

# Digestibilidad *in vitro*, población de bacterias celulolíticas y totales del apéndice cecal, ciego y colon del conejo<sup>a</sup>

David Hernández Sánchez<sup>b</sup>, Mario A. Cobos Rralta<sup>b</sup>

## RESUMEN

Hernández SD, Cobos PMA. *Téc Pecu Méx* 2001;39(3)229-236. Con el objetivo de comparar la actividad microbiana en diferentes secciones del ciego y colon, se determinó el pH, la digestibilidad *in vitro* de la MS y la concentración de bacterias totales y celulolíticas. Se utilizaron 10 conejos de la raza Nueva Zelanda de 70 días de edad. Las muestras se obtuvieron del apéndice cecal (AC), de la treceava asa cecal (TAC), y de la porción distal del colon (PDC). El pH del AC fue superior ( $P < 0.05$ ) al determinado en TAC y PDC (7.3, 6.3 y 6.3). La digestibilidad *in vitro* de la materia seca fue mayor ( $P < 0.05$ ) en AC que en TAC y PDC (56.0, 38.7 y 33.4 %). La concentración total de bacterias fue similar entre AC y PDC, pero inferior en TAC ( $1.1 \times 10^{12}$ ,  $1.6 \times 10^{12}$  y  $3.2 \times 10^{10}$ ). La concentración de bacterias celulolíticas fue notoriamente superior ( $P < 0.05$ ) en AC con respecto a TAC y PDC ( $9 \times 10^7$ ,  $4 \times 10^4$  y  $4 \times 10^2$ ). Se concluye que la sección distal del colon no representa un buen estimador de la actividad y concentración de bacterias del ciego, y de acuerdo a la mayor concentración de bacterias celulolíticas y la digestibilidad *in vitro* de la materia seca determinadas en AC, se sugiere que los estudios relacionados con factores que afectan a los microorganismos cecales, deben incluir muestras del apéndice cecal.

**PALABRAS CLAVE:** Contenido cecal, Bacterias celulolíticas, Cecotrofia, Digestibilidad cecal, Digestibilidad *in vitro* de la materia seca.

Las bacterias que colonizan el ciego del conejo resultan de gran importancia, ya que se ha demostrado que además de ser los principales microorganismos relacionados con la degradación de la fibra del alimento<sup>(1)</sup>, son los principales productores de vitaminas del complejo B y de proteína de alto valor biológico<sup>(2)</sup>.

También, las bacterias cecales se han relacionado con la salud del animal al evitar la proliferación de bacterias patógenas como *E. coli* y *Clostridium*, en la mucosa del ciego<sup>(3)</sup>.

Debido a que el ciego se sitúa en un punto posterior a los sitios de absorción de nutrientes, los metabolitos generados en esta cámara fermentativa no pueden ser asimilados y se desechan a través del recto. Ante tal situación, el conejo ha desarrollado el proceso de cecotrofia, mediante el cual consume heces blandas o

a Recibido el 17 de julio de 2001 y aceptado para su publicación el 15 de noviembre de 2001.

b Programa de Ganadería, Colegio de Postgraduados, Campus Tabasco, Periférico Carlos A. Molina S/N, Km 3.5 Carretera Cárdenas-Huimanguillo, H. Cárdena, Tabasco. C.P. 86500, Tel. 01 937 2 23 86, Fax 01 937 2 22 97. [sanchezd@colpos.colpos.mx](mailto:sanchezd@colpos.colpos.mx). Correspondencia y solicitud de separatas al primer autor.

cecotrofos, los cuales representan hasta el 18 % de la materia seca ingerida<sup>(4)</sup>.

