análisis bioquímico (incluido en la prueba RAPID ANA II System) indica que *C. sordelli* utiliza urea,  $\alpha$ -glucosa, nitrofenil fosfato, glicina y arginina. *P. tetradius* es un coco de 0.5 a  $1.5 \mu\text{m}$  de diámetro, Grampositivo, anaerobio, no móvil, en pares o en cadenas de cuatro a ocho células. Las pruebas bioquímicas indican que esta bacteria utiliza urea, lactosa, y  $\beta$ -glucosa, fenilalanina y arginina.

La curva de crecimiento para la bacteria *C. sordelli* presentó un rápido establecimiento de la fase lag durante la primera hora de incubación (Figura 1), lo que indica una rápida respuesta de la bacteria al reconocimiento de los sustratos en el medio y síntesis de enzimas específicas. A las 2 h de incubación se inició el crecimiento exponencial que continuó hasta las 4 h de acuerdo con la concentración de bacterias por mL, y a partir de las 5 h se inició la fase de muerte bacteriana. La máxima concentración microbiana se obtuvo a las 4 h de incubación y el tiempo de



**Figura 1.** Curva de crecimiento de *Clostridium sordelli*. *Clostridium sordelli* growth curve.



**Figura 2.** Curva de crecimiento de *Peptostreptococcus tetradius*. *Peptostreptococcus tetradius* growth curve.

*dius* showed sensibility to ampicillin, cefotetan, cefotaxime, metronidazole, mezlocillin, piperacillin, tetracycline, and ticarcillin. Both bacteria showed high resistance against penicillin.

DM, OM, ash, and CP content (Table 3) agree with the data reported for other bacterial species; CP content was higher in *P. tetradivus* (63.7%) than in *C. sordelli* (47.6%). 15 amino acids were found in *P. tetradivus* and 14 in *C. sordelli*. In both bacteria the amino acids profile resulted high in glutamic and aspartic acid and low in methionine.

After 48 h of incubation the production of lyophilized bacteria mass per L of culture medium was 0.17 g for *C. sordelli* and 0.26 g for *P. tetradivus*. The concentration of viable bacteria per g of bacterial mass centrifuged and lyophilized was  $7.5 \times 10^{11}$  and  $1.5 \times 10^{12}$  CFU g<sup>-1</sup>, indicating a loss in viability of 21.1% and 66.66% (respectively) due to the lyophilization process. Although, the loss in viability was higher in *P. tetradivus* than in *C. sordelli*, its concentration per gram of lyophilized bacterial mass was higher. After inoculation of rabbit feed with the bacteria, the concentration of viable bacteria was maintained stable between 5 to 60 d, with values of  $2.5 \times 10^9$  and  $1.1 \times 10^9$  CFU g<sup>-1</sup> of feed, for *C. sordelli* and *P. tetradivus*, respectively. This result is explained because the lyophilization process is basically a dehydration process where the bacteria are in a dormant life, the environmental conditions do not affect their viability, and they will only return to grow and to have metabolic activity when the medium has appropriated conditions (anaerobiosis, pH, liquid medium and substrates for growth), this conditions will take place when the bacteria enter the animal's digestive tract.

## Discussion

Six different bacterial colonies were isolated, but only two of them showed a bacterial concentration higher than  $10^8$  CFU g<sup>-1</sup> of cecotrophs. The isolated bacteria are not members of the dominant genus in cecum or cecotrophs, like nonsporing Gram negative rods of the *Bacteroides* genus.<sup>3,19</sup> However, the presence in cecotrophs of bacteria belonging to the genus *Clostridium* and *Peptostreptococcus* have been reported.<sup>9,20</sup>

The capacity to use  $\alpha$ -glucose by *C. sordelli* has little significance in cecum, where there is a low concentration of maltose or starch, but it may be relevant in the small intestine, where this capacity may contribute to the digestion of the diet's starch. The ability of hydrolyze carbohydrates with  $\beta$ -glucose bonds which was found in *P. tetradivus*, allows this bacteria to degrade and to grow from cellulose or cellobiose,<sup>21</sup> which are found in the cecum content a higher concentration. Other characteristic of the isolated bacteria is that

generación, calculado a partir de la concentración bacteriana entre las horas 3 y 4 de incubación (fase exponencial), fue 21.6 min. Durante toda la prueba el pH de los medios fluctuó entre 6.5 y 6.65, por lo que no afectó negativamente la curva de crecimiento.

