

Desarrollo de un inóculo con diferentes sustratos mediante fermentación sólida sumergida

D. Díaz-Plascencia^{*1}, C. Rodríguez-Muela¹, P. Mancillas-Flores¹, C. Angulo¹, F. Salvador¹, O. Ruíz¹, H. O. Rubio,¹ S. Mena², A. Elías³.

Facultad de Zootecnia y Ecología. Universidad Autónoma de Chihuahua, Chihuahua, México. Periférico Francisco R. Almada km 1. Chihuahua, México. Fax (614) 434-0303.

1. Facultad de Zootecnia y Ecología. Universidad Autónoma de Chihuahua, México. danyboy2878@hotmail.com, crmuela@gmail.com
2. Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Universidad de Guadalajara, Jalisco, México. smena@cucba.udg.mx
3. Instituto de Ciencia Animal, La Habana, Cuba. aelias@ica.cu

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue desarrollar un inóculo con cuatro sustratos diferentes, mismos que se evaluaron con tres levaduras comerciales A, B y C del género *Saccharomyces cerevisiae* y una cepa de levadura de manzana, D; del género *Kluyveromyces Lactis*, mediante su desarrollo en condiciones aeróbicas utilizando oxigenadores en cada medio de cultivo líquido. Durante el periodo de fermentación de las muestras, fueron tomadas 3 muestras por tratamiento en diferente tiempos (0, 2, 4, 8, 16, 32, 64 y 128 h). Durante los cuales se determinó el pH, temperatura, Azúcares solubles, conteos de levaduras y nitrógeno amoniacal. El diseño estadístico utilizado fue diseño al azar con arreglo factorial 4x4 en parcelas utilizando el procedimiento (Proc Mixed) del programa (SAS, 2004). El pH mostro un comportamiento similar para todos los sustratos con efecto cuadrático ($P < 0.01$) durante el proceso; así también, mostro una interacción ($P < 0.01$) de tratamiento por el efecto cuadrático de la hora, indicando que ese incremento fue distinto entre tratamientos. *Temperatura*, se incremento ($P < 0.01$) de la h0 a la h128 en todos los tratamientos, posteriormente disminuyo ($P < 0.01$) para mantenerse cerca de la temperatura de incubación a partir de la h8. *Nitrógeno amoniacal*, se observo diferencia ($P < 0.01$) entre tratamientos y levaduras. *Conteo de Levaduras*, Se observo un efecto ($P < 0.01$) de interacción de tratamiento con levaduras y tiempo, esto indica que hubo diferencias en la cantidad de levaduras y su comportamiento fue fluctuante en los distintos sustratos con

las diferentes levaduras A, B, C y D. La concentración más alta de levaduras se observó en el t2 y t3 siendo así de 8.6×10^8 cel*ml/L en el t1 en la h2 con la levadura A, para el t2 de 4.4×10^8 cel*ml/L en la h32 con la levadura B, para el t3 5.6×10^8 cel*ml/L en la h128 con la levadura C y para el t4 1.7×10^9 cel*ml/L en la h128 con la levadura D, siendo esta la mejor producción de levaduras. En este trabajo, la población de levaduras se incrementó en mayor proporción en los sustratos de melaza y de manzana con las levaduras A y D.

Palabras Clave: Levaduras, Fermentación, Manzana, pH.

