

# EFECTO DE COMBINACIONES DE ÁCIDOS ORGÁNICOS SOBRE LA MICROBIOLOGÍA GÁSTRICA DE LECHONES EN TRANSICIÓN\*

EFFECT OF COMBINATIONS OF ORGANIC ACIDS ON GASTRIC MICROBIOLOGY OF WEANED PIGLETS

Franco, L.D., M. Fondevila<sup>1</sup>, M. Mota y E. Solanas

Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos. Universidad de Zaragoza. Miguel Servet 177. 50013 Zaragoza. España.

<sup>1</sup>teléfono 34-976 761660; fax 34-976 761590; e-mail mfonde@unizar.es

## PALABRAS CLAVE ADICIONALES

Acidificantes. Coliformes. Lactobacilos. *In vitro*.

## ADDITIONAL KEYWORDS

Acidifiers. Coliforms. Lactobacilli. *In vitro*

## RESUMEN

El efecto de la adición (100 mEq) de los ácidos fórmico, láctico y fumárico, o sus combinaciones, sobre la población microbiana del estómago de lechones destetados fue estudiada *in vitro* a dos valores de pH diferentes (3 y 4). Tras 4 h de incubación, todas las combinaciones redujeron el número de coliformes a menos de  $10^2$  por ml, independientemente del pH del medio. El número de lactobacilos ( $\log_{10} \text{ml}^{-1}$ ) fue de 7,24 sin acidificantes, y se redujo hasta 5,79-5,68 con los tratamientos que incluyeron ácido fumárico, registrando valores intermedios (entre 6,29 y 6,60) con los ácidos láctico y fórmico, o su combinación. La producción de ácidos grasos volátiles mostró diferencias entre tratamientos en las proporciones de acetato y propionato, lo que sugiere cambios en la flora gástrica en función de la combinación de ácidos.

\*Este trabajo ha sido financiado a través del proyecto PTR 1995-0507-OP.

## SUMMARY

The effect of combinations of 100 mEq of the organic acids formic, lactic and fumaric, alone or in different combinations, on gastric microbial population of weaned pigs was studied at two different pH values (3 and 4) *in vitro*. All acid combinations reduced coliform counts below  $10^2$  per ml after 4 h despite medium pH. Lactobacilli counts ( $\log_{10} \text{ml}^{-1}$ ) were highest ( $p < 0.001$ ) without acidifiers (7.24), and lowest with treatments including fumaric acid (from 5.79 to 5.68), being intermediate with lactic and formic acids or their combination (from 6.29 to 6.60). Volatile fatty acids produced in fermentation showed differences in acetate and propionate proportions, suggesting changes in bacterial population with acid combinations.

## INTRODUCCIÓN

Los ácidos orgánicos son una de las alternativas más interesantes al em-

*Arch. Zootec. 53: 301-308. 2004.*

pleo de antibióticos como promotores del crecimiento en dietas para lechones recién destetados (Jensen, 1998; Partanen y Mroz, 1999). Entre los mecanismos de acción en diferentes tramos del tracto gastrointestinal, uno de los puntos a los que más interés se ha dedicado es a su efecto a nivel gástrico, dado el papel de éste órgano como puerta de entrada a la colonización microbiana del tracto digestivo en animales jóvenes. La adición de ácidos orgánicos en la dieta permite mantener un bajo pH gástrico y controlar el equilibrio de las poblaciones microbianas, así como reducir el riesgo de colonización de tramos posteriores del tracto digestivo por microorganismos patógenos (Jensen, 1998).

El efecto inhibitorio de los ácidos orgánicos sobre los microorganismos no sólo depende de la magnitud de pH, sino que puede considerarse aditivo (Knarreborg *et al.*, 2002), variando cualitativamente con el ácido empleado. *In vivo*, los ácidos fórmico (Bolduan *et al.*, 1988; Gedek *et al.*, 1992) y láctico (Geary *et al.*, 1999; Knarreborg *et al.*, 2002) se han mostrado efectivos contra coliformes y salmonellas, con discrepancias respecto a su efecto sobre las bacterias acidolácticas (Gedek *et al.*, 1992; Knarreborg *et al.*, 2002). Por su parte, Risley *et al.* (1992) no observaron un efecto apreciable del ácido fumárico sobre colis o lactobacilos. Por tanto, es difícil predecir la magnitud del cambio producido en la población microbiana si un ácido es sustituido por otro, así como la dirección de tal cambio (Hsiao y Siebert, 1999).