La curva de crecimiento para *P. tetradivus* (Figura 2) presentó problemas de interpretación porque de acuerdo con la absorbancia la fase lag fue de 3 h, pero según la concentración de bacterias viables, la fase exponencial se inició inmediatamente. Esta diferencia se debe a que *P. tetradivus* no es móvil, tiende a formar cadenas de células, se precipita más rápido en solución y afecta las lecturas en el espectrómetro. Por tanto, para interpretar la curva de crecimiento se utilizaron únicamente los datos de concentración de bacterias viables por mL. La máxima concentración de bacterias se registró a las 4 h de incubación, y se mantiene la fase estacionaria hasta la hora 7. La tasa de generación para esta bacteria, medida entre 1 y 3 h de incubación fue 18.15 min.

Mediante la prueba de susceptibilidad a antibióticos (Cuadro 2), se determinó que *C. sordelli* es altamente sensible a dosis menores a  $4 \mu\text{g mL}^{-1}$  de: ampicilina, cloranfenicol, metronidazol y tetraciclina; a la misma dosis, *P. tetradivus* mostró sensibilidad a ampicilina, cefotetan, cefotaxima, metronidazol, mezlocilina, piperacilina, tetraciclina, y ticarcilina. Ambas bacterias presentan alta resistencia a la penicilina.

El contenido de MS, MO, cenizas y PC (Cuadro 3) fue similar al registrado en otras especies bacterianas. En ambas bacterias la PC fue alta, pero fue mayor en *P. tetradivus* (63.7%) que en *C. sordelli* (47.60%). Se detectaron 15 aminoácidos en la masa bacteriana de *P. tetradivus* y 14 en *C. sordelli* (Cuadro 3). En ambas bacterias se determinó un perfil de aminoácidos con una concentración alta en ácido aspártico y glutámico, y baja en metionina.

La producción de masa bacteriana liofilizada después de 48 h de incubación fue 0.17 g para *C. sordelli* y 0.26 g para *P. tetradivus* por L de medio de cultivo. La concentración de bacterias viables por g de masa bacteriana centrifugada y liofilizada fue  $7.5 \times 10^{11}$  y  $1.5 \times 10^{12}$  UFC g<sup>-1</sup>, lo que indica una pérdida de la viabilidad bacteriana de 21.1% y 66.66%, respectivamente, por proceso de liofilización. Aunque la pérdida de viabilidad fue mayor en *P. tetradivus* que en *C. sordelli*, su concentración por gramo de masa bacteriana liofilizada fue superior. Una vez inoculadas las bacterias en el alimento para conejo, la concentración de bacterias viables se mantiene constante entre 5 y 60 d después de la inoculación con valores de  $2.5 \times 10^9$  y  $1.1 \times 10^9$  UFC g<sup>-1</sup> de alimento para *C. sordelli* y *P. tetradivus*. Este resultado se explica porque la liofilización es, en esencia, un proceso de



**Cuadro 2**  
RESISTENCIA DE LAS BACTERIAS CECALES AISLADAS A DIFERENTES ANTIBIÓTICOS  
CECUM BACTERIA SENSIBILITY TO DIFFERENT ANTIBIOTICS

