

**Compuestos secundarios de especies vegetales nativas como agentes
para mejorar la tolerancia a aguas de bebida con elevados tenores de
sulfatos en rumiantes**

*Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires,
Área Ciencias Agropecuarias*

Ana Verónica Juárez Sequeira

Ingeniera Agrónoma – Universidad Nacional de Santiago del Estero - 2011

Lugar de trabajo: Facultad de Agronomía y Agroindustrias – Universidad Nacional de
Santiago del Estero



FAUBA

Escuela para Graduados Ing. Agr. Alberto Soriano
Facultad de Agronomía – Universidad de Buenos Aires



COMITÉ CONSEJERO

Director de tesis

José Ignacio Arroquy

Ingeniero Agrónomo

MSc; PhD (Univ. Nac. Del Sur; Kansas State University)

Co-director

Gustavo Jaurena

Ingeniero Agrónomo

MSc; PhD (Pontificia Univ. Católica de Chile; Univ. of Wales, Aberystwyth/IGER)

Consejero de Estudios

Mónica Nazareno

Licenciada en Química

Doctorado en Química (Univ. Nac. de Córdoba)

JURADO DE TESIS

JURADO

Aníbal Pordomingo

Ingeniero Agrónomo (Univ. Nac. de La Pampa)

MSc; PhD (New Mexico State University; New Mexico State University)

JURADO

María Teresa Ajmat

Bioquímica (Univ. Nac. de Tucumán)

MSc; Doctorado (Univ. Nac. de Tucumán)

JURADO

Catalina van Baren

Farmacéutica (Univ. Nac. Buenos Aires)

Doctorado (Univ. Nac. Buenos Aires)

Fecha de defensa de la tesis: 11 de Agosto de 2022

Dedicatoria

A mis padres Alfredo y Ana

*Gracias a ustedes soy lo que soy...
Son mi ejemplo de seres humanos a seguir...Los
Amo
Gracias por apoyarme en todo lo que me propuse
como meta durante toda mi vida
Gracias por ser mi red de contención, y cuidar de
mis hijos cada vez que necesité.
Gracias mami por tu apoyo incondicional en
tantos viajes compartidos durante mi formación
académica.*

A mi esposo Sebastián y a mis hijos Sofía, Santiago y Francisco

*Son las razones de mí existir...el motor de mi vida.
Todo es Para y Por ustedes... LOS AMO*

*A mis hermanos Carolina y Santiago; y a mis sobrinos
ahijados Camila y Panchito...son mi vida...*

*A mis amigas del ♥ ... gracias por ser mi cable a tierra y
acompañarme en cada momento importante de mi
vida... gracias por su incondicionalidad...las adoro.*

***Sin el apoyo y acompañamiento de ustedes, nada de esto
hubiera sido posible...***

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer enormemente a mi director de tesis, el Dr. José Arroquy, por haber confiado en mí desde el primer momento, y alentarme a recorrer este camino. Es un orgullo para mí tener un mentor como usted, porque es un excelente profesional, referente en el área de Nutrición de rumiantes, pero más importante que todo... es una excelente persona. Hoy en día aplico muchas cosas que usted me enseñó, tanto profesionales como de la vida...y estaré eternamente agradecida por todo.

También quiero agradecer a mi co-director de tesis, Dr. Gustavo Jaurena y a mi consejera de estudios Dra. Mónica Nazareno, por su constante predisposición para ayudarme. Muchas gracias Gustavo por recibirme en Buenos Aires y hacerme sentir muy cómoda en todas las oportunidades que viaje y a todo el equipo de trabajo de Mónica, especialmente a Mariana por orientarme en las cuestiones químicas y en las técnicas de laboratorio.

Quiero agradecer especialmente a mis compañeros y amigos Agustín, Héctor y Olegario, por su apoyo incondicional, es un placer trabajar con ustedes y estoy muy orgullosa del equipo que formamos, y eso es sin dudas una de las mejores cosas que me llevo de todos estos años de doctorado.

Solo tengo palabras de agradecimiento a todas las personas que conocí y entablé una amistad durante todos estos años. Muchas gracias a Lourdes y Mariana. Por las palabras de aliento y todos los momentos compartidos. A mis compañeras de la UNSE-CONICET, y especialmente a Sumi porque desde el primer día estuviste dispuesta a ayudarme en todo lo que estuvo a tu alcance...y sé que nos esperan muchos proyectos juntas!

A mi jefe de la cátedra de Sistemas Productivos de Bovinos para Carne, Gustavo, por brindarme su ayuda, apoyo y por poner a mi disposición su laboratorio cada vez que necesité para mi doctorado.

Por último, un especial agradecimiento a mi ángel TERE; por quien llegué a trabajar al Laboratorio de forrajes del INTA, gracias mi TERE por tantos momentos vividos, por haberme ayudado en todo... por tus palabras de aliento, por contenerme cuando estuve bajoneada, por alegrarme con tus locuras... se te extraña tanto gordita... y sé que estarás muy feliz de ver que lo logré! besos al cielo!

Quiero mencionar a las instituciones que permitieron que lleve a cabo mis trabajos y que sin su apoyo nada de esto hubiese sido posible: a la EEA INTA Santiago del Estero y a la Facultad de Agronomía y Agroindustrias de la Universidad Nacional de Santiago del Estero; quienes me brindaron todas las herramientas para poder llevar a cabo los ensayos de mi tesis; y a la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de Buenos Aires; por haber contribuido a mi formación académica, fue un orgullo cursar mi doctorado en esta alta casa de estudios.

INDICE GENERAL

	Pág.
<i>Dedicatoria</i>	iii
<i>Agradecimientos</i>	iv
Índice general.....	v
Índice de cuadros.....	vii
Índice de figuras.....	ix
Declaración.....	x
Abreviatura.....	xi
Resumen.....	xiv
Abstract.....	xvi
Capítulo 1. Introducción y revisión de antecedentes	1
1.1. Introducción.....	2
1.2. Revisión de antecedentes.....	3
1.2.1. Factores que afectan los requerimientos de agua de bebida.....	3
1.2.2. Calidad del agua de bebida.....	4
1.2.3. Impacto del agua salada sobre el desempeño animal.....	6
1.2.3.1. Consumo de alimento.....	6
1.2.3.2. Consumo de agua.....	8
1.2.3.3. Desempeño productivo.....	10
1.2.3.4. Metabolismo del azufre: bases químicas y microbiológicas.....	12
1.2.4. Alternativas para mejorar la utilización de aguas con elevado contenido de sulfatos.....	18
1.2.4.1. Adaptación a aguas con elevado tenor salino.....	18
1.2.4.2. Manipulación dietaria.....	21
1.2.4.2.1. Tipo y calidad de la dieta.....	21
1.2.4.2.2. Compuestos secundarios.....	24
1.2.4.2.2.1. Taninos.....	25
1.2.4.2.2.2. Saponinas.....	28
1.2.4.2.2.3. Aceites esenciales.....	30
1.3. Hipótesis.....	32
1.4. Objetivos.....	33
1.4.1. Objetivo general.....	33
1.4.2. Objetivos específicos.....	33
Capítulo 2. Exploración del potencial inhibidor de producción de H₂S de especies nativas	34
Resumen.....	35
2.1. Introducción.....	36
2.2. Materiales y Métodos.....	37
2.2.1. Recolección y preparación de muestras.....	37
2.2.2. Incubación <i>in vitro</i>	41
2.2.3. Determinación de sulfuro de hidrógeno, metano, ácidos grasos volátiles y nitrógeno amoniacal.....	43
2.2.4. Análisis estadístico.....	44
2.3. Resultados.....	45

2.3.1. Composición química.....	45
2.3.2. Fermentación <i>in vitro</i>	45
2.4. Discusión.....	51
2.5. Conclusión.....	55
Capítulo 3. Efecto del nivel de inclusión de especies nativas sobre la producción de sulfuro de hidrógeno <i>in vitro</i>	56
Resumen.....	57
3.1. Introducción.....	58
3.2. Materiales y Métodos.....	60
3.2.1. Preparación de los extractos y determinación de FT y TC.....	61
3.2.2. Incubación <i>in vitro</i>	63
3.2.3. Determinación de sulfuro de hidrógeno, metano y nitrógeno amoniacal.....	64
3.2.4. Análisis estadístico.....	65
3.3. Resultados.....	65
3.3.1. Fenoles totales y Taninos Condensados.....	65
3.3.2. Fermentación <i>in vitro</i>	66
3.4. Discusión.....	71
3.5. Conclusión.....	75
Capítulo 4. Estudio del impacto de hojas de <i>Prosopis alba</i> sobre el consumo de agua, alimento, digestibilidad, balance de N y producción de H₂S en corderos que beben agua con elevados tenores de sulfato	76
Resumen.....	77
4.1. Introducción.....	78
4.2. Materiales y Métodos.....	80
4.2.1. Toma de muestras y variables estudiadas.....	81
4.2.1.1. Composición química.....	81
4.2.1.2. Concentración de compuestos fenólicos y taninos condensados en los ingredientes de las raciones utilizadas.....	83
4.2.2. Análisis estadístico.....	84
4.3. Resultados.....	85
4.3.1. Composición química del agua y dietas experimentales.....	85
4.3.2. Consumo de agua y alimento.....	87
4.3.3. Digestibilidad aparente del tracto digestivo total.....	88
4.3.4. Balance de nitrógeno.....	89
4.3.5. Consumo de Azufre y Concentración de Sulfuro de Hidrógeno Gaseoso.....	91
4.4. Discusión.....	92
4.5. Conclusión.....	99
Capítulo 5. Conclusiones generales	100
Bibliografía	104

INDICE DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 1.1. Clasificación de agua de bebida para ganadería según contenido de Sales Totales Disueltas.....	4
Cuadro 1.2. Clasificación de agua de bebida para ganadería según contenido de sulfatos.....	5
Cuadro 1.3. Clasificación de agua de bebida para ganadería según conductividad eléctrica (CE).....	6
Cuadro 2.1. Composición química de hojas de las plantas nativas y los controles.....	45
Cuadro 2.2. Efecto de la fermentación <i>in vitro</i> de hojas de especies forrajeras nativas sobre la digestibilidad de la MO y la producción de gas.....	46
Cuadro 2.3. Perfil de ácidos grasos volátiles de especies forrajeras nativas en fermentación <i>in vitro</i> a las 0 y 24 h de incubación.....	47
Cuadro 2.4. Efecto de la incubación de las hojas de especies forrajeras nativas sobre la producción de sulfuro de hidrógeno y metano.....	49
Cuadro 3.1. Efecto del nivel de inclusión de especies nativas en medios con elevado nivel de sulfatos, sobre la producción de gas acumulada y la desaparición de MO en 24 h de incubación ruminal <i>in vitro</i>	69
Cuadro 3.2. Efecto del nivel de inclusión de especies nativas en medios con elevado nivel de sulfatos, sobre la producción de gas acumulada y la desaparición de MO en 24 h de incubación ruminal <i>in vitro</i>	70
Cuadro 4.1. Composición química de las aguas de bebida experimentales.....	85
Cuadro 4.2. Composición química de los ingredientes de las dietas utilizados en las dietas experimentales.....	86
Cuadro 4.3. Composición ingredientes y química de las dietas experimentales.	86
Cuadro 4.4. Efecto de la suplementación con hojas de <i>Prosopis alba</i> y calidad de agua en consumo de materia orgánica total (CMOT), consumo de Fibra Detergente Neutro (CFDN), consumo de materia orgánica digestible (CMODig) y consumo de agua (CA).....	87
Cuadro 4.5. Efecto de la suplementación con <i>Prosopis alba</i> y calidad de agua en digestibilidad aparente del tracto digestivo de la MO (DATDMO) y de la proteína bruta (DATDPB).....	89

Cuadro 4.6. Efecto de la suplementación con Algarrobo blanco y calidad de agua en consumo de nitrógeno, excreción fecal y urinaria de nitrógeno, excreción de nitrógeno total, % de nitrógeno excretado a través de orina y balance de nitrógeno.....	89
Cuadro 4.7. Efecto de la suplementación con <i>Prosopis alba</i> (PA) y calidad de agua en consumo de S en agua y en concentración ruminal de sulfuro de hidrógeno (H ₂ S).....	92

INDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1.1 Efecto del contenido del Total de Sales Disueltas (STD), Total de Sales Disueltas con predominio de la sal cloruro de sodio (TDS (NaCl)); y del Total de Sales Disueltas con predominio de sulfatos (SO ₄) sobre el consumo de materia seca (CMS) en bovinos de carne.....	8
Figura 1.2. Efecto del contenido del Total de Sales Disueltas (STD), Total de Sales Disueltas con predominio de la sal cloruro de sodio (TDS (NaCl)); y del Total de Sales Disueltas con predominio de sulfatos (SO ₄) sobre el consumo de agua (CA) en bovinos de carne.....	9
Figura 1.3. Efecto del agua con elevado contenido de sales totales disueltas (STD) sobre la ganancia diaria de peso vivo (GDPV) y sobre la eficiencia de conversión alimenticia (EC) de ganado de carne.....	11
Figura 1.4. Cambio relativo en ganancia diaria de peso vivo (GDPV) y consumo de MS (CMS) en respuesta al incremento de sales totales disueltas (STD) en el agua de bebida.....	11
Figura 1.5. Vías metabólicas de los sulfatos (SO ₄) y su reducción a sulfuro de hidrógeno (H ₂ S) ruminal.....	13
Figura 1.6. Reducción asimilatoria y desasimilatoria de los SO ₄	15
Figura 1.7. Consumo de materia seca (CMS) diario de novillos consumiendo agua con diferente concentración (2 g/L; 7 g/L; 12 g/L) de sales totales disueltas (STD).....	19
Figura 1.8. Estructura de taninos hidrolizables.....	26
Figura 1.9. Estructura de tanino condensado.....	27
Figura 2.1. Posición relativa de las especies nativas respecto al control forraje en cuanto a producción de H ₂ S y CH ₄	48
Figura 2.2. Posición relativa de las especies nativas respecto al control concentrado en cuanto a producción de H ₂ S y CH ₄	49
Figura 3.1. Contenido de Fenoles totales (AGa = ácido gálico) y Taninos condensados (TC = mg TC sd/g MS) en extractos de hojas de especies nativas.....	63
Figura 4.1. Consumo de MO total de acuerdo a la calidad del agua y la inclusión de <i>Prosopis alba</i> en la dieta.....	85
Figura 4.2. Eficiencia de uso de N de acuerdo a la calidad del agua y la inclusión de <i>Prosopis alba</i> en la dieta.....	87

Declaro que el material incluido en esta tesis es, a mi mejor saber y entender, original producto de mi propio trabajo (salvo en la medida en que se identifique explícitamente las contribuciones de otros), y que este material no lo he presentado, en forma parcial o total, como una tesis en ésta u otra institución.

Abreviaturas

AA: *Acacia aroma* (Tusca)

AC: ácido acético

AF: *Acacia furcatispina* (Garabato)

AGV: ácidos grasos volátiles

BSR: bacterias sulforreductoras

CA: consumo de agua

CA: consumo de agua

CC: control concentrado

CF: control forraje

CFDN: consumo de Fibra Detergente Neutro

CH₄: metano

CMOD: consumo de materia orgánica digestible

CMODig: consumo de materia orgánica digestible

CMOT: consumo de materia orgánica total

CMS: consumo de materia seca

CP: *Caesalpinia paraguariensis* (Guayacán)

CT: *Celtis tala* (Tala)

DATDMO: digestibilidad aparente del tracto digestivo de la materia orgánica

DATDPB: digestibilidad aparente del tracto digestivo total de la proteína bruta

DigMO: digestibilidad de la materia orgánica

DMOIV: digestibilidad de la materia orgánica in vitro

EC: eficiencia de conversión

EO: extracto orgánico

EA: extracto acuoso

EEM: error estándar de la media

FDA: fibra detergente ácido

FDN: fibra detergente neutro

FT: fenoles totales

GD: *Geoffroea decorticans* (Chañar)

GDPV: ganancia diaria de peso vivo

H: hidrógeno

H₂S: sulfuro de hidrógeno

LD: *Larrea divaricata* (Jarilla)

LR: licor ruminal

MO: materia orgánica

MOD: materia orgánica digestible

MOI: materia orgánica incubada

MS: materia seca

PA: *Prosopis alba* (Algarrobo blanco)

PB: proteína bruta

PEM: poliencéfalomalacia

PG24 h: producción de gas a las 24 h de incubación

PN: *Prosopis nigra* (Algarrobo negro)

PROP: ácido propiónico

PV: peso vivo

S: azufre

SB: solución tampón

SO₄: sulfato

SQ: *Schinopsis quebracho-colorado* (Quebracho Colorado)

STD: sales totales disueltas

TC: taninos condensados

TSA: tenor salino alto

TSB: tenor salino bajo

ZM: *Ziziphus mistol* (Mistol)

Resumen

El objetivo de este trabajo fue evaluar el impacto de los taninos condensados (TC) de especies nativas con potencial inhibidor de la reducción ruminal de sulfatos (SO_4) como alternativa para mejorar la tolerancia de los rumiantes a aguas de bebida con elevados contenidos de SO_4 . En el primer experimento, se testearon hojas de plantas nativas con la técnica de fermentación *in vitro* en un medio enriquecido con SO_4 . En este experimento *Prosopis alba* (PA), *Larrea divaricata* (LD) y *Acacia aroma* (AA) presentaron mayor potencial para mitigar la producción de sulfuro de hidrógeno (H_2S) sin inhibir la fermentación. En el Experimento II se evaluaron extractos (acuosos vs. orgánicos) con distinto nivel de inclusión (0; 12,5; 25 y 50% especie equivalente) de PA, LD, y AA, sobre la producción de gas, la digestibilidad, y la producción de H_2S de un sustrato base (heno de alfalfa – grano de maíz 50-50 %) mediante la técnica de incubación ruminal *in vitro* con un medio enriquecido con SO_4 . Los resultados obtenidos mostraron que las especies estudiadas tienen potencial de reducción del H_2S y CH_4 , aunque dicho potencial fue dependiente de la dosis, el tipo de extracto, y la especie. En el tercer experimento se evaluaron las hojas de PA como fuente de TC en un ensayo *in vivo* con corderos expuestos al consumo de agua con elevado contenido de SO_4 . Los tratamientos fueron el resultado de la combinación de dos calidades de agua (Tenor salino bajo = TSB; 499 mg/L de sólidos totales disueltos [STD], 150 mg/l de SO_4 ; Tenor salino alto = TSA; 10.100 mg/L de STD, 5.400 mg/L de SO_4) y dos niveles de inclusión de hojas de PA (0% y 33% de la ración total) en una ración base compuesta de heno de alfalfa (*Medicago sativa*) y grano de maíz (*Zea mays*). En este experimento, las hojas de PA utilizadas no redujeron la concentración de H_2S en rumen. El consumo total de MO y el de agua en TSA no difirieron del control. La inclusión dietaria de TC de PA incrementó la digestibilidad del N, disminuyó la excreción de N urinario, resultando en una mejora del

balance total y la utilización de N. Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que se debe seguir estudiando los efectos de los TC de PA en las vías metabólicas ruminales del azufre, para poder conocer con certeza cómo intervienen dichos compuestos cuando los rumiantes consumen elevadas cantidades de azufre a través del agua de bebida y poder asociar esas intervenciones con parámetros productivos.

Palabras claves: agua de bebida, plantas nativas; taninos condensados, sulfuro de hidrógeno

Abstract

The aim of this work was to evaluate the impact of condensed tannins (CT) from native species with capacity to inhibit ruminal sulphate (SO₄) reduction as alternative to enhance bovine tolerance to SO₄ rich drinking water. In Experiment I, leaves of the native plants were tested on *in vitro* ruminal incubation technique enriched with sodium sulphate to mimic *in vivo* high SO₄ intake. *Prosopis alba* (PA), *Larrea divaricata* (LD) and *Acacia aroma* (AA) showed higher potential to mitigate hydrogen sulphur (H₂S), eliciting no adverse effects on *in vitro* fermentation. In Experiment II, the goal was to evaluate aqueous vs. organic extracts, and inclusion rates of extracts from the three species (PA, LD, and AA), selected from Experiment I, on gas production, digestibility, and H₂S production with a standard substrate (alfalfa hay – corn grain, 50-50 %). The study was carried out using the *in vitro* ruminal incubation technique with a medium enriched with SO₄. Results showed that the studied species had potential to reduce H₂S and CH₄, depending on rate of inclusion, type of extract and species. Experiment III evaluated PA leaves as source of TC in an *in vivo* trial with lambs exposed to high SO₄ water. Treatments were the results of the combination of two water qualities (Low salt water = TSB; 499 mg/l of total dissolved solids [STD], 150 mg/l of SO₄; High salt water = TSA; 10.100 mg/l of STD, 5.400 mg/l of SO₄) and two levels of PA leaves included the ration (0% and 33% DM basis of alfalfa hay and corn grain basis ration). Leaves of PA utilized as source of CT for feeding lambs drinking high SO₄ water did not mitigate H₂S concentration in rumen. Total OM intake as well as water intake in TSA did not differ from control. Dietary inclusion of CT from PA increased N digestibility and decreased urinary N excretion, and consequently it improved N balance and N utilization. However, the potential benefit of PA showed not association with reduction of ruminal

concentration of H₂S in lambs on high SO₄ water. Results of this work suggest that effects of CT of PA on metabolic pathways of sulfur within the rumen need further research.

Key words: drinking water; native plants, condensed tannins, hydrogen sulfur.

CAPITULO 1

Introducción y Revisión de Antecedentes

1.1. Introducción

El agua es el segundo nutriente esencial en importancia después del oxígeno para el sostenimiento de los procesos vitales, representando aproximadamente el 70% del peso vivo (NASEM, 2016). El “pool” de agua corporal se produce por el consumo de agua de bebida o asociada a los alimentos, la oxidación de alimentos y reservas corporales y la absorción de agua a través de la piel. Las pérdidas de agua se producen por heces, orina, y por los procesos de respiración y transpiración (Squires, 1993).

El consumo elevado de sales – a través del alimento o el agua de bebida – incrementa los requerimientos de agua para eliminar el exceso de sales del cuerpo (Nelson y Cox, 2005). Con el avance de la ganadería a regiones áridas y semiáridas subtropicales del mundo, el ganado está comúnmente forzado a utilizar aguas de calidad marginal (FAO, 2007), por sus elevados tenores de sales e iones que pueden causar desajustes fisiológicos y productivos, resultando en una limitante importante para el desarrollo ganadero.

En el Chaco Semiárido Argentino, el agua subterránea, con excepción de pequeñas áreas, presenta limitaciones de cantidad y calidad asociadas a elevados tenores de sulfatos en solución (Basán Nickisch, 2007). De acuerdo a NASEM (2016), los umbrales máximos tolerables para el ganado bovino de carne, están alrededor de 7000 mg/L de sólidos totales disueltos (STD) y de 1500 mg/L de sulfatos. En base a un relevamiento realizado en la totalidad de los departamentos de la provincia de Santiago del Estero, se observaron niveles mínimos y máximos de 1500 a 12500 mg/L STD, y niveles de sulfatos que van desde 930 a 4600 mg/L en fuentes de agua destinadas para consumo animal (Basán Nickisch, datos no publicados).

Es importante tener en cuenta que, de las sales frecuentemente encontradas en exceso, las sales de sulfatos (SO_4) son las que afectan con mayor severidad el desempeño animal (Weeth y Hunter, 1971). Sin embargo, la información sobre el efecto de niveles elevados de SO_4 presentes en el agua sobre el desempeño productivo es escasa tanto a nivel nacional como internacional. La problemática del elevado consumo de azufre (S) – dietario o mediante SO_4 en agua, ha sido asociada con la toxicidad generada por la producción ruminal de sulfuro de hidrógeno (H_2S) (García-López *et al.*, 1996; Kung *et al.*, 2000, 2003) que afecta negativamente el desempeño animal, y en los casos extremos genera poliencefalomalacia (PEM) (Gould, 1998; Vanness, 2009).

1.2. Revisión de antecedentes

1.2.1 Factores que afectan los requerimientos de agua de bebida

Los requerimientos de agua de bebida se cubren mediante tres fuentes: agua de bebida, ingestión de agua presente en el alimento, y el agua metabólica producto del metabolismo de reservas corporales. Esta última fuente, es generalmente de un aporte insignificante, siendo las dos primeras las principales fuentes de agua para bebida animal.

El consumo de agua depende del consumo de alimento, contenido de agua en el alimento, la temperatura, el peso vivo, estado fisiológico, la edad, la tasa de crecimiento entre otros. Se han desarrollado varias ecuaciones para predecir el consumo de agua que contemplan estos factores (NRC, 2001; NRC, 2007; NASEM, 2016). Los requerimientos de agua son función de las diferentes actividades metabólicas y la restricción de consumo limita la productividad animal.

1.2.2. Calidad del agua de bebida

La calidad del agua limita principalmente el consumo de agua y en consecuencia el consumo de alimento. En general la calidad del agua se evalúa en base a los siguientes parámetros: propiedades organolépticas (olor y sabor), fisicoquímicas (pH, total de sales disueltas y dureza), presencia de elementos tóxicos (metales pesados, minerales tóxicos, organofosforados e hidrocarburos), elementos en exceso (nitratos, sodio, sulfatos, y hierro), y microorganismos patogénicos (NRC, 2000, NRC, 2001 NASEM; 2016). En base a estos parámetros se establecen valores de referencia para calificar la calidad de aguas de bebidas en ganado doméstico (Cuadro 1.1).