Aunque diversos ácidos orgánicos han probado su efecto como probióticos

en general, y como agentes antimicrobianos en particular, su diferente modo de acción sugiere un aumento de su eficacia mediante su combinación, que de hecho es habitual en su uso práctico. Sin embargo, pocos trabajos refieren el estudio de mezclas ácidos orgánicos, y en general se relacionan con mezclas comerciales (Sutton *et al.*, 1991).

En este trabajo, distintas combinaciones de los ácidos orgánicos fórmico, fumárico y láctico, añadidos en concentración similar a las empleadas en la práctica, se compararon en un medio a dos valores de pH fijos, para estudiar el efecto de ambos factores y su interacción sobre la población microbiana y su actividad fermentativa en contenido gástrico de lechones recién destetados. Dado que experimentos *in vivo* no son adecuados para determinar efectos sobre el pH gástrico (Partanen y Mroz, 1999), al tiempo que el número de tratamientos a probar es limitado, se decidió abordar este estudio en condiciones *in vitro*.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Distintas combinaciones de los ácidos fórmico, láctico y fumárico en base a su concentración (mEq), 0:0:0 (BL); 100:0:0 (FOR); 0:100:0 (LAC); 0:0:100 (FUM); 50:50:0 (FOLA); 50:0:50 (FOFU); 0:50:50 (LAFU), respectivamente, se evaluaron en condiciones *in vitro*. Todas ellas se probaron a dos valores de pH de incubación diferentes, 3,0 y 4,0. El medio de cultivo empleado se preparó en condiciones de anaerobiosis, conseguidas mediante burbujeo con CO<sub>2</sub> durante al

## COMBINACIONES DE ACIDIFICANTES EN LECHONES

menos 45 minutos, en base a (ml/l): agua destilada, 688; solución de microminerales, (13,2 g  $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ ; 10 g  $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ ; 1 g  $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ ; y 8 g  $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$  en 100 ml), 0,11; tampón glicilglicina 0,1M, 268; solución reductora (611 mg HCl-cisteína en 93 ml agua destilada y 4 ml NaOH 1N), 44; y 1 g de una mezcla glucosa: maltosa 1:1. El tampón glicilglicina se preparó para ajustar el pH de los medios de incubación a 3.0 y 4.0. Las mezclas de acidificantes se añadieron al medio de incubación en dosis de 100 mEq/l, y se dispensó en alícuotas de 5 ml en tubos bajo atmósfera de  $\text{CO}_2$ , esterilizándose a 120 °C durante 20 minutos.

Como inóculo se empleó el contenido estomacal de lechones sacrificados 7 días después del destete, mezclado, diluido anaeróbicamente 1:1 (v:v) en la misma solución estéril de incubación (sin acidificantes), que se conservó en congelación (-30 °C) por 4-6 días, hasta el momento de inoculación. Una vez descongelado, se mezcló con heces frescas de lechones en transición (0,04 g  $\text{ml}^{-1}$  contenido estomacal), con el fin de aumentar la carga microbiana del inóculo (Knarreborg *et al.*, 2001) y se inoculó cada tubo de medio con 5 ml, resultando un volumen final de incubación de 10 ml.

Los tubos se incubaron a 37 °C durante 4 horas, asumido como tiempo máximo de retención en el estómago. Una vez transcurrido ese tiempo, se tomaron dos muestras de 2 y 1 ml para determinar el recuento microbiano y la concentración de ácidos grasos volátiles (AGV; diluida 1:1 en ácido fosfórico al 5 p.100), respectivamente. No

se analizó la concentración de ácido láctico debido a que 3 de los 7 tratamientos experimentales lo incluían como componente. La incubación *in vitro* se llevó a cabo en tres días consecutivos, resultando 14 tubos (7 mezclas ácidas x 2 valores de pH) por cada día de incubación. Se determinó igualmente el pH final en el residuo de incubación.