<i>Antibiotic</i>	<i>Clostridium sordelli</i>	<i>Peptostreptococcus tetradius</i>
	$\mu\text{g mL}^{-1}$	$\mu\text{g mL}^{-1}$
Ampicillin	< 4	< 2
Cetoxitin	< 16	< 32
Cefotetan	< 32	< 4
Ceftizoxime	< 8	< 16
Cetoxime	< 16	< 2
Cloramphenicol	1	< 16
Clindamicyn	> 16	< 16
Penicillin	> 16	< 32
Metronidazole	< 4	< 1
Tetracycline	1	0.5
Piperacillin	< 16	< 4
Ticarcilin	< 32	< 4
Mezlocillin	< 32	< 4

they are ureolytic, which is advantageous, because this characteristic allows them to synthesize microbial protein from ammonia.<sup>22, 23</sup>

The generation rates showed a fast duplication time in both bacteria, and that explain why in the process of bacterial isolation, the selected bacteria had the highest concentration after 24 and 48 h of incubation. A fast generation rate is desirable, because it allows to keep a high bacterial concentration in cecum contents, which in turn will enhance cecotrophs synthesis.

The isolated bacteria sensibility to different antibiotics is important, particularly when they are expected to be used as feed inoculants. Under certain conditions, these antibiotics can be used to control the development and activity of the inoculated bacteria; for example, if these bacteria could be related with the occurrence of an enteric disease.

The DM, OM and CP content was similar to other bacterial species,<sup>15</sup> but the crude fat content was lower to that reported in other bacteria (9.1%).<sup>4</sup> The CP content of the isolated bacteria, support the importance of the bacterial mass ingested by cecotrophy to achieve between 12 to 18.7 % of the CP requirements in the rabbit.<sup>24</sup> Although, both bacteria have a high protein content, *P. tetradius* has higher potential than *C. sordelli*, because of its higher CP content (63.27% vs. 47.60 %). The amino acid profile was similar in both bacteria to that reported by other authors<sup>24</sup> with bacterial mass in cecotrophs. However, methionine concentration was low in both bacteria, similar to that reported in rumen bacterial mass, where methionine is considered the first limiting amino acid;<sup>25</sup> this seems to apply also for the bacterial mass in cecotrophs.

The anaerobic closed system used to produce

deshidratación en el cual las bacterias se encuentran en vida latente, las condiciones ambientales no afectan su viabilidad, y sólo reiniciarán su crecimiento y actividad metabólica cuando se presenten las condiciones propicias en el medio (anaerobiosis, pH, medio líquido y sustratos para su crecimiento), lo cual ocurrirá cuando las bacterias ingresen al tubo digestivo del animal.

## Discusión

Se aislaron seis diferentes colonias bacterianas, pero sólo las dos seleccionadas mostraron una concentración bacteriana superior a  $10^8$  UFC g<sup>-1</sup> de cecótrofos. Las bacterias aisladas no forman parte de los géneros dominantes en ciego y cecótrofos, como los bacilos Gramnegativos, no esporulados del género *Bacteroides*.<sup>3, 19</sup> Sin embargo, ya se ha informado la presencia de bacterias de los géneros *Clostridium* y *Peptostreptococcus* en los cecótrofos.<sup>9, 20</sup>

La capacidad de *C. sordelli* para utilizar  $\alpha$ -glucosa tiene poca importancia en el ciego, donde hay baja concentración de maltosa o almidón, pero puede ser importante en el intestino delgado donde podría contribuir a la digestión del almidón de la dieta. La capacidad de hidrolizar carbohidratos con enlaces  $\beta$ -glucosa detectada en *P. tetradius*, permite a la bacteria degradar y crecer a partir de celulosa o celobiosa,<sup>21</sup> que se encuentran en mayor concentración en el contenido cecal. Otra característica de las bacterias aisladas es que son ureolíticas, lo cual es favorable, dado que le permite sintetizar proteína microbiana a partir de amoníaco.<sup>22, 23</sup>

Las tasas de generación en ambas bacterias presentan un ritmo de duplicación acelerado, lo cual

**Cuadro 3**  
**ANÁLISIS QUÍMICO PROXIMAL (% MS) Y COMPOSICIÓN DE AMINOÁCIDOS DE LAS BACTERIAS AISLADAS**  
**CHEMICAL ANALYSES (DM %) AND AMINO ACID COMPOSITION OF THE ISOLATED BACTERIA**