Dada la importancia que tiene la actividad microbiana del ciego, en la interpretación de estudios de nutrición relacionados con la actividad digestiva y eficiencia productiva del conejo, se han ideado diferentes métodos para interpretar los procesos que se desarrollan durante la fermentación cecal, sin recurrir a la técnica de sacrificio. Así, por ejemplo, se han implementado técnicas de canulación en el tracto digestivo del conejo; sin embargo, éstas tienden a interferir con los procesos digestivos normales del animal<sup>(5)</sup>. También se han propuesto otras técnicas basadas en la colección de cecotrofos, mediante las cuales se ha encontrado un alto grado de correlación entre la actividad enzimática fibrolítica de las bacterias presentes en los cecotrofos y en el contenido cecal<sup>(1)</sup>. Resultados similares han sido mencionados por Marounek *et al.*<sup>(6)</sup> quienes estimaron la actividad microbiana cecal a través del análisis de cecotrofos. Sin embargo, no se ha considerado que el ciego del conejo, presenta un apéndice (apéndice cecal o apéndice vermiforme), el cual tiene características únicas<sup>(7)</sup>, por lo que su composición y actividad microbiana pueden ser diferentes. También se ha sugerido, que las heces duras pudieran utilizarse para estimar la concentración de bacterias totales y celulolíticas del ciego, con la ventaja de que no se requiere del sacrificio de los animales; sin embargo, se desconoce con precisión si la composición de bacterias celulolíticas es similar. Por lo anterior, el presente estudio tuvo como objetivo determinar si la concentración de bacterias totales, bacterias celulolíticas, pH,

contenido de materia seca y digestibilidad *in vitro* de la MS entre contenido cecal, contenido del apéndice cecal y contenido del colon, son similares, lo que en su caso, permitirá una nueva alternativa para la realización de pruebas que permitan el entendimiento de los sucesos que toman lugar en el ciego, sin llegar al sacrificio de los animales.

El experimento se desarrolló en los laboratorios de nutrición y microbiología aplicada a producción animal, perteneciente al Programa de Ganadería del Colegio de Postgraduados. Se utilizaron 10 conejos de la raza Nueva Zelanda, los cuales fueron alimentados con una dieta comercial (12 % de humedad, 15.5 % de PC, 15 % de fibra cruda, 46.5 % de extracto libre de nitrógeno, 1 % de Ca y 0.55 % de P). Los animales se sacrificaron sin previo ayuno, al final del período de engorda (70 días de edad) y se les extrajo el tracto digestivo con el propósito de coleccionar en forma aséptica, muestras del apéndice cecal, ciego (treceava asa cecal) y colon (sección distal). Considerando el poco contenido de material sólido del apéndice cecal, se elaboraron muestras compuestas (procedentes de dos animales) de cada porción del tracto digestivo mencionado, obteniéndose un total de cinco repeticiones de cada sección. Una vez obtenida la muestra se depositó en frascos de plástico estériles de 40 g, de donde se tomó la cantidad correspondiente para cada determinación.

Se pesaron 0.5 g de cada muestra y se diluyeron en 5 ml de agua destilada, se homogeneizó el material con ayuda de un mortero, se agitaron las muestras por 10

## DIGESTIBILIDAD Y BACTERIAS TOTALES Y CELULOLÍTICAS DEL CONEJO

min y se determinó el pH con un potenciómetro marca Orion (modelo SA 210).

Se pesó 1 g de material fresco colectado en cada muestra y se colocó en una estufa a 65 °C durante 24 h para determinar el contenido de materia seca <sup>(8)</sup>.

Se estimó la digestibilidad *in vitro* de la materia seca (DIVMS) utilizando alfalfa como sustrato, y como fuente de inóculo: contenido del apéndice cecal, de la treceava asa del ciego y de la porción distal del colon. Para evaluar la degradación microbiana de la MS se utilizó la primera etapa de la digestibilidad *in vitro* propuesta por Tilley y Terry<sup>(9)</sup>, la cual se modificó para asegurar condiciones anaerobias y esterilidad del sustrato. Se depositaron 0.2 g (en base seca) de alfalfa, en tubos de vidrio (18 x 150 mm) con tapón de hule, para posteriormente esterilizarlos a 121 °C y 15 lb de presión durante 15 min. Una vez esterilizados los tubos, se les agregaron 16 ml de saliva artificial de McDougall (composición por litro: 9.8 g de NaHCO<sub>3</sub>, 3.71 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> anhidro, 0.57 g de KCl, 0.47 g de NaCl, 0.12 g de MgSO<sub>4</sub> 7 H<sub>2</sub>O y 0.04 g de CaCl<sub>2</sub>). La adición de saliva se realizó bajo corriente de bióxido de carbono para conservar las condiciones anaerobias. Se añadieron 4 ml de inóculo a los tubos, para esto, cada fuente de inóculo se diluyó a razón de 5 g de muestra en 15 ml de agua destilada estéril. Cada muestra se inoculó por triplicado y los tubos inoculados se incubaron a 38 °C por 72 h. Posteriormente, los residuos de la digestión se filtraron a través de papel Whatman No. 41 y fueron secados a 65 °C para estimar la digestibilidad.