La concentración de ácidos grasos volátiles se determinó siguiendo el método de Jouany (1982), en un equipo HP 5890-A con una columna capilar (Tecknokroma WAW80/100, 10 p.100 SP-1200 + 1 p.100 H3PO4). Para los estudios microbiológicos, las muestras fueron diluidas seriadamente en solución salina estéril y se sembraron en placas de Petri con medio McConkey (diluciones  $10^{-2}$  a  $10^{-4}$ ) y agar Rogosa (diluciones  $10^{-3}$  a  $10^{-5}$ ), que fueron incubadas a 38 °C durante 24 y 48 h, respectivamente, para recuento de coliformes y lactobacilos. Para el cultivo de lactobacilos, la atmósfera fue enriquecida con un 10 p.100  $\text{CO}_2$  en estufa de anaerobiosis. Los resultados de concentración se expresan en base logarítmica.

Los resultados fueron analizados estadísticamente mediante ANOVA, empleando el paquete estadístico Statistix 8 (Analytical Software, 2003). Para ello, se consideraron factorializados los efectos pH del medio y tratamiento acidificante, y éstos y su interacción se compararon con el error residual, considerando tanda de incubación como bloque. Cuando se detectaron diferencias significativas, éstas se compararon mediante el procedimiento de la mínima diferencia significativa a  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

En la **tabla I** se presentan los valores medios de los efectos principales tratamiento y pH para el pH final y las concentraciones de los microorganismos estudiados. Dado que la interacción pH x tratamiento no fue significativa en ninguno de los parámetros estudiados

**Tabla I.** pH final y concentración media de coliformes y lactobacilos ( $\log_{10}$  ml<sup>-1</sup>) de contenido gástrico de lechones recién destetados incubado *in vitro*, en función de la combinación de ácidos orgánicos. (Final pH and average concentration ( $\log_{10}$  ml<sup>-1</sup>) of coliforms and lactobacilli in gastric content from weaned piglets incubated *in vitro*, depending on the combination of organic acids used).

	pH final	colibacilos	lactobacilos
CTL	4,22 <sup>a</sup>	3,69	7,24 <sup>a</sup>
FOR	3,35 <sup>b</sup>	2,30	6,29 <sup>b</sup>
LAC	3,30 <sup>b</sup>	2,30	6,60 <sup>b</sup>
FUM	3,23 <sup>b</sup>	2,30	5,68 <sup>c</sup>
FOLA	3,30 <sup>b</sup>	2,30	6,32 <sup>b</sup>
FOFU	3,28 <sup>b</sup>	2,30	5,67 <sup>c</sup>
LAFU	3,23 <sup>b</sup>	2,30	5,79 <sup>c</sup>
e.e.m. (n = 6)	0,042	—	0,125
pH 3	3,20 <sup>a</sup>	2,42	6,02 <sup>b</sup>
pH 4	3,63 <sup>b</sup>	2,57	6,43 <sup>a</sup>
e.e.m. (n = 21)	0,023	—	0,066

CTL: control; FOR: ácido fórmico; LAC: ácido láctico; FUM: ácido fumárico; FOLA: ácido fórmico:láctico 1:1; FOFU: ácido fórmico:fumárico 1:1; LAFU: ácido láctico:fumárico 1:1; e.e.m.: error estándar de las medias.

Para cada parámetro, letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). La interacción pH x tratamiento no fue significativa ( $p > 0,10$ ) en los parámetros estudiados.