<i>Concept</i>	<i>Clostridium sordellii</i>	<i>Peptostreptococcus tetradius</i>
Dry mater, %	22.45	21.60
Organic mater, %	88.79	87.98
Crude fat, %	3.25	4.27
Ashes, %	11.17	12.01
Crude protein, %	47.60	63.21
Aminoacid composition (as % crude protein)		
Aspartic acid	11.49	12.53
Glutamic acid	19.00	21.83
Alanine	9.83	12.01
Arginine	4.26	3.50
Fenilalanine	2.99	3.20
Glicine	7.85	8.56
Histidine	Not determined	1.75
Isoleucine	4.25	3.44
Leucine	6.35	6.45
Lisine	7.13	8.42
Metionine	2.52	1.00
Serine	5.74	4.83
Tirosine	3.35	3.09
Triptofane	7.93	5.61
Valine	6.72	4.00

the inoculants was highly efficient, and the calculated viable cell concentration in both inoculants was higher than in other microbial inoculants made up from lactobacillus (Lacto-Sacc;  $1.31 \times 10^8$  CFU g<sup>-1</sup>) or yeast (Yea-Sacc;  $8.13 \times 10^8$  CFU g<sup>-1</sup>).<sup>26</sup>

The bacteria maintained their viability for up to 60 d after feed inoculation, which is positive because: 1) the isolated bacteria are anaerobic; 2) the feed was neither processed or stored under anaerobic conditions; 3) a high bacteria viability is required in order for the inoculants to affect productive efficiency of the animals fed with inoculated feed.

It is concluded that using laboratory techniques for anaerobic rumen microorganisms, it is possible to isolate and to obtain pure cultures of cecotroph-producing bacteria. The isolated bacteria (*C. sordellii* and *P. tetradius*) have a high protein content, use non protein nitrogen for protein synthesis, have a fast generation rate, are sensible to several antibiotics, and *P. tetradius* is able to degrade cellulose. Those characteristics improve their potential as bacteria inoculants, and they are similar to several characteristics reported for the bacterial mass found in cecotrophs. The lyophilization process allows to produce cecum bacteria inoculants with high bacteria concentration and viability. Although the inoculants were made from anaerobic bacteria, it must be pointed out that

explica que en el proceso de aislamiento, las bacterias seleccionadas tuvieron mayor concentración a las 24 y 48 h de incubación. Una tasa de generación acelerada es deseable, porque permite mantener una alta concentración bacteriana en el contenido cecal, lo que incrementa la síntesis de cecótrofos.

La susceptibilidad de las bacterias aisladas a diferentes antibióticos es importante, en particular cuando se pretende utilizarlas como inóculo alimenticio. En un determinado momento, estos antibióticos se pueden usar para controlar el desarrollo y actividad de los microorganismos inoculados; por ejemplo, en el supuesto caso de que se relacionen con la presencia de una enfermedad entérica.

El contenido de MS, MO y PC fue similar al de otras especies bacterianas,<sup>15</sup> pero el contenido de extracto etéreo es inferior al descrito en otras bacterias (9.1%).<sup>4</sup> El contenido de PC de las bacterias aisladas confirma la importancia de la masa microbiana que consume el conejo mediante la cecotrofia, para cubrir 12 a 18.7% del requerimiento de PC.<sup>24</sup> Aunque ambas bacterias tienen un valor alto de proteína, *P. tetradius* presenta mayor potencial que *C. sordellii*, por su mayor contenido de PC (63.27% vs 47.60%). En ambas bacterias se determinó un perfil de aminoácidos similar al registrado por otros autores<sup>24</sup> en masa bacteriana de los cecótrofos. Sin embargo,

the feed inoculation was made under aerobic conditions and the inoculants maintained their viability 60 d after spraying the feed. The viability time of bacteria in the inoculated feed is higher than the average storage time of trade mark feeds; therefore, these inoculants have a high probability to be added in feeds for rabbits.