ABSTRACT

The aim of this study was to develop an inoculum with four different substrates, these were evaluated with three commercial yeasts A, B and C of the genus *Saccharomyces cerevisiae* yeast and apple know, D, of the genus *Kluyveromyces lactis*, through its development aerobic conditions using oxygen in each liquid culture medium. During the fermentation 3 samples, were taken for treatment at different times (0, 2, 4, 8, 16, 32, 64 and 128 h), pH, temperature, carbohydrates, yeast counts and ammonia nitrogen were determined. A randomized statistical design was used with 4x4 factorial arrangements in plots using the procedure (Proc Mixed) program (SAS, 2004). The pH showed a similar pattern for all substrates with quadratic effect ($P < 0.01$), and also showed an interaction ($P < 0.01$) treatment by the quadratic effect of time, indicating that this increase was different between treatments. Temperature was increased ($P < 0.01$) of the h128 h0 in all treatments, then declined ($P < 0.01$) to stay close to the incubation temperature from h8. Ammonia nitrogen, difference was observed ($P < 0.01$) between treatments and yeast. Yeast Count, an effect was observed ($P < 0.01$) treatment interaction with yeast and time, this indicates that there were differences in the amount of yeast and their behavior was fluctuating in different substrates with different yeasts A, B, C and D. The highest concentration of yeasts was observed in t2 and t3 being so cel $8.6 \times 10^8 \times \text{ml} / \text{L}$ at T1 in the yeast h2 A, for t2 cel $4.4 \times 10^8 \text{ ml} / \text{L}$ in the H32 with yeast B, for cel t3 $5.6 \times 10^8 \text{ ml} / \text{L}$ in the h128 with the yeast C and the cel t4 $1.7 \times 10^9 \text{ ml} / \text{L}$ in the h128 with the yeast D, being the best production of yeast. In this trial, the yeast population increased in greater proportion in the substrates of molasses and apple with the yeasts A and D.

INTRODUCCIÓN

La biotecnología moderna está compuesta por una variedad de técnicas derivadas de la investigación en biología celular y molecular, las cuales pueden ser utilizadas en cualquier industria que utilice microorganismos o células vegetales y animales. Levadura es un nombre genérico que agrupa a una variedad de organismos unicelulares, incluyendo especies patógenas para plantas y animales, y especies no solamente inocuas sino de gran utilidad (González y Valenzuela, 2003), *Saccharomyces cerevisiae* es una levadura que constituye el grupo de microorganismos más íntimamente asociado al progreso y bienestar de la humanidad; su nombre deriva del vocablo Saccharo (azúcar), myces (hongo) y cerevisiae (cerveza), (Bui y Galzy, 1990; Hernández, 1999; Leveau y Bouix, 2000; López-Brea y Domingo; 2007).

El proceso de producción de proteína unicelular es una vía biotecnológica adecuada para el aprovechamiento de desechos industriales ricos en carbohidratos. El principal factor limitante en la generación de proteína unicelular es el alto costo de las fuentes de carbono, por lo que el uso de subproductos es ideal (Duran, 1989; Rodríguez-Muela *et al.*, 2006; Becerra *et al.*, 2008).

El emplear manzana de desecho o pomasa de manzana que es el residuo generado en el proceso de extracción de jugo de manzana y representa entre 15 y 20% de la fruta procesada (Becerra, 2006; Rodríguez-Muela *et al.*, 2010). Así como emplear el suero de leche en este proceso permitiría darle valor agregado, al obtenerse proteína de calidad para la alimentación animal, y a la vez disminuir su demanda biológica de oxígeno (DBO), (Ghaly y Kamal, 2007). *Manzarina* es un producto fermentado obtenido a partir de manzana o de subproductos de manzana (*Malus domestica*), este producto fermentado tiene un valor proteico mayor que el que tienen los productos de los que se obtiene bagazo de manzana o manzana de desecho, (Díaz, 2006; Rodríguez-Muela *et al.*, 2007; Becerra *et al.*, 2008; Rodríguez, 2009; Rodríguez-Muela *et al.*, 2010).

El objetivo de este trabajo fue: desarrollar un inóculo con cuatro sustratos diferentes, mismos que se evaluaron con tres levaduras comerciales A, B y C del género *Saccharomyces cerevisiae* y una cepa de levadura de manzana, D; del género *Kluyveromyces Lactis*, mediante su desarrollo en condiciones aeróbicas utilizando oxigenadores en cada medio de cultivo líquido. Estos resultados ayudaran en el desarrollo de un inóculo de levaduras de gran utilidad en la nutrición y alimentación animal, al aportar de una manera eficiente levaduras efectivas benéficas activas (LEBAS), siendo una vía biotecnológica adecuada para el aprovechamiento de desechos industriales ricos en carbohidratos, por lo que aportara grandes

beneficios en la alimentación de los animales al mejorar la respuesta productiva de los animales a menor costo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Tratamientos y diseño experimental. El presente estudio se desarrollo en el laboratorio de nutrición animal de la Facultad de Zootecnia y Ecología de la Universidad Autónoma de Chihuahua, México; la cual se localizan el Kilómetro 1 del periférico Francisco R. Almada, a una altitud de 1595 msnm.