( $p > 0,10$ ), en las tablas se muestran únicamente los valores medios de los tratamientos acidificantes. A pesar de que el pH del medio se ajustó a 3,0 y 4,0 mediante el tampón glicilglicina, el pH final registrado en los tubos en los que se ajustó a 4 se redujo a 3,5 por la adición de ácidos orgánicos en los tratamientos correspondientes, mientras que en el caso del medio a pH 3 se mantuvo en el rango previsto. Por el contrario, el pH con el tratamiento control subió ligeramente respecto a lo previsto. La concentración microbiana ( $\log_{10}$  ml<sup>-1</sup>) en el inóculo empleado fue de  $4,61 \pm 0,346$  y  $6,90 \pm 0,220$  para coliformes y lactobacilos, respectivamente. No se observaron colonias de coliformes tras 4 horas de incubación cuando se añadieron ácidos orgánicos al medio, tanto a pH 3 como 4, por lo que en esos casos se asumió la concentración más baja detectable con las diluciones empleadas ( $2 \times 10^2$ /ml, correspondiente a  $\log_{10} = 2,30$ ). En consecuencia, se consideró inadecuado realizar un análisis de varianza de los resultados en este caso. Únicamente el tratamiento CTL mostró presencia de coliformes, que fue mayor a pH 4 ( $4,21 \pm 0,42$  ml<sup>-1</sup>) que a 3 ( $3,16 \pm 0,46$  ml<sup>-1</sup>). Respecto a la concentración de lactobacilos, en el medio a pH 3 resultó menor ( $p < 0,001$ ) que a pH 4. Entre tratamientos, la concentración de lactobacilos resultó mayor con CTL, y aquellos que incluyeron ácido fumárico (FUM, FOFU y LAFU) presentaron recuentos más bajos que FOR, LAC y FOLA.

La concentración total de AGV y las distintas proporciones de acetato, propionato, butirato e isovalerato se

## COMBINACIONES DE ACIDIFICANTES EN LECHONES

presentan en la **tabla II**. Dado que después de las 4 h de incubación *in vitro* sólo se detectaron isobutirato y valerato en 4 y 9 de las 42 muestras, respectivamente, los resultados de éstos ácidos volátiles no se han incluido en la **tabla II**. No se detectó la presencia de isovalerato en 15 de las muestras, pero no obstante sus resultados son presentados en la **tabla II**. La producción de AGV tendió ( $p=0,10$ ) a ser superior a pH 4 que a pH 3, pero no se vió afectada por la combinación de ácidos ( $p>0,10$ ). Las proporciones de los principales AGV (acetato, propio-

nato y butirato), al igual que la de isovalerato, fueron independientes del pH del medio ( $p>0,10$ ), pero se observaron diferencias significativas entre tratamientos en la concentración de acetato y propionato ( $p<0,001$ ). La proporción de acetato fue superior ( $p<0,05$ ) con CTL y los tratamientos FOLA y LAC que con FOR, FUM y LAFU, registrando valores intermedios con FOFU. Inversamente, la proporción de propionato fue mayor ( $p<0,05$ ) en FUM y LAFU, intermedia en FOFU y FOR y menor en LAC, FOLA y CTL.

**Tabla II.** Concentración total de ácidos grasos volátiles (AGV; mmol l<sup>-1</sup>) y proporciones medias de acetato, propionato, butirato e isovalerato en contenido gástrico de lechones recién destetados incubado *in vitro*, en función de la combinación de ácidos orgánicos. (Total concentration of volatile fatty acids (AGV; mmol l<sup>-1</sup>) and average proportions of acetate, propionate, butyrate and isovalerate in gastric content from weaned piglets incubated *in vitro*, depending on the combination of organic acids used).

	AGV	Acetato	propionato	butirato	isovalerato
CTL	4,38	0,708 <sup>a</sup>	0,164 <sup>e</sup>	0,104	0,020
FOR	5,56	0,656 <sup>bc</sup>	0,192 <sup>bcd</sup>	0,127	0,019
LAC	5,99	0,685 <sup>ab</sup>	0,185 <sup>cd</sup>	0,107	0,014
FUM	5,19	0,648 <sup>c</sup>	0,223 <sup>a</sup>	0,112	0,010
FOLA	4,34	0,702 <sup>a</sup>	0,174 <sup>cd</sup>	0,118	0,003
FOFU	5,02	0,674 <sup>abc</sup>	0,193 <sup>bc</sup>	0,118	0,011
LAFU	5,14	0,645 <sup>c</sup>	0,208 <sup>ab</sup>	0,124	0,014
e.e.m. (n= 6)	0,618	0,0120	0,0064	0,0073	0,0044
pH 3	4,70	0,675	0,192	0,114	0,014
pH 4	5,48	0,673	0,191	0,117	0,013
e.e.m. (n= 21)	0,330	0,0064	0,0034	0,0039	0,0024

CTL: control; FOR: ácido fórmico; LAC: ácido láctico; FUM: ácido fumárico; FOLA: ácido fórmico:láctico 1:1; FOFU: ácido fórmico:fumárico 1:1; LAFU: ácido láctico:fumárico 1:1; e.e.m.: error estándar de las medias.