Cuadro 1.1. Clasificación de agua de bebida para ganadería según contenido de sales totales disueltas.

Concentración de Sales Totales Disueltas (MG/L)	Clasificación
<1000	Segura. Agua con faltante de minerales, lo que puede generar algún problema de salud en los animales.
1000 – 2000	Excelente. Apta para ganadería.
2000-5000	Satisfactoria. Puede generar diarrea en animales que no están acostumbrados.
5000-8000	Regular. Uso limitado en ganadería. Evitar su consumo en vacas gestantes y lactantes. Puede ser suministrada a animales que no se encuentren en máxima producción ni se espere de ellos un máximo rendimiento.
8000-12000	Riesgo elevado. Uso muy limitado en ganadería.
>12000	No recomendado. Los riesgos ocasionados por el consumo de agua con esta concentración salina son graves por lo que no se recomienda su uso bajo ninguna condición.

Adaptado de NRC (2001); NRC (2007); CSIRO (2001); NASEM (2016).

El efecto del consumo de agua con elevado tenor salino depende de la concentración de sales en el agua y del tipo de sales presente, donde se destacan los SO₄ como las más perjudiciales, debido a que disminuyen linealmente el consumo de alimento y agua cuando se incrementa su concentración (Grout *et al.*, 2006; NRC, 2005; López *et al.*, 2021). Este tipo de sales le otorga al agua un sabor amargo y un efecto purgante,

generando un rechazo a ser consumida por parte de los animales. Por este motivo, es muy importante tener en cuenta los umbrales de concentración para este tipo de sal perjudicial para los rumiantes (Cuadro 1.2).

Cuadro 1.2. Clasificación de agua de bebida para ganadería según contenido de sulfatos.

Concentración de sulfatos (mg / L)	Clasificación
<500	Segura. Recomendada para terneros.
<1000	Segura. Recomendada para ganado adulto.
2000-2500	Riesgoso. Puede generar diarrea. Si el tiempo de exposición es corto (menor a 90 días) y el ganado es adulto, puede tolerar dicha concentración de sal.
>4000	No recomendado. Puede generar graves problemas de salud animal y repercutir en la productividad del sistema.

Adaptado de NRC (2001); NRC (2007); NASEM (2016).

Otra manera de estimar de forma práctica la concentración de sales en el agua es a través de la medición de la conductividad eléctrica (CE) (Cuadro 1.2) y su empleo como medida aproximada de la salinidad se ha incrementado debido a la existencia de conductivímetros portátiles que facilitan su determinación a campo (Bavera, 2011). La conductividad del agua está relacionada con la concentración de las sales en disolución, cuya disociación genera iones capaces de transportar la corriente eléctrica (Solís-Castro *et al.*, 2018), sin embargo, la conductividad se ve influida por la temperatura del agua, por la naturaleza de las sales y por sus concentraciones reales y relativas, debido a que algunas sustancias se ionizan en forma las completa que otras y por lo tanto conducen mejor la corriente, sobreestimando la concentración real de sales disueltas (Bavera, 2011).

Cuadro 1.3. Clasificación de agua de bebida para ganadería según conductividad eléctrica (CE).

CE (mmhos/cm)	Clasificación
<1,5	Excelente. Apta para ganadería.
1,5 – 5,0	Muy satisfactoria. Apta para ganadería. Puede provocar diarreas temporales en animales no acostumbrados.
5,0 – 8,0	Satisfactoria. Puede generar diarrea en animales que no están acostumbrados.
8,0 – 11,0	Regular. Uso limitado en ganadería. Evitar el consumo en animales preñados o en lactancia.
11,0 – 16,0	De uso muy limitado. Solo apta para animales adultos de carne que no se encuentren en máxima producción.
>16,0	No recomendado. Riesgos muy grandes.

Recopilación Ing Agr. (Msc) Jorge L. Luque

1.2.3 Impacto del agua salada sobre el desempeño animal

1.2.3.1 Consumo de alimento

Uno de los principales perjuicios del consumo de aguas con elevado tenor salino es la disminución del consumo de alimento (Sager y Casagrande, 1998; Patterson *et al.*, 2003; Mdletshe *et al.*, 2017).

Entre las sales contenidas en el agua, los SO_4 son más perjudiciales que los cloruros (Coria *et al.*, 2007). Niveles elevados de Na_2SO_4 reducen significativamente el consumo de agua (35%), alimento (30%), y consecuentemente la ganancia de peso (Weeth y Hunter, 1971; Loneragan *et al.*, 2001). El S proveniente del agua de bebida es probablemente el principal factor relacionado directa o indirectamente con la disminución del desempeño animal. Una exposición prolongada a dietas o agua con elevado contenido de S puede causar un incremento en la producción de H_2S en rumen, dando como resultado en casos extremos una intoxicación con azufre (Vanness *et al.*, 2009). Sin embargo, moderados incrementos en la cantidad de sulfatos consumidos resultan en una reducción de la productividad animal (*c.a.* 15%) sin presentar síntomas agudos de

toxicidad por H₂S (Drewnoski y Hansen, 2013). Loneragan *et al.*, (2001) trabajaron con 240 novillos a corral agrupados en 5 tratamientos con concentraciones de SO₄ creciente en el agua de bebida: 125, 250, 500, 1000 y 2000 mg/L. Dichos autores reportaron ganancias medias diarias de peso y eficiencias de conversión menores en los animales que bebieron agua con niveles bajos de concentración de SO₄, en comparación con las concentraciones más elevadas. Estas disminuciones de ganancia de peso y eficiencia de conversión se deben a un menor consumo de alimento y agua, como consecuencia de una reducción de la motilidad ruminal e intestinal provocado por la mayor producción de H₂S ruminal (Kandyliis, 1984; Drewnoski *et al.*, 2014).

Si bien existen varios estudios que muestran el efecto negativo de aguas con elevados tenores salinos en su mayoría están acotados a un rango estrecho de sales que no permiten visualizar un patrón de respuesta generalizado a niveles de sales y tipos de sales. Con el objetivo de caracterizar la respuesta a aguas de alto tenor salino, recientemente López *et al.*, (2021) realizaron un meta-análisis con datos de 25 trabajos científicos en bovinos para carne, cubriendo un rango de sales totales de 0 a 20 g/L y de 0 a 5 g/L de SO₄ con dietas base forraje voluminoso (i.e., >50% forraje voluminoso en la dieta). En dicho estudio se destaca una respuesta cuadrática en el consumo de materia seca (CMS) con el incremento en el STD y sales de cloruro de sodio (NaCl), manteniéndose el consumo e incluso incrementándolo a tenores salinos bajos, para luego decrecer significativamente (Figura 1.1). Sin embargo, la magnitud de este efecto depende del tipo de sal predominante en el agua, siendo más perjudicial el efecto cuando predominan los SO₄ en el agua (Figura 1.1). El CMS se deprime linealmente con la presencia creciente de SO₄ en agua (López *et al.*, 2021).

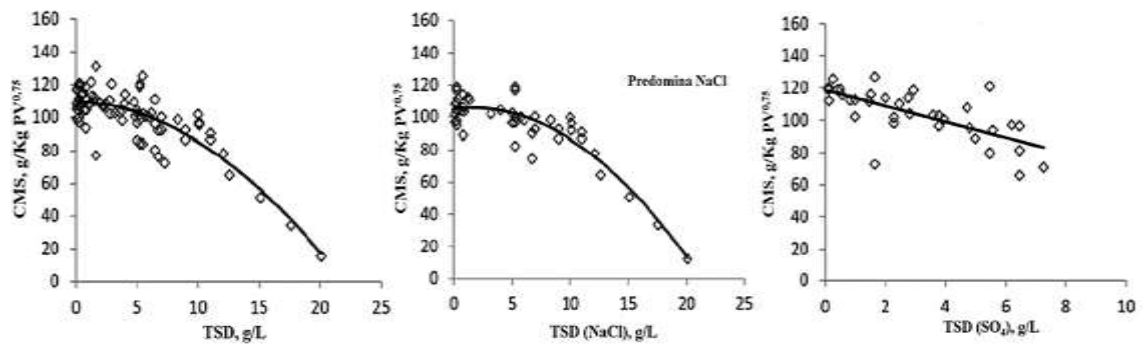


Figura 1.1. Efecto del contenido del Total de Sales Disueltas (STD), Total de Sales Disueltas con predominio de la sal cloruro de sodio (TDS (NaCl)); y del Total de Sales Disueltas con predominio de sulfatos (SO_4) sobre el consumo de materia seca (CMS) en bovinos de carne. Fuente: López *et al.*, 2021.

1.2.3.2 Consumo de agua

El agua de bebida es un nutriente esencial para los rumiantes debido a que interviene en importantes procesos fisiológicos y además está estrechamente asociado con el consumo de alimento (NASEM 2016). La presencia de STD en el agua de bebida afecta el consumo de agua (CA) de forma similar al CMS. El efecto provocado por la concentración elevada de sales depende en mayor medida del tipo de sal presente en el agua, en comparación con lo observado en el CMS. La presencia de NaCl genera una respuesta cuadrática observada en la Figura 1.2, donde aumenta el consumo en un 25% aproximadamente en un rango de 6 – 8 g de STD.

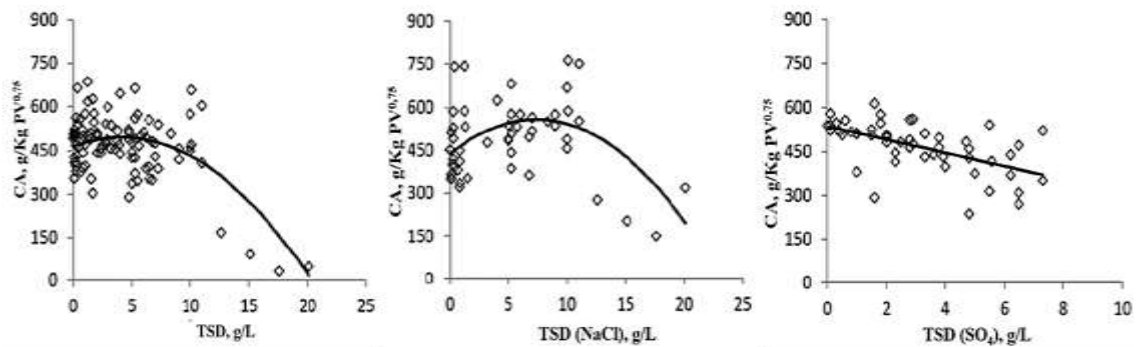


Figura 1.2. Efecto del contenido del Total de Sales Disueltas (STD), Total de Sales Disueltas con predominio de la sal cloruro de sodio (TDS (NaCl)); y del Total de Sales Disueltas con predominio de sulfatos (SO_4) sobre el consumo de agua (CA) en bovinos de carne. Fuente: López *et al.*, 2021.

En cambio, el consumo de SO_4 a través del agua genera un efecto lineal, a medida que aumenta la concentración de STD, disminuye el CA (López *et al.*, 2021). A pesar que no se conocen los mecanismos por los cuales se provoca la disminución de CA, esta disminución, al igual que el CMS, puede estar relacionada con la producción de H_2S ruminal en exceso, provocando la disminución de motilidad ruminal debido a toxicidad (Kandyliis, 1984; Drownoski *et al.*, 2014). Adicionalmente, diversos autores (Weeth y Capps, 1972; Digesti y Weeth, 1976; Grout *et al.*, 2006) atribuyen la mayor disminución de CA al sabor amargo que los SO_4 otorgan al agua, generando rechazo al consumo. Se ha comprobado que los bovinos son más sensibles al sabor amargo, que al salado (Goatcher y Church, 1970).

Por otra parte, cuando consumen sales en exceso a través del agua de bebida, el organismo puede aumentar inicialmente el consumo agua como mecanismo de compensación para excretar las sales excedentes a través de la orina (Church, 1988). Este mecanismo requiere cambios fisiológicos a nivel renal para excretar las sales en exceso y

a la vez la deshidratación (Meintjes y Engelbrecht, 2004). Por lo tanto, el umbral máximo de sales tolerable por los rumiantes, además estará relacionado con su capacidad para activar este mecanismo de eliminación de sales a través de la orina (Kay, 1997).

1.2.3.3 Desempeño productivo

La ganancia de peso en los rumiantes está estrechamente influenciada por el consumo de alimento (NRC, 2000). Una parte importante de los nutrientes ingeridos por el ganado se destina a cubrir los requerimientos de mantenimiento del estado corporal, como funciones vitales (respiración, circulación, digestión, excreción), actividad física, renovación de células y mantenimiento de la temperatura corporal (Cerdas Ramírez, 2013). Una vez cubiertos los requerimientos de mantenimiento, los nutrientes son destinados para cubrir los requerimientos de producción (ganancia de peso). En líneas generales, la ganancia diaria de peso vivo (GDPV) depende de la energía retenida por sobre los requerimientos de mantenimiento del animal, denominada energía neta (Di Marco, 2006). Por lo tanto, un consumo elevado de alimento independientemente del tipo y tamaño animal se traduce en una mayor retención de energía destinada a ganancia de peso.