Para la realización de este estudio se prepararon cuatro sustratos, tratamientos (t) para evaluar la fermentación en estado sólido sumergido. T1) 20 gr de Extracto de malta (EM) más 1 g de levadura, T2) 300 ml de Manzana molida (MA) más 1 g de levadura, T3) 100 ml de Melaza de caña (ME) más 1 g de levadura, T4) 500 ml de Suero de leche (SL) más 1 g de levadura. Todos los tratamientos contaron con la adición de 1% de Urea, 0.2% de sulfato de amonio, 0.5% de premezcla de vitaminas y minerales traza y se aforo a 1,000 ml con agua destilada todos los matraces. Sus combinaciones fueron evaluadas en 12 Matraces de vidrio de 1,000 ml, cada tratamiento consto de 3 repeticiones consistentes en matraces de vidrio de 1,000 ml, a cada matraz se le adapto un oxigenador con la finalidad de inyectar el oxigeno necesario para la producción de las levaduras ya que es una fermentación aeróbica, solida sumergida. Durante el periodo de fermentación de las muestras, fueron tomadas 3 muestras por tratamiento en diferente tiempos (0, 2, 4, 8, 16, 32, 64 y 128 h).

Se determinó el *pH* midiéndolo con un potenciómetro digital de una precisión de ± 0.1 unidades, se tomo como base la metodología descrita por Rodríguez *et al.* (2001a). *Temperatura*, se midió directamente con la ayuda de un termómetro digital de una precisión de ± 0.1 . *Carbohidratos*, se tomo la lectura con la ayuda de un Refractómetro HI 96801 digital de una precisión de ± 0.2 . Para este análisis se utilizo 2 gotas de muestras para su lectura y se utilizo 3 gotas de agua destilada para su calibración. *Conteo de levaduras (CL)*. Para este análisis se tomó como base, la metodología descrita por Elías y Lezcano (1993); Díaz, (2006); Rodríguez *et al.*, (2001a).

Nitrógeno amoniacal (N-NH₃). De las muestras líquidas obtenidas del la h0 a la h128 se tomaron 30 ml de la solución, se colocaron en recipientes de plástico, se agregaron dos gotas de ácido ortofosfórico y se congelaron (-5°C) para su conservación hasta el momento de la determinación de N-NH₃ al momento de la determinación, las muestras se descongelaron a temperatura de refrigeración, (4°C) la concentración de N-NH₃ de las muestras líquidas se determinó por colorimetría según el procedimiento de Taylor (1996).

El diseño para este experimento se hizo con un arreglo completamente aleatorio, considerando efectos fijos los niveles sustrato y levadura; el efecto aleatorio del matraz dentro de cada tratamiento (parcela), el efecto de tiempo, el efecto de las interacciones de sustrato, levadura y tiempo, para el último el efecto de la interacción triple de factor tiempo, factor sustrato y factor levadura; los datos se evaluaron con el procedimiento (Proc Mixed) del programa (SAS, 2004), para un diseño al azar con arreglo factorial 4x4.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

La variable *pH*, mostro un comportamiento similar para todos los sustratos con efecto cuadrático ($P < 0.01$) durante el proceso; así también, mostro una interacción ($P < 0.01$) de tratamiento por el efecto cuadrático de la hora, indicando que ese incremento fue distinto entre tratamientos. Según los valores estimados, de la h 0 a la h 128 de FSS, el pH del sustrato de t1 puede incrementarse de un valor de 3.01 ± 0.95 (h8) hasta un 5.86 ± 0.95 (h128). El pH del sustrato de t2 puede incrementarse desde 3.06 ± 0.95 (h4) hasta 5.59 ± 0.95 (h64). En el sustrato t3 puede incrementarse desde 5.37 ± 0.95 (h16) hasta 5.81 ± 0.95 (h8) y en el sustrato t4 puede ir desde 4.48 ± 0.95 (h16) hasta 6.60 ± 0.95 (h2). El incremento de pH está relacionado directamente con la producción de NH_3 y con una menor producción de ácidos orgánicos (Elías *et al.*, 1990; Rodríguez *et al.*, 2001b). El incremento de pH también está relacionado con el incremento del contenido total de aminoácidos y productos alcalinizantes, Becerra *et al.*, (2008). Díaz-Plascencia *et al.*, (2010) en el desarrollo de un inóculo para raciones utilizando manzana molida y melaza como sustratos en un medio líquido, observaron que el pH incremento después de las 24h de fermentación con valores de 4.00 a 5.50.