Se elaboró un medio de cultivo anaerobio basado en glucosa, celobiosa, almidón y fluido ruminal (GCA-FR). El medio GCA-FR (Cuadro 1) se preparó de acuerdo a la metodología descrita por Cobos y Yokoyama<sup>(10)</sup>. Se depositaron 4.5 ml de medio GCA-FR en tubos de cultivo (13 x 100 mm) estériles, bajo flujo de CO<sub>2</sub>. De las diferentes muestras se pesaron 0.5 g y se utilizaron como inóculo para realizar la primera dilución (10<sup>-1</sup>); las diluciones fueron de 10<sup>-1</sup> a 10<sup>-12</sup>. Cada dilución tuvo cinco repeticiones. Una vez inoculados los medios, se incubaron a 38 °C por 72 h. Posteriormente se tomaron lecturas de crecimiento, tomando como positivos aquéllos que presentaban turbidez. Para estimar la concentración de bacterias se utilizó la técnica del número más probable<sup>(11)</sup>.

Se elaboró un medio anaerobio para bacterias celulolíticas (Cuadro 1), en el cual la única fuente de carbohidratos era celulosa (Whatman No. 1), el cual se colocó en cada tubo de vidrio (13 x 100 mm). Se siguió básicamente el mismo procedimiento que se describe para bacterias totales, con la variante de que las diluciones se redujeron (10<sup>-1</sup> a 10<sup>-10</sup>) y el tiempo de incubación fue por 10 días a 38 °C. Además, las lecturas de crecimiento se establecieron con base a la degradación del papel incluido en cada tubo. La concentración de bacterias se estimó mediante la técnica del número más probable <sup>(11)</sup>.

Los datos obtenidos de la DIVMS, pH y MS se analizaron en un diseño completamente al azar, asignando como tratamientos a las tres fuentes de inóculo (apéndice cecal y treceava asa cecal, y

**Cuadro 1. Medios anaerobios utilizados para el cultivo de bacterias totales (BT) y celulolíticas (BC) del apéndice cecal, ciego y colon de conejos en finalización**

	Medio para BT	Medio para BC
	(Cantidad en 100 ml)	
Extracto de levadura, g	0.1	0.1
Tripticasa-peptona, g	0.2	0.2
Glucosa, mg	60.0	—
Celobiosa, mg	60.0	—
Almidón, mg	60.0	—
Solución mineral I <sup>a</sup> , ml	5.0	5.0
Solución mineral II <sup>b</sup> , ml	5.0	5.0
Líquido ruminal clarificado <sup>c</sup> , ml	30.0	30.0
Solución de cisteína-sulfido <sup>d</sup> , ml	2.0	2.0
Solución de carbonato de sodio al 8%, ml	5.0	5.0
Agua destilada, ml	52.6	52.6
Solución de rezarsurina al 0.1%, ml	0.1	0.1
Papel Whatman No. 541	—	Una tira

<sup>a</sup> Contiene por 1000 ml: K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 6.0 g

<sup>b</sup> Contiene por 1000 ml: KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 6.0 g; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 6 g; NaCl, 12 g; MgSO<sub>4</sub>, 2.45 g; y CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 1.6 g.

<sup>c</sup> Previamente filtrado a través de gasa y centrifugado a 23,000xg x 20 min a 8 °C y esterilizado a 1.054 kg cm<sup>2</sup> por 15 min.

<sup>d</sup> Se disolvieron 2.5 g de L-cisteína- HCl·H<sub>2</sub>O en 50 ml de H<sub>2</sub>O destilada, ajustando el pH de la mezcla a 10 con NaOH (2N); se agregaron 2.5 g de Na<sub>2</sub>S·9H<sub>2</sub>O y se aforó a 200 ml con H<sub>2</sub>O destilada; la solución estuvo en ebullición por 5 min con flujo de N<sub>2</sub> y se depositó en tubos con tapón de hule.

Cobos y Yokoyama<sup>(10)</sup>.

colon distal), utilizando cinco repeticiones por tratamiento. Las medias de tratamientos se compararon mediante la prueba de Tukey<sup>(12)</sup>. Para la estimación de la concentración de bacterias celulolíticas y totales se obtuvieron estimadores y rangos de confianza de acuerdo a la metodología propuesta por Harrigan y McCance<sup>(11)</sup>.