Para cada parámetro, letras distintas indican diferencias significativas ( $p<0,05$ ). La interacción pH x tratamiento no fue significativa ( $p>0,10$ ) en los parámetros estudiados.

## DISCUSIÓN

El empleo de tampón glicilglicina para ajustar el pH del medio de incubación se decidió en lugar de otros tampones más comunes, que incluyen ácido cítrico o acético, para evitar la posible interacción de estos ácidos orgánicos sobre la respuesta microbiana. Aunque experimentalmente el ajuste no respondió totalmente según lo planeado (**tabla I**), este hecho no afecta a la comparación entre combinaciones de ácidos orgánicos ni al estudio del efecto del pH sobre dicha respuesta, pero obliga a tratar con precaución la comparación de resultados entre los acidificantes y el tratamiento control.

El uso de acidificantes en dietas para lechones en transición se enfoca generalmente desde un punto de vista cualitativo, considerando su capacidad para reducir la concentración de coliformes, considerada perjudicial para el estado sanitario del tracto gastrointestinal, al tiempo que las bacterias acidolácticas son más resistentes tanto a bajos pH como a la adición de ácidos orgánicos (Russell, 1992). Al mismo tiempo, el control de la flora digestiva depende en parte de la acción sinérgica de la población de lactobacilos, que pueden reducir el número de patógenos y su virulencia, entre otros mecanismos mediante la producción de compuestos antagónicos (Drago *et al.*, 1997).

En condiciones fisiológicas, el pH gástrico en lechones recién destetados es superior a los valores medios de 2,0-3,5 observables en animales adultos (Kidder y Manners, 1978). Con valores de pH entre 3,0 y 3,5, en este experimento no se detectó la presencia

de coliformes, por lo que a partir de nuestros resultados no se desprenden diferencias claras en el efecto de las mezclas de ácidos orgánicos sobre la concentración de coliformes. Tras 4 horas de incubación *in vitro*, Knarreborg *et al.* (2002) refieren concentraciones de coliformes ( $\log_{10} \text{g}^{-1}$ ) próximas a 5 con un pH del medio de 4, que descienden a 4 con pH 3. *In vivo*, Sutton *et al.* (1991) y Bolduan *et al.* (1988) observaron una clara reducción de coliformes al añadir ácido fórmico en relación al control. En ausencia de ácidos orgánicos en el medio, nuestros resultados muestran que el pH del medio afecta a la población de coliformes, que se ve marcadamente reducida al bajar de pH de 4,5 a 4,0. Teniendo en cuenta que las concentraciones de colis se reducen a menos de 2,3 con todas las mezclas acidificantes, tanto a pH 3,0 como 3,5, puede inferirse que probablemente existe un efecto de los acidificantes independiente al del pH (Knarreborg *et al.*, 2002), aunque no se aprecien diferencias entre combinaciones.

La reducción de la concentración de bacterias del género *Lactobacillus* con el empleo de acidificantes, independientemente del pH del medio, alcanzó mayor magnitud en los tratamientos que incluyeron ácido fumárico (FUM, FOFU y LAFU). También *in vitro*, Knarreborg *et al.* (2002) observaron una mayor tasa de mortalidad de bacterias acidolácticas con ácido fumárico 100 mM que con la misma concentración de otros ácidos orgánicos, a pH 4,5. Asumiendo el mencionado efecto sinérgico de los lactobacilos en el control de la flora digestiva, estos resultados sugieren que, desde el

## COMBINACIONES DE ACIDIFICANTES EN LECHONES

punto de vista microbiológico, combinaciones que incluyan el ácido fumárico son menos ventajosas que otras con fórmico o láctico para el equilibrio de la flora microbiana de los lechones destetados.