Temperatura, Esta variable tuvo un comportamiento ($P < 0.01$), el efecto de la interacción del sustrato tratamiento, por el efecto de levadura durante la FSS (hora) fue significativo ($P < 0.01$). La temperatura se incremento ($P < 0.01$) de la h0 a la h128 en todos los tratamientos, posteriormente disminuyo ($P < 0.01$) para mantenerse cerca de la temperatura de incubación a partir de la h8. Los valores estimados de las medias en la h0 de la FSS fueron 26.00 ± 0.14 en t1, 25.60 ± 0.14 en t2, 19.23 ± 0.14 en t3 y 23.90 ± 0.14 . El calor acumulado en sustratos fermentados es el resultado de la actividad metabólica de los microorganismos; la temperatura también puede ser afectada por la conductividad del material biológico fermentado (Ibarra *et al.*, 2002; Rodríguez-Muela *et al.*, 2007; Becerra *et al.* 2008). En el proceso de obtención de la Saccharina que es (similar al de manjarina), la Temperatura interna tiende a mantenerse constante a pesar de los

cambios de Temperatura ambiental; aun así, esta puede influenciar ligeramente la Temperatura del sustrato (Ruiz *et al.*, 2002; Rodríguez, 2009).

Azúcares Solubles, En la medición de azúcares solubles, se observó cómo se presenta la disminución de los azúcares en los sustratos con las diferentes levaduras mientras avanza la fermentación, este comportamiento es normal debido a que conforme avanza el tiempo, se incrementa el número de células lo cual provoca la disminución de los azúcares.

Nitrógeno Amoniacal, Esta variable se incrementó ($P < 0.01$), se observó diferencia ($P < 0.01$) entre tratamientos y levaduras. En este trabajo, de la h0 a la h128 de la FSS, la concentración de NH_3 en los sustratos se incrementó ($P < 0.01$) de 0.10 ± 0.01 a 0.78 ± 0.01 mM/ml en el t1 con la levadura A, para el t2 de 0.02 ± 0.01 a 0.89 ± 0.01 mM/ml con la levadura B, para el t3 de 0.00 ± 0.01 a 0.81 ± 0.01 mM/ml con la levadura C y para el t4 de 0.00 ± 0.01 a 0.88 ± 0.01 mM/ml con la levadura D, indicando actividad de los microorganismos ureolíticos. La urea añadida a los sustratos en procesos de FSS, es transformada a NH_3 por efecto de especies microbianas ureolíticas (Valiño *et al.*, 2002; Calderón *et al.*, 2005; Rodríguez, 2009), si el sustrato tiene un aporte energético bajo, los microorganismos no pueden incorporarlo en la formación de aminoácidos para su crecimiento o lo hacen en una proporción baja. Cuando se tiene un pH bajo, el NH_3 producido es retenido en el sustrato, Díaz-Plascencia *et al.*, (2010). El NH_3 también puede producirse por actividad desaminativa (Calderón *et al.*, 2005). El NH_3 como compuesto puede ser utilizado por ciertos microorganismos que no hidrolizan la urea agregada, como resultado de esto, la cantidad de algunos microorganismos presentes en los sustratos fermentados se puede incrementar.