El valor determinado de pH fue superior ( $P < 0.05$ , Cuadro 2) en el contenido del apéndice cecal, mientras que no se observaron diferencias entre el pH de la treceava asa cecal y el del colon distal. El

contenido de MS fue similar en los dos sitios analizados del ciego, sin embargo, fue superior ( $P < 0.05$ ) en colon distal o heces duras. Los resultados de la DIVMS mostraron mayor ( $P < 0.05$ ) degradabilidad microbiana con el uso de los inóculos procedentes del apéndice cecal, no observándose diferencias entre el resto de las fuentes de inóculo.

La población total de bacterias fue similar en la región del apéndice cecal y el colon, pero inferior al nivel de la treceava asa cecal (Cuadro 3), sin embargo, los rangos

DIGESTIBILIDAD Y BACTERIAS TOTALES Y CELULOLÍTICAS DEL CONEJO

de confianza para las tres estimaciones se encuentran relacionados. Por el contrario, la concentración de bacterias celulolíticas disminuyó conforme la digesta abandona el ciego y se dirige hacia el colon.

Los valores de pH obtenidos en este experimento son similares a los indicados en la literatura<sup>(4)</sup> para la región del ciego y colon (6.0 y 6.6, respectivamente). Raharjo *et al.*<sup>(13)</sup> demostraron la importancia del proceso de cecotrofia en la estabilidad del pH cecal; al parecer la cecotrofia permite el desarrollo de una población microbiana estable, y en especial de los productos de

la fermentación, como los ácidos grasos volátiles, los cuales contribuyen a mantener un pH ligeramente ácido. No obstante, el pH determinado en el apéndice cecal, resultó ligeramente alcalino, y confirma las expectativas de que la actividad microbiana es diferente a la prevaleciente en el ciego en su porción media (treceava asa). El pH determinado en el apéndice cecal, se debe en parte a que en esta sección del ciego, se secreta un fluido rico en iones bicarbonato <sup>(14)</sup>.

Las diferencias observadas en el contenido de materia seca entre el contenido cecal

**Cuadro 2. Digestibilidad *in vitro* de la materia seca (DIVMS), pH y contenido de materia seca (MS) en muestras del apéndice cecal, ciego y colon distal de conejos al final de la engorda**

	Apéndice cecal	Ciego	Colon distal	CV
pH	7.36 <sup>a</sup>	6.33 <sup>b</sup>	6.33 <sup>b</sup>	1.20
Contenido de MS, %	27.59 <sup>b</sup>	25.07 <sup>b</sup>	32.87 <sup>a</sup>	4.62
DIVMS, %	56.04 <sup>a</sup>	38.77 <sup>b</sup>	33.47 <sup>b</sup>	14.47

a,b Literales distintas en la misma hilera indican diferencias entre medias ( $P < 0.05$ ).  
CV= Coeficiente de variación.

**Cuadro 3. Concentración de bacterias celulolíticas y totales en el apéndice cecal, ciego y colon distal de conejos en finalización, por gramo de materia fresca**

	Apéndice cecal	Treceava asa cecal	Colon distal
Bacterias totales	$1.1 \times 10^{12}$	$3.2 \times 10^{10}$	$1.6 \times 10^{12}$
Intervalo* de:	$2.35 \times 10^{11}$	$9.69 \times 10^9$	$4.84 \times 10^{11}$
a:	$5.14 \times 10^{12}$	$1.05 \times 10^{11}$	$5.28 \times 10^{12}$
Bacterias celulolíticas	$9.0 \times 10^7$	$4.0 \times 10^4$	$4.0 \times 10^2$
Intervalo de:	$1.92 \times 10^7$	$1.2 \times 10^4$	$1.2 \times 10^2$
a:	$4.21 \times 10^8$	$1.3 \times 10^5$	$1.3 \times 10^3$

\* Intervalos de confianza para valores estimados (Harrigan y McCance<sup>(11)</sup>).

(apéndice y treceava asa) y el del colon se explica por el mecanismo de absorción de agua en la región proximal del colon. Sin embargo, estos datos son inferiores a los observados por Carbaño *et al.*<sup>(15)</sup> para contenido cecal y heces duras (38 a 40 % y 60 a 62 % de MS, respectivamente); asimismo, en otro trabajo se menciona un contenido de 52.7 % de MS en heces duras<sup>(7)</sup>. Dada la variación de resultados, es importante considerar el efecto inherente de la dieta consumida por el animal, la cual puede estar afectando el contenido de MS de las diferentes secciones.