## Acknowledgements

The present research was financially supported by the Science and Technology National Council, project No. 26138-B, entitled "Development of an inoculant of cecum bacteria from the rabbit, and assay of its potential benefit on feed efficiency and mortality reduction for enteric diseases in rabbits from the weaning to the market weight".

## Referencias

1. Straw TE. Bacteria of the rabbit gut and their role in the health of the rabbit. *J Appl Rabbit Res* 1988; 2(3): 142-150.
2. Cheeke PR. Rabbit feeding and nutrition. Orlando: Academic Press Inc., 1987.
3. Uden P, Van Soest PJ. Comparative digestion of timothy (*Phleum pratense*) fibre by ruminants, equines and rabbits. *Br J Nutr* 1982; 47:267-262.
4. Cheeke PR. Rabbit nutrition and feeding: recent advances and future perspectives. *J Appl Rabbit Res* 1982; 7(1): 31-37.
5. Cheeke PR, Grobner MA, Patton NM. Fiber digestion and utilization in rabbits. *J Appl Rabbit Res* 1986; 9(5): 25-30.
6. Hernández-Sánchez D, Cobos-Peralta MA. Digestibilidad *in vitro*, población de bacterias celulolíticas y totales del apéndice cecal, ciego y colon del conejo. *Tec Pecu Mex* 2001; 39 (3):229-236.
7. Lebas F, Coudert P, de Rochambeau H, Thébault RG. The Rabbit; Husbandry, Health and Production. Rome: FAO, Animal Production and Health series, 1997.
8. Bellier TR, Guidene T, Vernay M, Colin M. *In vivo* study of circadian variations of the cecal fermentation pattern in posweaned and adult rabbits. *J Anim Sci* 1995; 73:128-135.
9. Crociani F, Biavati B, Castagnoli P, Matteuzzi D. Anaerobic ureolytic bacteria from caecal content and soft faeces of rabbit. *J Appl Bacteriol* 1984; 57:83-88.
10. Hungate RE. A roll tube method for cultivation strict anaerobes. In: Norris JR, Ribbons DW, editors. *Methods in Microbiology*. New York: Academic Press Inc., 1969:117-132.
11. Bryant MP. Commentary of Hungate technique for culture of anaerobic bacteria. *Am J Clin Nutr* 1972; 25:1324-1328.

la concentración de metionina fue baja en ambas bacterias, similar a la registrada en la masa bacteriana ruminal, en la cual la metionina es el primer aminoácido limitante<sup>25</sup> lo que al parecer también aplica para la masa bacteriana en los cecótrofos.

El sistema anaerobio cerrado utilizado para la producción de inóculos fue altamente eficiente, ya que la concentración de células viables determinada en ambos inóculos fue superior a otros inóculos microbianos elaborados con lactobacilos (Lacto-Sacc;  $1.31 \times 10^8$  UFC g<sup>-1</sup>) o levaduras (Yea-Sacc;  $8.13 \times 10^8$  UFC g<sup>-1</sup>).<sup>26</sup>

Las bacterias mantuvieron su viabilidad hasta 60 d después de inocular el alimento, un resultado positivo si se considera que: 1) las bacterias aisladas son anaerobias; 2) el alimento no se procesó, ni almacenó en condiciones de anaerobiosis; 3) se requiere una alta viabilidad bacteriana para que los inóculos cambien la eficiencia productiva de los animales alimentados con alimento inoculado.

Se concluye que mediante técnicas de laboratorio para microorganismos anaerobios del rumen, se puede aislar y obtener cultivos puros de bacterias productoras de cecótrofos. Las bacterias aisladas (*C. sordellii* y *P. tetradium*) tienen un alto contenido de PC, utilizan nitrógeno no proteínico para sintetizar proteína microbiana, presentan una tasa de generación acelerada, y son sensibles a varios antibióticos; además, *P. tetradium* puede degradar celulosa. Tales características favorecen su potencial uso como inóculo bacteriano, ya que se asemejan a varias características registradas en la masa bacteriana de los cecótrofos. La liofilización permite producir inóculos de bacterias cecales con una alta concentración y viabilidad bacteriana. Aunque los inóculos se desarrollaron a partir de bacterias anaerobias y la inoculación del alimento fue en condiciones aeróbicas, los inóculos evaluados mantienen su viabilidad 60 d después de ser asperjados en el alimento. Debido a que la viabilidad de las bacterias en el alimento inoculado es superior al promedio de almacenaje de alimentos comerciales, los inóculos desarrollados tienen una alta probabilidad de ser incorporados durante el proceso de producción de alimento para conejos.