Conteo de Levaduras, Se observó un efecto ($P < 0.01$) de interacción de tratamiento con levaduras y tiempo, esto indica que hubo diferencias en la cantidad de levaduras y su comportamiento fue fluctuante en los distintos sustratos con las diferentes levaduras A, B, C y D). La concentración más alta de levaduras se observó en el t2 y t3 siendo así de 8.6×10^8 cel*ml/L en el t1 en la h2 con la levadura A, para el t2 de 4.4×10^8 cel*ml/L en la h32 con la levadura B, para el t3 5.6×10^8 cel*ml/L en la h128 con la levadura C y para el t4 1.7×10^9 cel*ml/L en la h128 con la levadura D. (figura 1) En este caso las levaduras son más favorecidas en el NNP fue aportado por la urea y el sulfato de amonio (Elías *et al.*, 1990; Rodríguez *et al.*, 2001b; Becerra *et al.*, 2008).

Díaz-Plascencia *et al.*, (2010) en otro estudio similar utilizaron la técnica fermentación sólida sumergida (FSS) y reportaron la mayor producción de levaduras de 2.2×10^9 cel*ml/L en la hora 96 al utilizar la melaza como

medio de sustrato y la levadura *Kluyveromices Lactis* obtenida de la manzana (*Malus domestica*) utilizando 1g de levadura, 1.2 g de urea, 0.2 g de sulfato de amonio, 0.5 g de premezcla de vitaminas y minerales traza, en las diferentes horas de fermentación (0, 12, 24, 48 y 96 h). El incremento en la calidad nutritiva de algunos sustratos fermentados, se puede atribuir en gran parte al incremento de la población de levaduras, es conocido desde hace décadas que su valor proteico es alto y debido a esto, como concentrado, las levaduras pueden ser comparables a la pasta de soya, aun y cuando su contenido de metionina es bajo.