La DIVMS mostró superioridad con la fuente de inóculo de apéndice cecal, con relación a la porción media del ciego y colon. Fernández *et al.*<sup>(16)</sup> obtuvieron resultados similares (49.7 % de DIVMS) utilizando contenido cecal como fuente de inóculo. Sin embargo, es importante señalar que en estudios relacionados no se ha considerado la posible diferencia entre el contenido del apéndice cecal y del ciego en su totalidad; de hecho, en la mayoría de los reportes se omite la información referente al sitio que se utilizó para colectar el contenido cecal. Los resultados indican sin lugar a duda, que las bacterias presentes en el apéndice cecal, son más eficientes para la degradación de material fibroso o alto en carbohidratos estructurales.

En la literatura<sup>(17)</sup> se mencionan concentraciones de bacterias totales y celulolíticas similares a las observadas en este trabajo ( $2.1 \times 10^{11}$  y  $3.7 \times 10^6$  bacterias  $g^{-1}$  de contenido cecal, respectivamente), y una disminución significativa en heces duras, las cuales en el presente experimento están representadas por el contenido del colon

distal. Gidenne<sup>(18)</sup> encontró que la concentración total de bacterias varía de  $10^{10}$  a  $10^{11} g^{-1}$  de contenido cecal; además, señala que la concentración de bacterias celulolíticas a las nueve semanas de edad es de  $10^4 g^{-1}$  de contenido cecal. Los cambios observados en la concentración de bacterias pueden estar relacionados con las variaciones químicas en su medio, dentro de las cuales, la más importante parece ser el pH, especialmente para bacterias celulolíticas. La mayor concentración de bacterias celulolíticas estimada en el apéndice cecal, está acorde con los resultados de DIVMS, indicando que estas bacterias son responsables de la mayor actividad fermentativa determinada en el apéndice cecal con respecto a las otras secciones estudiadas.

De acuerdo a las condiciones experimentales establecidas para este trabajo, se puede concluir que existieron variaciones en la concentración de bacterias celulolíticas en las diferentes regiones del ciego y colon analizadas, la variación en pH podría ser una de las causas más relacionadas con estos cambios. Por tal razón, el uso de heces duras no es un buen indicador de la concentración y actividad bacteriana prevaleciente en el ciego. Quizá lo más conveniente sea determinarlas en el apéndice cecal y no en todo el ciego, es en donde la concentración de bacterias es superior, lo que se ve reflejado en que sea en esta región del ciego en donde se obtuvo la mayor DIVMS de la alfalfa. Considerando que a la fecha se desconoce el sitio exacto de la formación de las heces blandas, los datos obtenidos permiten inferir que el apéndice cecal es la fuente inicial de las bacterias que dan origen a

las heces blandas o cecotrofos. Por lo que se recomienda que en estudios sobre aspectos de microbiología cecal del conejo, se incluya el análisis de los efectos producidos por los microorganismos presentes en el apéndice cecal. No obstante, se recomienda desarrollar este tipo de investigaciones con conejos de diferentes razas y edades.

concentration was not different between CA and DCS, but lower in TCS ( $1.1 \times 10^{12}$ ,  $1.6 \times 10^{12}$  and  $3.2 \times 10^{10}$ ). Cellulytic bacterial concentration was remarkable highest ( $P < 0.05$ ) in CA than in TCS and DCS ( $9 \times 10^7$ ,  $4 \times 10^4$  and  $4 \times 10^2$ ). It is concluded that DCS is not representative of cecal-bacterial activity and concentration and IVDMD in CA; it is suggested that studies related with factors affecting cecal microorganisms must consider cecal appendix samples.

**KEY WORDS.** Cecal content, Celulolytic bacteria, Cecotrophy, Cecum digestibility, *In vitro* dry mater digestibility.

### AGRADECIMIENTOS

Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por su apoyo financiero al proyecto CONACYT No. 26138B, sobre importancia de los microorganismos cecales en la salud y producción comercial del conejo, del cual forma parte el presente documento.