En el meta-análisis publicado por López *et al.*, (2021) se determinó que la calidad de agua de bebida afecta la GDPV y la eficiencia de conversión (EC) del alimento (Figura 1.3). Como se puede observar en las figuras, la máxima GDPV se alcanzaría dentro del rango de 1,5 a 3,0 g/L de STD en agua. Las concentraciones mayores a 6 g/L producirían una marcada disminución de la ganancia de peso en los animales. De la misma manera se afectaría la EC, disminuyendo alrededor del 20% cuando la concentración de sales se encuentra por encima de los 6 g/L. La mejor EC se encontraría en el rango de 2,0 a 4,0 g/L de STD (López *et al.*, 2021).

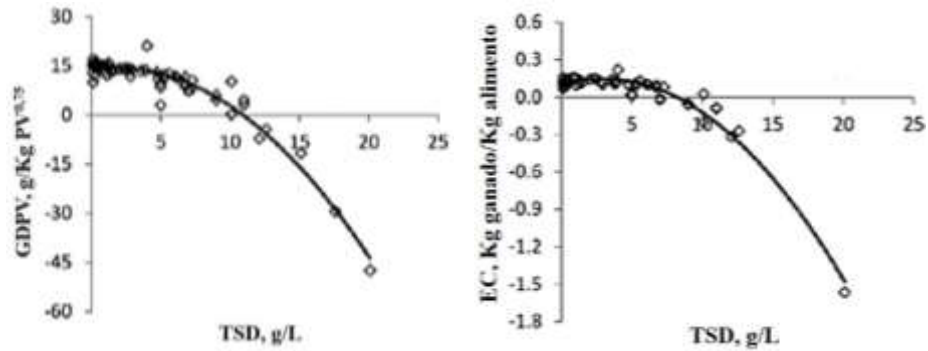


Figura 1.3. Efecto del agua con elevado contenido de sales totales disueltas (STD) sobre la ganancia diaria de peso vivo (GDPV) y sobre la eficiencia de conversión alimenticia (EC) de ganado de carne. Fuente: López *et al.*, 2021.

De acuerdo a los autores, la GDPV se ve afectada por el consumo de sales en mayor magnitud que el CMS (Figura 1.4), lo que indica un efecto negativo sobre la eficiencia de utilización de la energía, que se refleja en la disminución de la EC propia de los animales cuando son expuestos al consumo elevado de sales en agua de bebida.

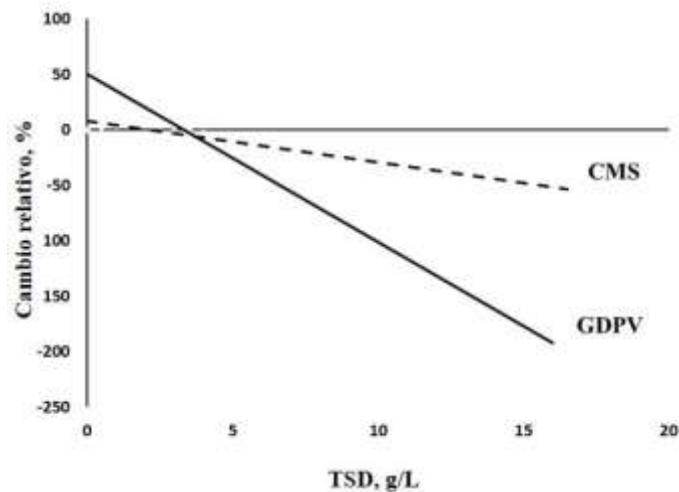


Figura 1.4. Cambio relativo en ganancia diaria de peso vivo (GDPV) y consumo de MS (CMS) en respuesta al incremento de sales totales disueltas (STD) en el agua de bebida (adaptado de López *et al.*, 2021).

Para explicar esta menor eficiencia energética, López *et al.*, (2021) sugieren diversos mecanismos fisiológicos evidenciados cuando los animales consumen

cantidades excesivas de sales. El incremento en la producción de calor por la sobrecarga de excreción de sales ocasiona una pérdida de eficiencia energética. El aumento de transporte activo de iones Na^+/K^+ a través de las membranas representa entre un 20 a 30% del gasto energético de mantenimiento en los animales, debido al gasto de energía consumida en el funcionamiento de la bomba Na/K ATPasa para el mantenimiento del potencial de membrana. Finalmente, el elevado consumo de SO_4 aumenta la concentración del gas H_2S dentro del rumen, el cual puede bloquear la enzima citocromo C oxidasa, alterando negativamente la cadena de transporte de electrones en mitocondria, y afectando de este modo la producción de ATP celular, disminuyendo la energía y por lo tanto afectando la EC energética de los alimentos.

1.2.3.4 Metabolismo del azufre ruminal: bases químicas y microbiológicas

El azufre es un nutriente esencial para la actividad microbiana ruminal, la digestibilidad, la síntesis de aminoácidos esenciales (metionina y cisteína) que influye sobre el desempeño productivo. No obstante, el exceso tiene efectos adversos en la digestión, ganancia de peso diaria y en el desempeño productivo de los rumiantes (Loneragan, *et al.*, 2001).

Los SO_4 consumidos en exceso son reducidos en el rumen por la microbiota ruminal sulforreductora (Figura 1.5), una parte es asimilado para la síntesis de proteína microbiana, otra parte se transforma en H_2S , que se absorbe por la mucosa ruminal e

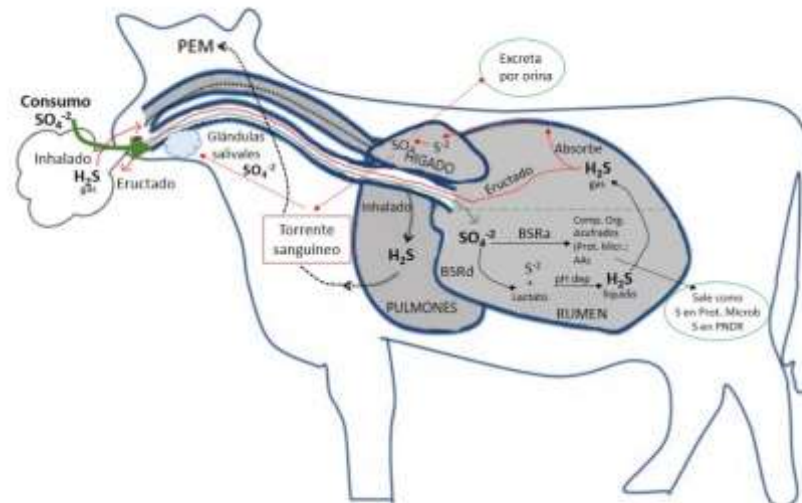


Figura 1.5. Vías metabólicas de los sulfatos (SO_4) y su reducción a sulfuro de hidrógeno (H_2S) ruminal.

Intestinal y el resto es eructado en forma gaseosa (Cebra y Cebra, 2004; Radostits *et al.*, 2007) y posteriormente inhalado por el animal. Los aniones tóxicos derivados del gas inhalado inhiben la enzima citocromo-oxidasa, disminuyendo la producción de ATP (McAllister *et al.*, 1997). Este mecanismo interrumpe la respiración celular y causa hipoxia, con consecuente necrosis neuronal (McAllister *et al.*, 1992; Radostits *et al.*, 2007). Como el sistema nervioso central (SNC) depende de niveles altos e ininterrumpidos de energía, es el principal sistema afectado. En general, la incidencia de PEM es baja, no obstante niveles subclínicos reducen el consumo, impactando sobre la productividad animal (Kung, 2003).

La producción de H_2S es parte del funcionamiento normal de las bacterias del rumen. Las bacterias reductoras de sulfato son anaerobias estrictas y se clasifican en dos grupos: bastones rectos o curvos formadores de esporas, Gram positivas (Campbell y Postgate, 1965); y vibriones móviles o bastones que no producen esporas, Gram negativas (*e.g.* género *Desulfovibrio*; (Postgate y Campbell 1966). Estas bacterias sulforreductoras también se pueden clasificar en asimiladoras y desasimiladoras. Las bacterias

asimiladoras incluyen los géneros *Bacteroides*, *Butyivibrio* y *Lachnospira*. Estas bacterias incorporan el sulfato reducido en los aminoácidos que contienen azufre, y generan cantidades limitadas de H₂S sólo para cubrir sus requerimientos metabólicos. Por su parte, las desasimiladoras usan el sulfato como aceptor final de electrones. Esta reacción es acoplada a la oxidación de lactato, formato o piruvato, de los cuales obtienen el hidrógeno (H) (Ruiz Moreno, 2012). El metabolito primario de las bacterias reductoras de sulfatos es el azufre, y al captar H del exterior de la célula lo convierten en H₂S (Gibson, 1990). La reducción del sulfato requiere una activación previa que involucra la conversión del sulfato en sulfato activado o adenosin-5'-fosfosulfato APS, reacción que requiere ATP y es catalizada por la ATP sulforilasa. Todas las bacterias reductoras de sulfatos requieren 2 moléculas de ATP por molécula de sulfato reducida, por lo tanto, cualquier desacople en los mecanismos de síntesis de ATP producirá una disminución en la reducción de sulfatos (Peck, 1962; Badziong y Thauer, 1980). Los géneros representativos de las bacterias desasimiladoras son *Desulfovibrio* y *Desulphotomaculum*.

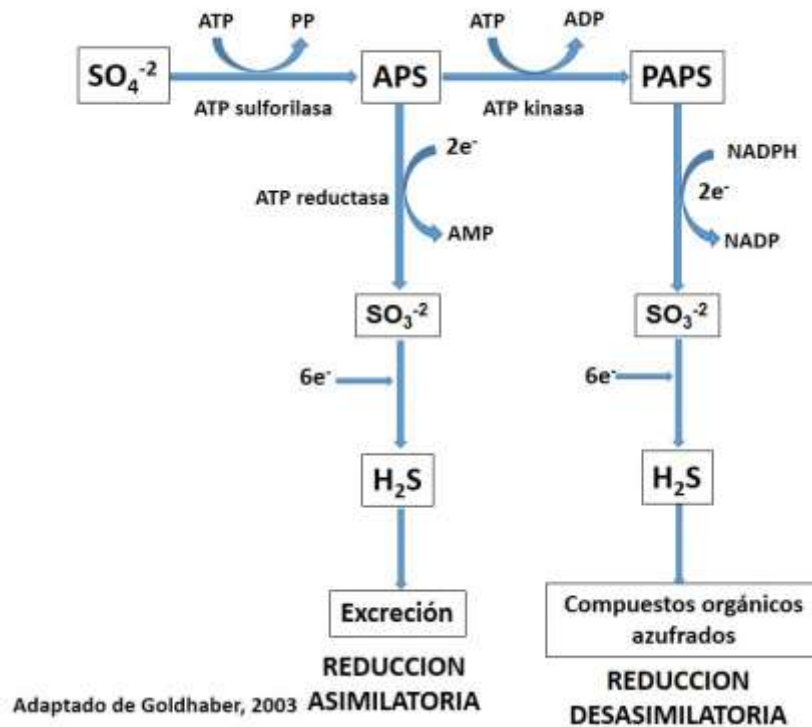


Figura 1.6. Reducción asimilatoria y desasimilatoria de los SO_4 (Adaptado de Goldhaber, 2003).

En base a lo descrito previamente, se puede especular que para disminuir la formación de H_2S en el rumen se podría actuar suprimiendo las poblaciones microbianas responsables del proceso (*e.g.* sulforreductoras desasimilatorias), limitando la disponibilidad de sustratos o desacoplando la generación de energía (lo que directamente impactaría sobre el desarrollo de las poblaciones sulforreductoras). Por ejemplo, disminuyendo las fuentes de hidrógeno disponible evitando el acople de las reacciones de oxidación del lactato, formato, piruvato, o bloqueando el transporte de electrones de las bacterias reductoras de sulfato durante el proceso de respiración anaerobia. Una alternativa para disminuir la disponibilidad de H para el metabolismo microbiano sería identificar sustancias que pudieran favorecer la vía de reducción del fumarato a succinato, de modo de consumir los equivalentes reductores (los iones hidrógeno), y así por

competencia, debido a que las bacterias sulforreductoras no tendrían sustrato disponible, disminuir la producción de H₂S (Asanuma *et al.*, 1999).