Aunque los bajos valores de producción de AGV registrados responden a lo esperable en función de resultados previos en contenido gástrico *in vivo* (Sutton *et al.*, 1991; Franco *et al.*, 2003), su magnitud limita la firmeza de posibles conclusiones. No obstante, las diferencias en las proporciones de acetato y propionato sugieren di-

ferencias cualitativas en la población microbiana en el estómago debidas al tipo de acidificante, observándose que los ácidos fumárico y fórmico y las combinaciones LAFU y FOFU favorecen una fermentación más propiónica respecto al control, mientras que este efecto es menos manifiesto con ácido láctico.

### AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado a través del proyecto PTR 1995-0507-OP.

### BIBLIOGRAFÍA

- Analytical Software. 2003. STATISTIX 8 for Windows. Tallahassee, FL, USA.
- Bolduan, G., H. Jung, R. Schneider, J. Block und B. Klenke. 1988. Die Wirkung von Propion- und Ameisensäure in der Ferkelaufzucht. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.*, 59: 72.
- Drago, L., M.T. Gismondo, A. Lombardi, C. de Haen and L. Gozzini. 1997. Inhibition of *in vitro* growth of enteropathogens by new *Lactobacillus* isolates of human intestinal origin. *FEMS Microbiol. Lett.*, 153: 455-463.
- Franco, L.D., M. Fondevila, M.B. Lobera, G. Olmos and C. Castrillo. 2003. Combinations of organic acids in weaner pig diets to enhance their effect on digestive tract environment. 2003 Meeting of the European Society of Veterinary and Comparative Nutrition, Hannover, Alemania.
- Geary, T.M., P.H. Brooks, J.D. Beal and A. Campbell. 1999. Effect on weaner pig performance and diet microbiology of feeding a liquid diet acidified to pH 4 with either lactic acid or through fermentation with *Pediococcus acidilacti*. *J. Sci. Food Agric.*, 79: 633.
- Gedek, B., M. Kirchgessner, U. Eidelsburger, S. Wiehler, A. Bott und F.X. Roth. 1992. Zum Einfluss von Ameisensäure auf die Keimzahlen der Mikroflora und deren Zusammensetzung in verschiedenen Segmenten des Gastrointestinaltraktes. 5. Mitteilung. Untersuchungen zur nutritiven Wirksamkeit von organischen Säuren in der Ferkelaufzucht. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.*, 67: 206.
- Hsiao, C.P. and K.J. Siebert. 1999. Modelling the inhibitory effects of organic acids on bacteria. *Int. J. Food Microbiol.*, 47: 189.
- Jensen, B.B. 1998. The impact of feed additives on the microbial ecology of the gut in young pigs. *J. Anim. Feed Sci.*, 7: 45.
- Jouany, J.P. 1982. Volatile fatty acid and alcohol determination in digestive contents, silage juices, bacterial cultures and anaerobic fermentor contents. *Sci. Alim.*, 2: 131.
- Kidder, D.E. and M.J. Manners. 1978. Digestion in the pig. Kingston Press, Bath, UK.
- Knarreborg, A., N. Miquel, T. Granli and B.B. Jensen. 2002. Establishment and application of an *in vitro* methodology to study the effects of organic acids on coliform and lactic acid bacteria in the proximal part of the gastrointestinal tract of piglets. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 99: 131.

- Partanen, K.H. and Z. Mroz. 1999. Organic acids for performance enhancement in pig diets. *Nutr. Res. Rev.*, 12: 117.
- Risley, C.R., E.T. Kornegay, M.D. Lindemann, C.M. Wood and W.N. Eigel. 1992. Effect of feeding organic acids on selected intestinal content measurements at varying times postweaning in pigs. *J. Anim. Sci.*, 70: 196.
- Russell, J.B. 1992. Another explanation for the toxicity of fermentation acids at low pH: anion accumulation versus uncoupling. *J. Appl. Bacteriol.*, 73: 363.
- Sutton, A.L., A.G. Mathew, A.B. Scheidt, J.A. Patterson and D.T. Kelly. 1991. Effects of carbohydrate sources and organic acids on intestinal microflora and performance of the weanling pig. In: Verstegen, M.W.A., Huisman, J., den Hartog, L.A. (eds.), *Digestive physiology in pigs*. Pudoc Wageningen, Netherlands, 422-427.

*Recibido: 24-5-04. Aceptado: 1-12-04.*

*Archivos de zootecnia vol. 53, núm. 203, p. 308.*