### **IN VITRO DIGESTIBILITY, CELULOLYTIC AND TOTAL BACTERIAL POPULATIONS IN RABBIT CECAL APPENDIX, CAECUM, AND COLON CONTENT**

#### **ABSTRACT**

**Hernández SD, Cobos PMA. Téc Pecu Méx 2001;39(3)229-236. With the objective of comparing microbial activity in different sections of caecum and colon, pH, *in vitro* DM digestibility, total and cellulolytic bacterial concentrations were determined. Ten New Zeland White rabbits with average age of 70 days were used. Samples were obtained from: 1) cecal appendix (CA), 2) thirteenth cecal segment (TCS), and 3) distal colon section (DCS). The pH of CA was highest ( $P < 0.05$ ) than in TCS and DCS (7.3, 6.3 and 6.3). IVDMD was highest ( $P < 0.05$ ) in AC than in TCS and DCS (56.0, 38.7 and 33.4 %). Total bacterial**

### **LITERATURA CITADA**

1. Jehl NT, Gidenne T, Le Roux JF. Measurement of the bacterial fibrolytic activity in the caecum and in the soft faeces of the rabbit. 6<sup>th</sup> World rabbit congress. Toulouse, France. 1996:199-203.
2. Balcells JJ, Ganuza JM, Pérez JF, Martín-Orúe SM, González RM. Urinary excretion of purine derivatives as an index of microbial-nitrogen intake in growing rabbits. *Brit J Nutr* 1998;(79):373-380.
3. Corner DE, Nissbet DJ, Holister AG, Beeier RC, Scaanlan CM, Haagis BM, De Loach DM. Resistance against Salmonella enteritis cecal colonization of cecal bacteria culture. *Poultry Sci* 1994;(73):648-652.
4. Bellier TR, Gidenne 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.
5. Carbaño R, Merino JM. Effect of ileal cannulation on feed intake, soft and hard feces excretion throughout the day in rabbits. 6<sup>th</sup> World congress. Toulouse, France. 1996:121-125.
6. Marounek M, Vovk SJ, Skrivanova V. Distribution of activity of hydrolytic enzymes in the digestive tract of rabbits. *Br J Nutr* 1995;(73):463-471.
7. Lebas F, Coudert P, De Rochambeau H, Thébault RG. The rabbit: husbandry, health and production. 1<sup>st</sup> ed. Rome, Italy. FAO. Animal production and health series. 1997.
8. AOAC. Official methods of analysis. 14<sup>th</sup> ed. Washington, D.C. USA. Association of Official Analytical Chemists. 1984.
9. Tilley JMA, Terry RA. A two-stage technique for the *in vitro* digestion of forage crops. *J Brit Grass Soc* 1963;(18):104-113.

10. Cobos PM, Yokoyama MT. *Clostridium paraputrificum* ver. *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 held at ILRI, Addis Ababa, Ethiopia. 1995:151-162.
11. Harrigan WF, Mc Cance ME. Métodos de laboratorio en microbiología de alimentos y productos lácteos. 1a ed. en español. León, España: Academia; 1990.
12. Steel RGD, Torrie JH. Bioestadística: Principios y procedimientos. 2a ed. México: Mc Graw Hill; 1988.
13. Raharjo YC, Cheeke PR, Patton NM. Effect of coprophagy on the nutrient digestibility of alfalfa and black locust leaves. *J Appl Rabbit Res* 1990;(13):56-64.
14. Williams JA, Griffen WO, Sharma A, Waangenstein OH. Composition and source of secretion from lymphoid aggregations in the rabbit gut. *Br J Exp Pathol* 1961;(45):153-161.
15. Carbaño R, Fraga MJ, De Blas C. Effect of protein source in fibrous diets on performance and digestive parameters of fattening rabbits. *J Appl Rabbit Res* 1989;(12):201-210.
16. Fernández CJ, Cervera C, Blas E. Un nuevo método *in vitro* para el estudio de la digestión en el conejo. Asociación Española de Cunicultura. XVIII Symposium de Cunicultura. Granoullers, España. 1993:43-45.
17. Straw TE. Bacteria of the rabbit gut and their role on the health of the rabbit. *J Appl Rabbit Res* 1988;(9):25-32.
18. Gidenne T. Nutritional and ontogenic factors affecting rabbit caecum-colic digestive physiology. 6<sup>th</sup> World rabbit congress. Toulouse, France. 1996:13-28.