Otro aspecto relevante de la reducción del SO₄ es la competencia por el H con las bacterias metanogénicas. Cuando la disponibilidad de SO₄ no es limitante, las bacterias sulforreductoras desvían los flujos de carbono y electrones de la cadena alimenticia de las bacterias metanogénicas. Una pequeña parte de la inhibición de la metanogénesis puede deberse a las bacterias sulforreductoras, ya que utilizarían los H como sustrato (Smart *et al.*, 1986; Cord-Ruwisch *et al.*, 1986). La inhibición de metano por la reducción de SO₄ va a depender de la habilidad de las bacterias sulforreductoras para competir por el H con las metanogénicas (Lovley y Philips, 1987). Kristjansson y Schönheit (1982^a) reportaron que las bacterias reductoras de SO₄ tienen mayor afinidad por el H en comparación con las metanogénicas, y que el mecanismo de reducción del SO₄, puede proporcionar más energía que la reducción de CO₂, por lo que las bacterias sulforreductoras tienen más ventaja que las metanogénicas en condiciones y sustratos apropiados (presencia de lactato y alto contenido de sulfatos) (Kristjansson, 1982b; De Sousa *et al.*, 2008). En un estudio reciente, Zijderveld *et al.*, (2010), observaron que el consumo de nitratos y sulfatos redujo la producción de metano. Estos autores observaron una reducción de 16% en la producción de metano debido a la suplementación con sulfatos.

Por otra parte, ha sido documentado que no solo la biodisponibilidad del S sino también el pH ruminal y la interacción con nutrientes dietarios (*e.g.*, cationes divalentes) juegan un rol de importancia en la sulforreducción.

El proceso de la producción del gas H₂S comienza con la utilización del lactato u otro donante de carbonos por las bacterias sulforreductoras para poder reducir los sulfatos presentes en el rumen. Este proceso genera acetato y sulfuro (Campbell y Postgate, 1965). Dicho sulfuro se combina con los iones hidrógeno presentes para la formación de H₂S en

un proceso pH-dependiente, cuyo pKa es 7,04, resultando en una mayor reducción de los sulfatos en condiciones de dietas con alto contenido de concentrados (Beauchamp *et al.*, 1984), a diferencia de la baja susceptibilidad de los animales a los incrementos del azufre en la dieta, cuando consumen dietas con alto contenido de forraje (NRC, 1996).

Otro efecto que puede ser ocasionado por el mayor consumo de sulfatos proveniente del agua o alimento es la deficiencia de cobre (Suttle, 1974). Los requerimientos de cobre se incrementan por la mayor concentración de azufre y molibdeno (NRC, 2005), debido a que tienen una relación antagónica. En rumen, la presencia de azufre y molibdato en exceso, promueve la formación de tiomolibdato. El cobre, al tener afinidad para reaccionar con el tiomolibdato forma complejos insolubles que son pobremente absorbidos (Suttle, 1991). Independientemente de la interacción cobre-tiomolibdatos, en intestino la absorción de cobre puede ser reducida por la presencia de azufre a través de la formación de sulfuro de cobre (Suttle, 1974). Se ha observado que reduciendo el contenido de SO_4 del agua de bebida de 500 a 42 mg L^{-1} a través de ósmosis inversa se incrementa la disponibilidad de cobre en el ganado (Smart *et al.*, 1986).

El consumo elevado de SO_4 está asociado positivamente con la productividad de H_2S . Desde el punto de vista productivo se especula que a través de la manipulación de la población de bacterias sulforreductoras se podría disminuir la producción de este gas, influyendo positivamente sobre el consumo de alimento y la productividad animal. La ingesta de compuestos presentes en especies nativas del bosque Chaqueño con capacidades para alterar la población de bacterias sulforreductoras y/o las vías metabólicas ruminales del azufre tendrá un impacto en la producción de H_2S en rumen y en forma indirecta sobre la metanogénesis.

1.2.4. Alternativas para mejorar la utilización de aguas con elevado contenido de sulfatos

1.2.4.1 Adaptación a aguas con elevado tenor salino

En la bibliografía existe información sobre la adaptación de corto y largo plazo de los animales a aguas con elevados tenores de sales, no obstante, depende del tipo de sales y la dieta.

En el corto plazo, la adaptación de la microbiota sulforreductora a la presencia de SO_4 en el medio incrementa la posibilidad de reducirlo para posibilitar la utilización (Hungate, 1966). Por esta razón, altas concentraciones de SO_4 en el agua de bebida deprimen el consumo de agua y alimento durante las primeras semanas de adaptación (Church, 1993). Además, existe la posibilidad que el consumo de aguas con altos contenidos de SO_4 produzca la formación de precipitados de calcio (Ca^{+2}), cobre (Cu^{+2}) o magnesio (Mg^{+2}) en el rumen, generando deficiencias de estos cationes esenciales para el metabolismo microbiano y digestión ruminal. En este sentido Guineo-Alvarado (2012), en un estudio con novillos durante la etapa de adaptación a la dieta observaron que, aun con niveles de sales totales disueltas en agua de 12 g/l, a partir del día 13 en adelante el consumo de materia seca y agua no difirieron respecto al agua de 2 g/l (Figura 1.7)

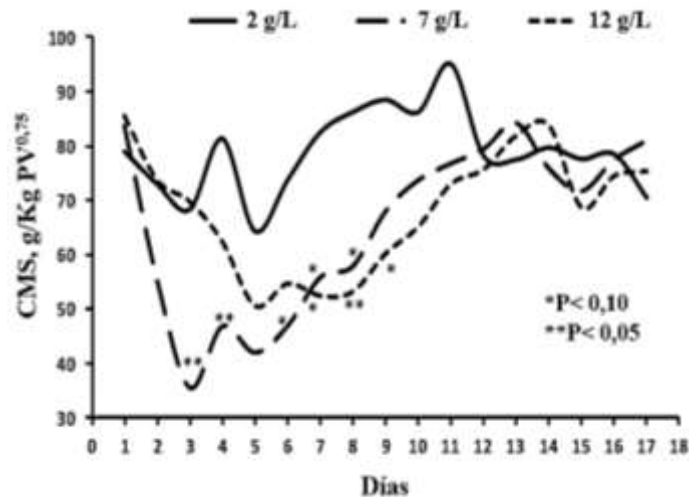


Figura 1.7. Consumo de materia seca (CMS) diario de novillos consumiendo agua con diferente concentración (2 g/L; 7 g/L; 12 g/L) de sales totales disueltas (STD).

Por otro lado, existe poca información acerca de la variación en poblaciones microbianas ruminales en la adaptación a elevadas cantidades de sales a través del alimento o del agua, y dentro de la información existente hay variabilidad en los resultados, los cuales se atribuyen a los diferentes ambientes experimentales (*in vitro* - *in vivo*) donde se llevaron a cabo los experimentos. Valtorta *et al.*, (2008) no observaron efectos sobre las poblaciones bacterianas ni en protozoarios en vacas Holando que bebieron agua con un contenido de STD de hasta 10.000 mg/l STD, mientras que Coria *et al.*, (2007) evaluaron degradabilidad *in vitro* de Agropiro alargado (*Thinopyrum ponticum*) con concentraciones de sales elevadas de hasta 7.000 mg/l STD y registraron disminución de la actividad microbiana *in vitro*. En un estudio reciente, Castro *et al.*, (2021) evaluaron el efecto de dos dietas con bajo nivel de S y con elevado nivel de S en novillos sobre la concentración de H₂S, parámetros de fermentación ruminal y poblaciones microbianas. Dichos autores evidenciaron diferencias significativas en la concentración de H₂S, mientras que en los demás parámetros no vieron efectos

significativos. Tampoco registraron una correlación entre las BSR y la concentración de H₂S.

La adaptación de largo plazo o modificación permanente para lograr una mejor utilización del agua y en consecuencia un mejor desempeño animal está generalmente fijado genéticamente, no obstante, experiencias a edades tempranas pueden generar cambios neurológicos, morfológicos y fisiológicos mejorando en consecuencia la respuesta de un individuo de forma permanente (Provenza y Balph, 1990; Provenza, 1995; Provenza *et al.*, 1998). Los mecanismos relacionados al balance hidro-mineral son factibles de ser alterados bajo diferentes desafíos perinatales durante ciertos períodos críticos de la ontogenia en los animales (Arguelles *et al.*, 2000; Mecawi *et al.*, 2009, 2015). Kathleen *et al.* (2004) demostraron que la exposición a distintos niveles de cloruro de sodio durante la gestación y a edades tempranas generó cambios profundos y perdurables sobre el comportamiento y la fisiología de la regulación de los fluidos corporales en ratas.

En la actualidad no existe abundante información sobre la adaptación de rumiantes al consumo de agua con elevados tenores salinos. López *et al.*, (2016) realizaron dos experimentos donde estudiaron cómo afecta la exposición temprana al consumo de agua con elevados tenores salinos. El primer experimento se realizó con vacas con terneros de 2 meses de edad al pie, los cuales fueron destetados a los 60 d y continuando el ensayo hasta los 105 d. Los animales fueron agrupados en dos tratamientos según la calidad de agua que bebieron: agua de bajo tenor salino y agua de elevado tenor salino. Al finalizar el primer período, todos los terneros consumieron agua de bajo tenor salino durante 6 meses. Cuando comenzó la etapa de recría, los animales fueron alojados en corrales individuales y sometidos al consumo de agua con elevado contenido de sales. El segundo

experimento se llevó a cabo con vacas en los últimos 30 días de gestación hasta 45 de lactación, y luego 60 días con los terneros destetados, agrupados en dos tratamientos: agua de bajo tenor salino y agua de elevado tenor salino. Culminado el primer período del ensayo, los animales consumieron agua de buena calidad, hasta la recría donde todos fueron alojados en corrales individuales y expuestos a consumir agua de bebida con alto contenido salino. Los autores no encontraron evidencia que corrobore que la exposición temprana del ganado al consumo de agua con elevado contenido de sales mejore el desempeño en la vida adulta cuando se enfrentan a aguas de similares características. Sin embargo, los animales que fueron expuestos tempranamente al consumo de agua salada, demostraron un consumo de agua reducido (experimento 1), lo que demostraría que la exposición temprana tiene potencial para producir cambios fisiológicos relacionados con la regulación del consumo de agua, reduciendo los niveles de renina, la cual actúa en la sensación de sed a nivel hipotálamo. Por otro lado, en el experimento 2, registraron un incremento en el umbral de sed de los animales expuestos tempranamente al consumo de agua salada, lo que demuestra que es necesario seguir abordando este tipo de estudios para comprender mejor los mecanismos fisiológicos de adaptación de los rumiantes al consumo de agua con elevado tenor salino.

1.2.4.2 Manipulación dietaria

1.2.4.2.1 Tipo y calidad de la dieta

Varios estudios (Sager y Casagrande, 1998; López *et al.*, 2014; Roldan *et al.*, 2018) muestran claramente la interacción entre la digestibilidad de la dieta y el tipo de dieta con el agua de bebida de calidad marginal y su relación con contenidos elevados de azufre.

Sager y Casagrande (1998) y Roldan *et al.*, (2018) observaron un incremento en el consumo de agua salobre y de la materia seca con el incremento de la digestibilidad del forraje. Roldan *et al.*, (2018) evaluaron el efecto de agua de bajo tenor salino vs agua de elevado tenor salino sobre cuatro dietas de digestibilidad variable: baja digestibilidad, media baja digestibilidad, media alta digestibilidad y alta digestibilidad. Estos autores encontraron que en las dietas de baja y media baja digestibilidad, el consumo de alimento y agua fue menor con agua salina. Mientras, que en las dietas media alta y alta digestibilidad tanto el consumo de agua como de alimento fueron afectados negativamente por el agua salina. Además, los autores observaron una respuesta similar en el consumo de materia orgánica digestible (CMOD), no observándose respuesta al incremento en digestibilidad en la producción de H₂S. Cabe destacar que en este estudio las diferencias en digestibilidad de las dietas formuladas fueron generadas mediante el aumento de ingredientes con fibra digestible y no mediante la inclusión de ingredientes a base de carbohidratos no fibrosos (almidón, azúcares).

Cuando los rumiantes consumen forraje de baja calidad, activan mecanismos fisiológicos que les permiten reciclar nitrógeno (N), incorporándolo nuevamente al rumen a través de la sangre y saliva para la síntesis de proteína microbiana (Wickersham *et al.*, 2004). En este mecanismo, el riñón es un órgano clave debido a que genera cambios en el funcionamiento fisiológico que le permite disminuir la excreción de N urinario y urea-N (Silanikove, 1984; Marini *et al.*, 2004). Sin embargo, cuando los animales alimentados con forraje de baja calidad consumen agua con elevado tenor salino, los mecanismos de reciclado de N pueden ser afectados, debido a que es necesario eliminar el exceso de sales a través de la orina junto con el N urinario y urea-N. La suplementación proteica es una de las estrategias nutricionales más desarrolladas que ha demostrado frecuentemente

mejorar la eficiencia de utilización de los forrajes deficientes en proteína y la retención de N por los rumiantes (Köster *et al.*, 1996; Mathis *et al.*, 2000; Wickersham *et al.*, 2008).