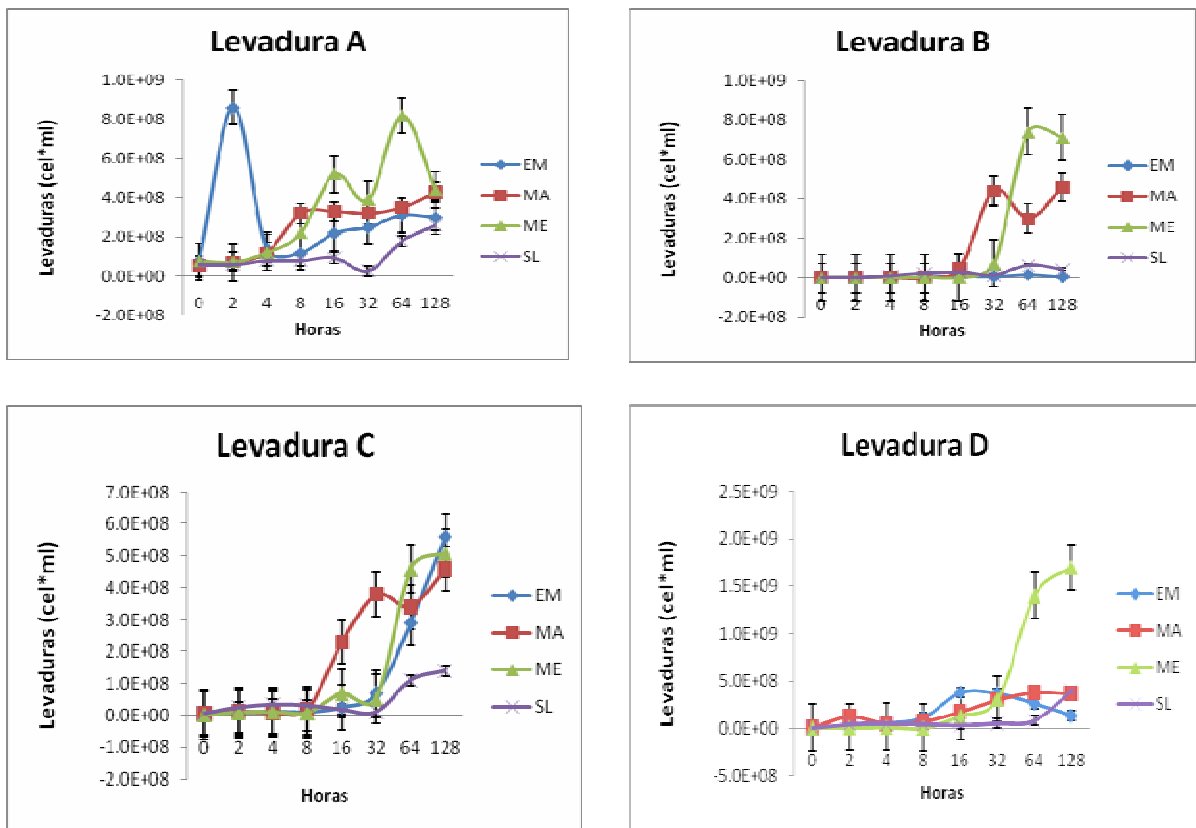


Figura 1. Comportamiento de las levaduras A, B, C y D con los diferentes sustratos. Extracto de Malta (EM), Manzana (MA), Melaza (ME), Suero de leche (SL)

LITERATURA CITADA

- Becerra B., A. 2006. Aprovechamiento de Subproductos de Manzana Mediante la Producción de Proteína Microbiana con Fermentación en Estado Sólido para la Alimentación Animal. Disertación Doctoral. Facultad de Zootecnia y Ecología. Universidad Autónoma de Chihuahua. Chihuahua. México.
- Becerra, A., Rodríguez, C., Jiménez, J., Ruiz, O., Elías A. & Ramírez, A. 2008. Urea y maíz en la fermentación aeróbica de bagazo de manzana para la producción de proteína. *Tecno ciencia Chihuahua* 2:7.
- Bui, K. y P. Galzy. 1990. Food yeast, In: Spencer, J.F.T. and Spencer, D.M., *Yeast Technology*. 1st edition. Springer Verlag, Berlin. 241p.
- Calderón A., J. O., A. Elías I. y M. Valdivie N. 2005. Dinámica de la Fermentación en Estado Sólido de las camas de Cascarilla de Café en Inicio de Ponedoras Inoculadas con Vitafert. *Revista Electrónica de Veterinaria REDVET*. 6(5).
- Díaz P., D. 2006. Producción de proteína microbial a Partir de Manzana de Desecho Adicionada con Urea y Pasta de Soya. Tesis de Maestría. Facultad de Zootecnia y Ecología. Universidad Autónoma de Chihuahua. Chihuahua. México.
- Díaz-Plascecnia. D., Rodríguez-Muela, C, F. Salvador, J. Jiménez, H. O. Rubio, S. Mena, A. Elías. 2010. Development of a diet inoculate whit two substrates by submerged solid fermentation. *J. Anim. Sci.* Vol. 88. Pág. 438.
- Duran., N. 1989. Bioconversion to single cell protein: recovery of lignocellulosic materials to produce human food as integrated process. *Alimentos (Chile)* 14 (4): 39-50.
- Elías, A. y Lezcano, O. 1993. Efecto de la fuente de N y algunos factores de crecimiento en la población de levaduras que se establecen en la producción de Saccharina. *Rev. Cubana Cienc. Agríc.* 28:319.
- Elías, A., O. Lezcano, P. Lezcano, J. Cordero y L. Quintana. 1990. Reseña Descriptiva sobre el Desarrollo de una Tecnología de Enriquecimiento Proteico de la Caña de Azúcar Mediante Fermentación en Estado Sólido (Saccharina). *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*. 24(1):3-12.
- Ghaly, A. E., Kamal, Mahmoud, R. Cote. 2007. Treatment of Landfill Leachate using Limestone/Sandstone Filters Under Aerobic Batch Conditions. *American Journal of Environmental Sciences* 3 (2): 43-53.
- González, A., Valenzuela, L. 2003. *Saccharomyces cerevisiae*. La levadura *Saccha-romyces cerevisiae*: un modelo de estudio desde

hace más de cien años. Temas de ciencia y tecnología. Vol. 11
Numero 32 p. 51-62.