## Agradecimientos

La presente investigación fue financiada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México, a través del proyecto No. 26138-B titulado "Desarrollo de un inóculo de bacterias cecales del conejo y ensayo de su potencial beneficio sobre la eficiencia alimenticia y disminución de la mortalidad por enfermedades entéricas en conejos del destete al peso de mercado".

12. Cobos PM, Yokoyama MT. *Clostridium paraputrificum* var. *ruminantium*: colonization and degradation of shrimp carapaces *in vitro* observed by scanning electron microscopy. Proceedings of the Rumen Ecology Research Planning Workshop; 1995 March 13-18; Addis Ababa, Ethiopia: International Livestock Research Institute, 1995:151-162.
13. Harrigan WF, McCance ME. Métodos de laboratorio en microbiología de alimentos y productos lácteos. León España: Ed. Academia, 1979, 361-366.
14. Cobos PM, Flegler ST, Yokoyama MT. Isolation and characterization of a ruminal *Clostridium* sp. which degrade purified chitin and shellfish waste. 22nd. Biennial Conference on Rumen Function; 1993 agosto 17-21; Chicago (Ill) Chicago: American Society for Microbiology. 1993:22:28.
15. Madigan MT, Martinko JM, Parker J. Brock Biología de los Microorganismos. 8a ed. Madrid, España: Prentice Hall, 1999: 985-987.
16. Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis. 13th ed. Washington, D.C. AOAC 1984:1018.
17. Lindroth P, Mopper K. High performance liquid chromatographic determination of subpicomole amounts of amino acids by precolumn fluorescence derivation with o-phthalaldehyde. Anal Chem 1979; 51:1667-1674.
18. Jones BN, Paabo S, Stein S. Amino acid analysis and enzymatic sequence determination of peptides by an improved o-phthalaldehyde precolumn labeling procedure. J Liquid Chromat 1981; 4: 565-586.
19. De Blas JC. Alimentación del Conejo: Coprofagia. Madrid: Mundi Prensa. 1989:15-27.
20. Forshyte SJ, Parker DS. Nitrogen metabolism by the microbial flora of the rabbit caecum. J Appl Bacteriol 1985; 58:363-369.
21. Fraga MJ, Perez de Ayala P, Carbaño R, de Blas JC. Effect of type of fiber on the rate of passage and on the contribution of soft feces to nutrient intake of finishing rabbits. J Anim Sci 1991; 69:1566-1574.
22. Gidenne T. Nutritional and ontogenic factors effecting rabbit caeco colic digestive physiology. 6th World Rabbit Congress; Toulouse, France 1996 May 26-30, Toulouse: Asociación Científica Mundial de Cunicultura. 1996: (1):13-28.
23. Makkar HPS, Singh B, Krishna L. Effect of feeding urea on some hydrolytic and ammonia assimilation enzymes in rabbit cecum. J Appl Rabbit Res 1990; 13: 35-38.
24. Leonart, F. Cecotrofia. In: Tratado de Cunicultura. Vol. 1. Madrid: Mundi Prensa, 1980; 49-56.
25. Ellison HJ, Schingoethe DJ, Maiga HA. Lactation evaluation of protein supplements of varying ruminal degradabilities. J Dairy Sci 1997; 80:385-392.
26. Dawson KA, Newman KE, Boling JA. Effect of microbial supplements containing yeast and lactobacilli on roughage fed ruminal microbial activities. J Anim Sci 1990; 68: 3392-3398.