López *et al.*, (2014) estudiaron el efecto de la suplementación proteica (harina de soja) junto a forraje de baja calidad (gaton panic) en novillos expuestos al consumo de agua de bebida con bajo contenido de sales y con elevado contenido de sales. Los autores demostraron que la suplementación con harina de soja contrarrestó el efecto perjudicial que genera el consumo de agua salina, incrementando el consumo de forraje de baja calidad cuando se incrementó la suplementación proteica, alcanzando hasta un 40% de incremento en la mayor dosis de suplemento. De la misma manera, Wickersham *et al.*, (2004) demostraron que la suplementación proteica estimula el consumo de forraje de baja calidad, debido a que incrementa la digestión y la tasa de pasaje cuando se le proporcionó proteína degradable en rumen a novillos consumiendo heno de baja calidad.

Ante el consumo de elevados tenores de sulfatos, el tipo de alimento o fuente de carbohidratos interactúa de forma diferencial con el metabolismo de los sulfatos como fue descrito previamente (Sección 1.2.3.4). La inclusión de carbohidratos no fibrosos tiende a generar un ambiente ruminal más favorable para producción de H₂S (i.e., reducción de pH y aumento de lactato), por lo tanto, un incremento o mejora en la calidad de la dieta mediante niveles crecientes de concentrados, si bien incrementan la digestibilidad de la dieta podrían impactar negativamente sobre el consumo y el desempeño animal.

En este sentido Wolf (2019) evaluó el efecto de la suplementación energética proteica (tres niveles de suplementación con grano y dos niveles de suplementación proteica) en ovinos bebiendo agua con alto tenor salino alimentados con heno de mediana-baja calidad. En este estudio observaron un incremento cuadrático en el consumo total

por la suplementación energético proteico. Mientras que la producción de H₂S se ubicó por debajo de los niveles subclínicos reportados en todos los tratamientos.

1.2.4.2.2 *Compuestos secundarios*

La inhibición del proceso de reducción del exceso de SO₄ a H₂S ruminal mediante metabolitos secundarios (i.e., taninos, saponinas, y aceites esenciales) con propiedades antimicrobianas presentes en las plantas puede mejorar el desempeño de animales bebiendo agua con alto contenido de sulfatos (Wallace, 2004). El proceso de sulforreducción ruminal es dependiente de la biodisponibilidad del azufre, el pH ruminal, y la interacción con nutrientes dietarios (e.g., cationes divalentes). La producción del gas H₂S comienza con la utilización del lactato u otro donante de carbonos por las bacterias sulforreductoras para poder reducir los sulfatos presentes en el rumen, proceso en el cual se genera acetato y sulfuro (Campbell y Postgate, 1965). Dicho sulfuro se combina con los iones H presentes para la formación de H₂S en un proceso pH-dependiente, cuyo pKa es 7,04, resultando en una mayor reducción de los sulfatos con dietas energéticamente concentradas, características de pH ruminal ácido (Beauchamp *et al.*, 1984).

En general el modo de acción de estos grupos de metabolitos secundarios está asociado a i) precipitación de proteínas del alimento o microbianas, ii) interacción con las membranas de distintos grupos microbianos ruminales, y iii) formación de complejos con nutrientes entre otros (Birbal *et al.*, 2003; Wallace *et al.*, 2004; Dermitas *et al.*, 2018).

Las especies de plantas nativas del Chaco Argentino son una fuente potencial de compuestos secundarios que podrían actuar como moduladores de la reducción de sulfatos en el rumen. Chifa y Ricciardi (2000) en un estudio exploratorio de especies nativas del Chaco Argentino, observaron la presencia de antraquinonas naturalmente

presentes en ciertas leñosas. En un estudio similar, Rossi *et al.* (2007) detectaron presencia de taninos y saponinas en especies nativas de ramoneo en el bosque chaqueño xerofítico. García *et al.*, (2017) evaluaron 8 especies de plantas leñosas del Chaco Semiárido Argentino y encontraron presencia de taninos condensados (TC) con distinta actividad biológica, en un rango que varía desde 2,8 a 19,59% de concentración total de TC, clasificando a las especies en diferentes categorías, *Schinopsis lorentzii* (QC) con alto contenido (19,59%), *Prosopis alba* (PA), *Prosopis nigra* (PN), *Caesalpinia paraguariensis* (CP), *Ziziphus mistol* (ZM) y *Acacia aroma* (AA) con contenidos intermedios (6,15-12,03%) y *Gossypium hirsutum* (GH), *Parkinsonia praecox* (PP) y *Larrea divaricata* (LD) con bajos contenidos (2,58 – 4,27%). Los autores observaron alta actividad biológica de los TC de las especies AA, LD, y PA, sin correlacionarse necesariamente con la concentración de TC *per se*. En este sentido, QC y ZM tuvieron una mayor concentración de TC, no obstante sus capacidades para precipitación de proteína fueron bajas. En este ensayo, García *et al.*, (2017) sugieren que las especies nativas con menos de 7% de TC podrían ser utilizadas en sistemas de pastoreo, debido a los beneficios que aporta el consumo de forraje con contenido intermedio de TC por parte de los rumiantes; sin embargo, especies con altas concentraciones de TC no sería apropiado para la alimentación del ganado.

1.2.4.2.2.1. Taninos

Los taninos son compuestos fenólicos secundarios de elevado peso molecular (500 a > 20000) presentes en la naturaleza, que se encuentran frecuentemente en frutas, árboles, en forrajeras templadas, principalmente leguminosas, y otras especies como sorgo, utilizadas comúnmente en la alimentación del ganado (García, 2015). De acuerdo a su estructura química, los taninos pueden ser clasificados en dos grupos: taninos

hidrolizables (TH), que consisten en un núcleo central de carbohidratos al que se unen los ácidos carboxílicos fenólicos por enlace éster (Figura 1.8); y los taninos condensados (TC) que consisten en oligómeros de dos o más flavan-3-oles, como catequina, epicatequina o el correspondiente galocatequina (Figura 1.9) (Scalbert, 1991; Makkar, 2003; Makkar, 2007). Dos de los tipos más comunes son las procianidinas y las prodelfinidinas, caracterizadas por cadenas lineales de flavan-3-oles unidos por enlaces C₄-C₈. Sin embargo, en algunas especies se ha encontrado que estos polímeros también pueden constar de dos enlaces C-C en la molécula. Como consecuencia de esta diversidad, estos polímeros se pueden clasificar en base a la proporción de monómeros *cis* y *trans*, lo que refleja la proporción de epicatequina y catequina (García, 2015). Asimismo, las estructuras de los TC de diferentes especies a menudo difieren en la proporción de subunidades trihidroxiladas, relación de monómeros *cis-trans* y el grado de polimerización. Las longitudes de estos polímeros suelen variar a partir de un grado de polimerización de dos a más de veinte unidades, y pueden variar, incluso dentro del mismo género (Scioneaux *et al.*, 2011).

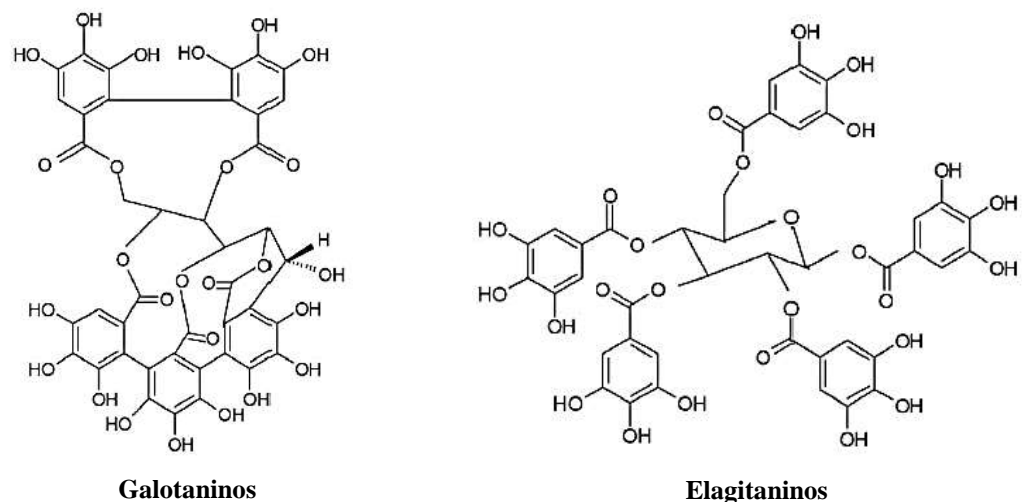


Figura 1.8. Estructura de taninos hidrolizables. Adaptado de Makkar, 2007.

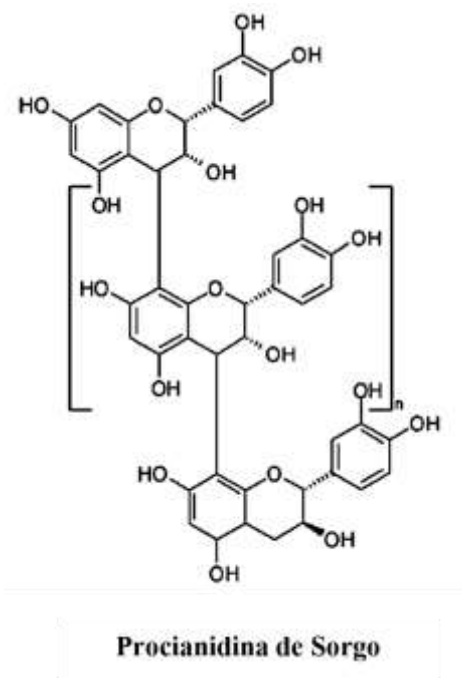


Figura 1.9. Estructura de tanino condensado. Adaptado de Makkar, 2007.

La actividad biológica de los TC está determinada por una combinación de factores que incluyen peso molecular, grado de polimerización de la molécula, estereoquímica, hidroxilación y grupos funcionales contenidos en el compuesto polifenólico. Además, la actividad de los TC también está relacionada con su capacidad para formar complejos con otras macromoléculas como lípidos e hidratos de carbono (Smith *et al.*, 2005). Esta capacidad de los TC para unirse a otras moléculas constituye el aspecto más importante para comprender los efectos que se les atribuyen sobre los procesos digestivos.

El interés por el estudio de los TC se debe a que se considera que tienen efectos tanto adversos como efectos beneficiosos en función de su concentración y la naturaleza, además de otros factores como las especies animales, estado fisiológico del animal y composición de la dieta (Makkar, 2003). Los TC han mostrado efectos inhibitorios de la reducción de sulfatos. Scalbert (1991) observó actividad bacteriostática o bactericida

asociada al uso de taninos, sobre especies involucradas en la reducción de sulfatos (*e.g.* *Desulfomaculum nigrificans*, *Desulfovibrio spp.*). Por su parte, Whitehead *et al.*, (2012) demostraron que la adición de 0,5% (p/v) de taninos de quebracho redujo en más del 90% la producción de H₂S en incubaciones *in vitro* de muestras de estiércol de cerdos que simularon las condiciones anaeróbicas de los estercoleros de los criaderos de cerdos. Los taninos son compuestos polifenólicos que ejercen su actividad antimicrobiana fundamentalmente por la formación de complejos con enzimas (*e.g.* inhibición de celulasas, pectinasas, xilasas, peroxidasas, lacasas, glicotransferasas) o sustratos (*e.g.* coagulación de proteínas y formación de complejos con otras biomoléculas). Scalbert (1991) demostró que los taninos también pueden ejercer efectos sobre la membrana de los microorganismos, inhibiendo el transporte de electrones. Además pueden formar complejos con iones metálicos, reduciendo la disponibilidad de metales esenciales para los microorganismos.

1.2.4.2.2.2. Saponinas

Las saponinas son metabolitos secundarios que constituyen una gran familia de compuestos que se encuentran en muchos géneros de plantas. Químicamente, las saponinas son glucósidos de alto peso molecular en los que un triterpeno o aglicona esteroidea está unido a una o más cadenas de azúcares (Heng *et al.*, 2006). La cantidad de azúcares, el tipo de azúcares y la estereoquímica de los restos de aglicona pueden variar produciendo una diversa gama de metabolitos en esta clase de compuestos, lo que podría explicar la variabilidad en la potencia de los efectos biológicos (Wallace *et al.* 2002; Patra y Saxena, 2010).

El papel fisiológico de las saponinas en las plantas aún no está completamente comprendido. Si bien hay una serie de publicaciones describiendo su identificación en

plantas, y sus múltiples efectos en las células animales y en hongos y bacterias, sólo unos pocos han abordado su función en las células vegetales (Francis *et al.*, 2002).