- Hernández, D. R. 1999 Efecto de un cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* en consumo, digestibilidad y variables ruminales en borregos alimentados con pasto ovilla (*Dactylis glomerata*) cosechado a dos intervalos de rebrote. Tesis de maestría en ciencias. Colegio de Posgraduados, Montecillo Méx. 74 p.
- Ibarra, A., Y. García, E. Valiño, J. Dustet, N. Albelo y T. Carrasco. 2002. Influence of Aeration on the Bioconversion of Sugarcane Bagasse by *Trichoderma viride* M5-2 in a Static Bioreactor of Solid Fermentation. Cuban Journal of Agricultural Science. 36(2):152-158.
- Leveau, J.-Y. y M. Bouix. 2000. Microbiología Industrial. 1ra. Edición. Editorial Acribia, S.A. España. 3-105p.
- Lopez-Brea, M., D. Domingo. 2007. Antibioticoterapia con probióticos. Rev. Esp. Quimioterap. Vol. 20. 170-181.
- Rodríguez, R., H. E. 2009. Producción y Evaluación de Alimentos Fermentados a Partir de Bagazo y Desecho de Manzana y su Efecto Sobre el Desarrollo Ruminal y Parámetros Sanguíneos. Disertación Doctoral. Facultad de Zootecnia y Ecología Universidad Autónoma de Chihuahua.
- Rodríguez, Z., A. Elías, R. Bocourt y O. Núñez. 2001a. Efectos de los Niveles de Nitrógeno Ureico en la Síntesis Proteica Durante la Fermentación de Mezclas de Caña (*Saccharum officinarum*) y Boniato (*Ipomea batata Lam.*). Revista Cubana de Ciencia Agrícola. 35(1):29-36.
- Rodríguez, Z., R. Bocourt, A. Elías y M. Madera. 2001b. Dinámica de Fermentación de Mezclas de Caña (*Saccharum officinarum*) y Boniato (*Ipomea batata*). Revista Cubana de Ciencia Agrícola. 35(2):147-151.
- Rodríguez-Muela, C., A. Becerra, O. Ruiz, A. Ramírez, A. Flores and A. Elías. 2007. Use of Solid State fermentation to increase nutritius value of apple byproducts. J. Anim. Sci. 85:284.
- Rodríguez-Muela, C., D. Díaz, F. Salvador, A. Alarcón, O. Ruiz, C. Arzola, J. Jiménez. 2006. Effect of level of urea and soybean meal at solid state fermentation of Apple byproducts. Proceedings, Western Section, America Society of Animal Science. Vol. 57, 328-330.
- Rodríguez-Muela, C., D. Díaz, F. Salvador, O. Ruiz, C. Arzola, A. Flores, O. La O y A. Elías. 2010. Efecto del nivel de urea y pasta de soya en la concentración de proteínas durante la fermentación en estado sólido de la manzana (*Malus domestica*). Rev. Cubana de Cien. Agríc, 44 - 1, Pág. 23-26.

- Ruíz, C. J., M. Ruíz, G. Ruíz y V. Torres. 2002. Effect of Inclusion of Ammonium Sulfate on the Elaboration of Rustic Saccharina. Cuban Journal of Agricultural Science. 36(2):147-152.
- SAS 2004. User´s Guide: Statistics. Statistical Analysis System Institute, Cary, N.C. U.S.A.
- Taylor, K. A. C. C. 1996. A Simple Colorimetric Assay for Muramic Acid and Lactic Acid. Applied Biochemistry and Biotechnology. 56:49-58.
- Valiño, E., A. Elias, V. Torres y N. Albelo. 2002. Study of the Microbial Contenton Fresh Sugar Cane Bagasse as Substrate for Animal Feeding by Solid State Fermentation. Cuba Journal of Agricultural Science. 36(4):359-364.

REDVET: 2010, Vol. 11 N° 10

Recibido 01.10.2010 / Ref. prov. NOV0921B_RED VET / Revisado 27.05.2010 / Aceptado 26.08.2010
Ref. def. 101003_RED VET / Publicado 01.10.2010

Este artículo está disponible en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n101010.html> concretamente en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n101010/101003.pdf>

REDVET® Revista Electrónica de Veterinaria está editada por Veterinaria Organización®.
Se autoriza la difusión y reenvío siempre que enlace con Veterinaria.org® <http://www.veterinaria.org> y con REDVET®
- <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet>