Diversos estudios demostraron que las saponinas y plantas que contienen saponinas inhiben a los protozoos del rumen (Valdez *et al.*, 1986; Wallace *et al.*, 1994; Newbold *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1998). En otro experimento, Francis *et al.*, (2002) demostraron que las saponinas contenidas en semillas de *Trigonella foenum-graecum* evidenciaron propiedades antimicrobianas y suprimieron el crecimiento de protozoos ciliados, bacterias productoras de peptidasa y bacterias celulolíticas en el rumen. La actividad antiprotozoaria de las saponinas es el efecto más consistente en el ecosistema del rumen, sin embargo, no está claro si todas las especies de protozoos son igualmente sensibles (Patra y Saxena, 2010). Las saponinas forman complejos con el esterol en la membrana celular de los protozoos, causando destrucción de las membranas celulares, lo que podría explicar el efecto antiprotozoario de las saponinas (Francis *et al.*, 2002).

El crecimiento bacteriano en el rumen también se ve afectado por la presencia de saponinas, debido al efecto directo sobre bacterias y hongos y / o inhibición de protozoos, sin embargo, no todas las especies de bacterias y hongos del rumen se ven influenciados por igual (Patra y Saxena, 2010). Estos efectos son interesantes para ser estudiados sobre la producción de sulfuro de hidrógeno ruminal, sin embargo, en un trabajo reciente, Wu *et al.*, (2019) testearon el efecto de saponinas de *Quillaja saponaria* sobre la reducción de H₂S y sobre las poblaciones sulforreductoras en un experimento *in vitro*, evidenciando un aumento en la producción del H₂S sin afectar las poblaciones reductoras de sulfatos. Estos resultados inconsistentes pueden deberse a múltiples factores, principalmente a la dosis de saponinas utilizada, por lo que se debe seguir estudiando los efectos de este metabolito secundario.

1.2.4.2.2.3. Aceites esenciales

Los aceites esenciales son mezclas de metabolitos secundarios obtenidos de la fracción volátil de la planta por destilación al vapor (Calsamiglia *et al.*, 2007) y se caracterizan por tener una composición, naturaleza y actividades muy diversas. Los aceites esenciales generalmente son mezclas complejas de hasta más de 100 componentes que pueden ser: Compuestos alifáticos de bajo peso molecular (alcanos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres y ácidos); monoterpenos; sesquiterpenos y fenilpropanos y se pueden clasificar según consistencia, origen y naturaleza química de los componentes mayoritarios (Martínez, 2001). Dichos compuestos pueden ser extraídos de muchas partes de las plantas, incluyendo hojas, flores, tallos, semillas, raíces y corteza. Sin embargo, la composición de los aceites esenciales puede variar entre las diferentes partes pertenecientes a una misma planta (Dorman y Deans, 2000)

Los aceites esenciales pueden ejercer su actividad antimicrobiana mediante la interacción con la membrana celular bacteriana, alterando el transporte de electrones, gradientes iónicos, translocación de proteínas, fosforilación, y otras reacciones dependientes de enzimas (Ultee *et al.*, 1999; Dorman y Deans, 2000). Estos modos de acción de los aceites esenciales son más efectivos en las bacterias Gram negativas, donde los compuestos hidrofóbicos de dichos aceites esenciales pueden interactuar directamente con la membrana celular debido al bajo peso molecular de los aceites, lo que les permite interactuar con el agua (a través de puentes hidrógeno), cruzar la pared celular por difusión lenta a través de la capa de lipopolisacáridos o a través de proteínas de la membrana e interactuar con la bicapa lipídica de las células (Calsamiglia, 2007). En la actualidad no existen trabajos donde hayan testado el efecto de los aceites esenciales sobre la producción de sulfuro en rumen.

En base a lo descrito previamente, se puede especular que para disminuir la formación de H_2S en el rumen se podría actuar suprimiendo las poblaciones microbianas responsables del proceso (*e.g.* sulforreductoras desasimilatorias), limitando la disponibilidad de sustratos o desacoplando la generación de energía (lo que directamente impactaría sobre el desarrollo de las poblaciones sulforreductoras).

Otro aspecto relevante de la reducción del sulfato es la competencia por el H con las bacterias metanogénicas. Cuando la disponibilidad de sulfatos no es limitante, las bacterias sulforreductoras desvían los flujos de carbono y electrones de la cadena alimenticia de las bacterias metanogénicas.

1.3 Hipótesis

La disminución en el desempeño productivo en rumiantes debido a aguas con elevado contenido de SO_4 se la relaciona con la limitación del consumo de agua y alimento provocada por la reducción del exceso de S a H_2S . De la revisión de antecedentes surge que niveles de H_2S gaseoso en el rumen superiores a 2000 ppm limitan el consumo por una reducción en la motilidad ruminal y toxicidad mediante la inhalación pulmonar del H_2S en rumiantes. Los compuestos secundarios en general y los presentes en plantas nativas del bosque Chaqueño pueden tener acción antimicrobiana y/o intervenir en las vías metabólicas del azufre disminuyendo la producción *in vitro* de H_2S . En base a lo previamente descrito se deriva la siguiente hipótesis de trabajo:

La inclusión dietaria de hojas de plantas nativas del bosque Chaqueño que contienen compuestos bioactivos (i.e., taninos, saponinas, etc.) mejorará el desempeño de los rumiantes que beben agua con elevado contenido de sulfatos, debido a que actuarán inhibiendo la reducción de sulfatos a sulfuro de hidrógeno ruminal.

1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivo general

El objetivo general fue explorar el impacto sobre consumo, digestión y fermentación ruminal de los compuestos secundarios de especies nativas con potencial inhibidor de la reducción ruminal de sulfatos para mejorar la tolerancia de los rumiantes a las aguas de bebida con elevados contenidos de sulfatos.

1.4.1 Objetivos específicos

1. Identificar especies nativas que contribuyan a mitigar la producción de sulfuro de hidrógeno ruminal *in vitro*.
2. Determinar la presencia de compuestos secundarios en las especies vegetales seleccionadas por inhibición de la producción de H₂S.
3. Establecer la dosis mínima necesaria de los materiales vegetales seleccionados para disminuir la formación del H₂S en rumen.
4. Determinar el impacto de las especies identificadas sobre el consumo de agua y alimento, digestibilidad, balance de nitrógeno y producción de H₂S en corderos que expuestos a agua con elevados tenores de sulfatos.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23

CAPITULO 2

Exploración del potencial inhibidor de producción
de H₂S de especies nativas

Resumen

El SO_4 del agua, en el rumen, se reduce a sulfuro de hidrógeno (H_2S), lo que afecta negativamente la ingesta de alimento y la ganancia de peso vivo. Los metabolitos secundarios presentes en el follaje o los frutos de las especies leñosas nativas podrían reducir la producción ruminal de H_2S y metano (CH_4), debido a las propiedades antimicrobianas que alteran la población de bacterias reductoras de sulfato y / o metanogénicas. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue identificar especies leñosas nativas de la región noroeste de Argentina que podrían tener un efecto inhibitor potencial sobre el H_2S y el CH_4 . Hojas de las especies *Caesalpinia paraguariensis* (CP), *Celtis tala* (CT), *Acacia furcatispina* (AF), *Larrea divaricata* (LD), *Geoffroea decorticans* (GD), *Prosopis nigra* (AN), *Prosopis alba* (PA), *Ziziphus mistol* (ZM), *Schinopsis quebrachocolorado* (SQ) y *Acacia aroma* (AA) se recolectaron e incubaron durante 24 h para evaluar la producción de gas *in vitro*. Se añadió sulfato de sodio a una tasa de 1,2% de azufre (S) elemental a todos los tratamientos. El diseño experimental fue completamente al azar. LD, ZM, AA y PA mostraron la menor producción de gas H_2S . Con respecto al CH_4 , LD se destaca por encima de todas las demás especies evaluadas. En conclusión, las especies nativas del noroeste argentino presentan un potencial efecto inhibitor que podría mejorar el uso de agua con alto contenido de sulfato por parte de los rumiantes. Según estos resultados, LD, ZM, PA y AA fueron las especies más prometedoras para futuras investigaciones.

2.1. Introducción

Con el avance de la ganadería hacia regiones áridas y semiáridas subtropicales del mundo, el ganado frecuentemente está expuesto al consumo de agua con altos tenores de sales totales (FAO, 2007). Las principales limitaciones del agua con alto contenido de sales son la reducción del consumo de alimento y agua, y como consecuencia de esto, afecta el desempeño productivo animal (Patterson *et al.* 2003; Ward y Patterson 2004; Grout *et al.* 2006). En particular, los altos niveles de sulfato de sodio (Na_2SO_4) reducen la ingesta de agua y alimento en aproximadamente un 30% y, en consecuencia, el aumento de la ganancia de peso (Weeth y Hunter 1971; Loneragan *et al.* 2001). Una exposición prolongada a dietas o aguas de bebida con alto contenido de SO_4 puede aumentar la producción ruminal de H_2S . La producción ruminal de H_2S causa, en casos graves, la enfermedad conocida como polioencefalomalacia (PEM; Vanness *et al.*, 2009). Sin embargo, consumos moderados de SO_4 – por alimento o agua de bebida – reducen el desempeño productivo de los animales (alrededor del 15%) sin manifestar PEM aguda (Drewnoski y Hansen 2013).

La producción de H_2S es parte del producto del metabolismo regular de las bacterias reductoras de azufre (SRB) en el rumen. La ingesta elevada de sulfatos se asocia con un aumento de la concentración ruminal de H_2S . Estudios previos (Dougherty *et al.*, 1965; Bird 1972; Kandyliis 1984; McAllister *et al.*, 1992) demostraron que el aumento de producción del gas H_2S causa una reducción en la motilidad ruminal, aumentando el tiempo de retención y disminuyendo el consumo de alimento. Las especies nativas del bosque del Chaco ricas en ciertos metabolitos biológicamente activos (García *et al.*, 2017) podrían afectar la producción de H_2S ruminal y la metanogénesis, debido a sus propiedades antimicrobianas (Wallace 2004). En este sentido, se hipotetiza que los metabolitos secundarios de las especies nativas pueden alterar las poblaciones de SRB y

/ o metanogénicas, así como las vías metabólicas ruminales del azufre (Wallace 2004). Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue explorar el potencial del follaje de especies nativas para reducir la producción ruminal de H₂S y CH₄ *in vitro*.

2.2. Materiales y Métodos

El experimento se llevó a cabo en el Laboratorio de Forrajes y Nutrición Animal del EEA INTA Santiago del Estero, Argentina. Se utilizaron dos novillos fistulados y canulados para recolectar licor ruminal para fermentación *in vitro*, manejados según los protocolos recomendados en la guía para el cuidado y uso de animales de experimentación (INTA 2013).

2.2.1. Recolección y preparación de muestras

Se recolectaron muestras de especies nativas regionales seleccionadas en base a la participación y uso potencial en dietas de rumiantes de acuerdo con lo indicado por Catán *et al.*, (1999) y Rossi *et al.*, (2007), así como el contenido de compuestos potencialmente bioactivos. Para nuestro estudio exploratorio, se muestrearon tres sitios aleatorios diferentes en el Campo Experimental “Francisco Cantos” del INTA EEA Santiago del Estero geográficamente ubicado en 27°47’3,91” S y 64°16’2,21” O, en los meses de noviembre y diciembre del 2013. y se tomaron hojas de las siguientes especies: *Caesalpinia paraguariensis* (Familia: Fabaceae; nombre común: Guayacán, CP), *Celtis tala* (Familia: Cannabaceae; nombre común: Tala, CT), *Acacia furcatispina* (Familia: Fabaceae; nombre común: Garabato, AF), *Larrea divaricata* (Familia: Zygophyllaceae; nombre común: Jarilla, LD), *Geoffroea decorticans* (Familia: Fabaceae; nombre común: Chañar, GD), *Prosopis nigra* (Familia: Fabaceae; nombre común: Algarrobo negro, PN), *Prosopis alba* (Familia: Fabaceae; nombre común: Algarrobo blanco, PA), *Ziziphus mistol* (Familia: Rhamnaceae; nombre común: Mistol, ZM), *Schinopsis quebracho-*

colorado (Familia: Anacardiaceae; nombre común: Quebracho Colorado, SQ) y *Acacia aroma* (Familia: Fabaceae; nombre común: Tusca, AA). Se trazó una transecta de 100 m de longitud aproximada en cada sitio y se eligieron al azar tres plantas por especie - a lo largo de la transecta – y cada una fue muestreada por estratos (superior, medio e inferior) obteniendo una muestra compuesta de aproximadamente 700 a 1000 g por planta y por sitio, dando como resultado 3 muestras por especie.



Figura 2.1. Especies nativas recolectadas seleccionadas en base a la participación y uso potencial en dietas de rumiantes.

Las muestras se secaron en un horno de aire forzado a 55 ° C hasta alcanzar un peso constante y se molieron a 1 mm (Wiley Mill N° 4, Thomas Scientific, Swedesboro, NJ). El análisis para la determinación de materia seca (MS) se realizó mediante método gravimétrico según AOAC (1980) por duplicado. Para la determinación, se pesaron 0,5 g de muestra molida y homogenizada en crisoles previamente desecados; se llevaron a estufa a 100-105 °C durante 24 h. Luego se dejaron enfriar en desecador y se pesaron.

Los porcentajes de materia seca se expresaron como g MS/ 100 g muestra. Posteriormente dichos crisoles con las muestras fueron incineraron durante 3 h a 600 ° C en una mufla para determinar contenido de cenizas.



Figura 2.2. Esquema de procesamiento de las hojas de especies nativas recolectadas.

La proteína bruta (PB) se determinó mediante el método Kjeldahl (AOAC, 1984), el cual consiste en pesar 0,5 g de cada muestra y colocar en el tubo de digestión. Luego se adicionó 15 g de Sulfato de potasio (SO_4K_2), 1 ml de Sulfato de cobre 10% (SO_4Cu 10%) y 25 ml de ácido Sulfúrico concentrado (SO_4H_2 concentrado) y se colocó en digestor a 450°C durante 2 h. Luego de transcurrido ese tiempo, se retiraron los tubos del digestor y se dejó enfriar hasta que la solución se tornó incolora y translúcida. Se agregaron 20 ml de agua destilada, agitando 2 – 3 veces cada 5 minutos para evitar que se formen cristales grandes de Sulfato de potasio. Una vez fría la solución de cada muestra, se comenzó con la destilación. Se colocó el tubo de la muestra digerida en el destilador y un erlenmeyer con 25 ml de ácido bórico al 2%. Luego se dosificó hidróxido de sodio 40% hasta neutralizar la solución (el color de la solución del tubo pasa de incoloro-blanco a marrón o celeste) y se destiló hasta recoger 150 ml aproximadamente en el erlenmeyer. Dicha solución destilada posteriormente se tituló con ácido sulfúrico 0,1 N hasta cambio de color verde a rosa intenso, registrando la cantidad de ácido utilizado.

El contenido de proteína bruta se calculó con las siguientes formulas:

$$\mathbf{Nt (\%bs) = \frac{(T1 - Tbco) \times 1,4 \times N \text{ SO}_4\text{H}_2}{MH1 \times MS105}}$$

$$\mathbf{PB (\%bs) = Nt (\%bs) \times 6,25}$$

Donde:

%bs: Porcentaje sobre base seca

T1 (ml): titulación con SO_4H_2 de la muestra

Tbco (ml): titulación con SO_4H_2 del blanco

N SO_4H_2 (N): Normalidad del SO_4H_2 de titulación

MH1 (g): peso de la muestra

MS105 (g/g): coeficiente de materia seca a 105°C

6,25: el valor asume que todo el nitrógeno del alimento se encuentra en forma de proteína y que está presente en ella en un 16%.

La fibra insoluble en detergente neutro (FDN; elaborado con alfa-amilasa y reportado como libre de cenizas) y ácido (FDA, reportado como libre de cenizas) fueron determinadas siguiendo el procedimiento de Komarek (1993) usando un dispositivo ANKOM-Fiber Analyzer 200. (Tecnología ANKOM, Fairport, NY, EE. UU.). Para la determinación de FDN, se pesaron 0,5 g de muestra en una bolsita filtrante ANKOM 200, se sellaron y pusieron en el contenedor del equipo analizador de fibra. Se utilizó una solución de detergente neutro; el tiempo de digestión fue de 1 h. Posteriormente, se realizaron los enjuagues con agua y luego con acetona, se secaron en estufa a 102 °C; se llevaron a desecador hasta temperatura ambiente y se pesaron. Los residuos que quedaron en las bolsitas filtrantes se utilizaron para la determinación de FDA, siguiendo el mismo procedimiento que el explicado anteriormente utilizando para esta determinación una solución de fibra detergente ácido.

Para FDN se realizó el siguiente cálculo:

$$\text{FDN (\%bs)} = 100 \times \{(\text{T+aFDN}) - [\text{T1} \times (\text{Tbco2/Tbco1})]\} / (\text{MH1} \times \text{MS105})$$

Donde:

%bs: Porcentaje sobre base seca

MH1 (g): peso de la muestra.

MS105 (g/g): coeficiente de materia seca a 105°C.

T+aFDN (g): peso final de la bolsa con la fibra.

T1 (g): Peso de la bolsa vacía.

Tbco1 (g): Promedio de pesos de bolsas para blanco inicial (previo a la digestión con el detergente).

Tbco2 (g): Promedio de pesos de bolsas para blanco final (luego de la digestión con el detergente)

Para FDA se realizó el siguiente cálculo:

$$\text{FDA (\%bs)} = 100 \times \{(\text{T1+FDA}) - [\text{T1} \times (\text{Tbco2/Tbco1})]\} / (\text{MH1} \times \text{MS105})$$

Donde:

%bs: Porcentaje sobre base seca.

MH1 (g): peso de la muestra.

MS105 (g/g): coeficiente de materia seca a 105°C.

T1 (g): peso de tara de la bolsa.

T1+FDA (g): peso final de la bolsa con la fibra.

Tbco1 (g): Promedio de pesos de bolsas para blanco inicial (previo a la digestión con el detergente).

Tbco2 (g): Promedio de pesos de bolsas para blanco final (luego de la digestión con el detergente)

2.2.2. Incubación *in vitro*

El experimento se llevó a cabo mediante la técnica de fermentación ruminal *in vitro* (Theodorou *et al.*, 1994). Para simular el consumo de agua con alto contenido de SO₄, todos los tratamientos se enriquecieron con Na₂SO₄ a razón de 1,2% de S elemental como proporción de sustrato (base MS). El licor ruminal fue colectado de dos novillos fistulados

de rumen alimentados con heno de alfalfa de calidad media (12% PB). Se incubaron frascos de fermentación (125 ml) con aproximadamente 500 mg de cada material más 90 ml de solución tampón (SB) y 10 ml de licor ruminal (LR) en un baño termostático a 39 ° C. Además del material vegetal nativo se incubaron seis botellas con solución tampón + licor ruminal (Blanco 1), y seis de Blanco 1 + azufre (Blanco S). Finalmente, se utilizaron dos tipos de alimentos estándar, heno de alfalfa como control forraje (CF) (MS: 86,4%; PB: 22,4%; FDN: 68,6% y FDA: 50,1%) y como control concentrado (CC) se utilizaron granos de maíz (MS: 87,3%; PB: 10,5%; FDN: 22,5% y FDA: 6%). El CF se incluyó por su aporte de fibra para lograr un ambiente de fermentación adecuado para la producción de CH₄, mientras que el CC fue incluido para lograr concentraciones óptimas de ácido láctico y favorecer a la producción de H₂S.



Figura 2.3. Procedimiento para incubación *in vitro*

2.2.3. Determinación de sulfuro de hidrógeno, metano, ácidos grasos volátiles y nitrógeno amoniacal

La producción de gas se evaluó a las 3, 6, 12 y 24 h de incubación y se estimó mediante manómetro diferencial (SPER SCIENTIFIC, Wide Range Pressure Meter 840065 con un transductor de presión PS 100 - 2BAR, Taiwán). En cada medición, se extrajo todo el gas producido con una jeringa (igualando la presión interna con la atmosférica), lo que permitió registrar el volumen producido a la presión atmosférica. Adicionalmente en cada período de incubación se llevó un registro de la presión atmosférica de acuerdo con lo informado por el Servicio Meteorológico Nacional de Argentina (Sitio: Estación Santiago del Estero).



Figura 2.4. Determinación de sulfuro de hidrógeno, metano, amonio ruminal y ácidos grasos volátiles.

Las muestras de gas de cada material extraídas en cada horario de medición fueron particionadas para la determinación de la concentración H_2S y CH_4 . La concentración

ruminal de H₂S fue medida espectrofotométricamente (Cole-Parmer 1200, Cole-Parmer, Vernon Hills, IL) siguiendo el procedimiento de Leibovich *et al.*, (2009).

Paralelamente se recogió una submuestra de gas de cada tratamiento en cada horario de muestreo, la cual fue colectada en un frasco previamente gaseado con nitrógeno (para eliminar toda molécula de carbono que pudiera estar presente) y sellado para evitar pérdidas de gas. De esta manera se obtuvo una muestra de gas acumulado hasta las 24 h para cada tratamiento. La concentración de CH₄ se determinó mediante cromatografía de gases siguiendo el procedimiento descrito por López y Newbold (2007).

Adicionalmente se determinaron las concentraciones de ácidos grasos volátiles (AGV), nitrógeno amoniacal y pH en el fluido del cultivo a las 0 y 24 h de incubación. Al final del período de fermentación se determinó el residuo de la digestión mediante la técnica de Goering y Van Soest (1970), siguiendo la modificación metodológica propuesta por Ankom Technology Corporation (ANKOM Corp., 2009).

2.2.4. Análisis estadístico

El experimento se ajustó a un diseño en bloques (corridas) completamente aleatorizado. La unidad experimental fue compuesta por el valor promedio de 4 fermentadores utilizados para cada período de incubación. Los resultados fueron analizados mediante modelos lineales generales y mixtos utilizando el software InfoStat (Di Rienzo *et al.*; 2015), considerando a especie como efecto fijo y la corrida como aleatorio. Las diferencias entre medias fueron declaradas como significativas con un $P < 0,05$ utilizando el test LSD Fisher. Además, se realizó una Prueba de T para comparación relativa de las especies con los controles. La comparación relativa a los controles forraje y concentrado se realizó mediante el cálculo obtenido del cociente del valor obtenido para

cada especie dividido el valor obtenido para el control. De esta manera a los controles se le asignó un valor de 1 y se realizó la prueba de T.

2.3. Resultados

2.3.1. Composición química

Los valores de PB de las muestras de follaje de las especies nativas variaron entre 15 y 27.8% para LD y AF respectivamente (Cuadro 2.1). Por otro lado, AA tuvo el contenido más alto de fibras y CP, y el más bajo de FDN y FDA.

2.3.2. Fermentación *in vitro*

Los pH iniciales y finales fueron 7.27 ± 0.07 y 7.04 ± 0.09 respectivamente, por lo tanto, todos los valores de pH estuvieron dentro del rango aceptable para asegurar un

Cuadro 2.1. Composición química de hojas de las plantas nativas y los controles.

Materiales	PB ¹	FDN ²	FDA ³
	%	%	%
CP ⁴	17,7 ± 1,0	28,6 ± 4,1	15,7 ± 3,2
CT ⁵	22,8 ± 3,3	41,6 ± 1,4	24,7 ± 1,5
AF ⁶	27,8 ± 4,3	41,8 ± 0,1	21,3 ± 2,5
LD ⁷	15,0 ± 0,2	34,3 ± 2,9	22,0 ± 2,8
GD ⁸	24,4 ± 1,2	48,5 ± 2,6	28,0 ± 0,5
PN ⁹	24,0 ± 3,7	54,8 ± 3,4	34,9 ± 1,8
ZM ¹⁰	17,9 ± 1,6	51,0 ± 5,4	35,8 ± 4,5
SQ ¹¹	21,5 ± 3,7	55,9 ± 3,5	40,1 ± 4,0
AA ¹²	22,0 ± 2,0	56,1 ± 4,4	38,8 ± 2,9
PA ¹³	19,1 ± 0,3	51,4 ± 2,2	37,6 ± 1,3
CC ¹⁴	10,5	22,5	6,0
CF ¹⁵	22,4	68,6	50,1

¹PB: Proteína bruta. ²FDN: Fibra detergente neutro. ³FDA: Fibra detergente ácido. Nombre científico de las especies: ⁴*Caesalpinia paraguariensis*, ⁵*Celtis tala*, ⁶*Acacia furcatispina*, ⁷*Larrea divaricata*, ⁸*Geoffroea decorticans*, ⁹*Prosopis nigra*, ¹⁰*Ziziphus mistol*, ¹¹*Schinopsis quebracho-colorado*, ¹²*Acacia aroma* y ¹³*Prosopis alba*. ¹⁴Control concentrado (grano de maíz), ¹⁵Control forraje (heno de alfalfa)

correcto proceso de fermentación. En el Cuadro 2.2 se muestra la desaparición de la MO *in vitro* (DMOIV). En general, las hojas de especies nativas tuvieron una DMOIV

significativamente más baja ($P < 0.01$) que los controles. En particular, PN, ZM, AA y PA difirieron estadísticamente de ambos controles ($P < 0.01$). En cuanto a la producción de gas acumulado (PG24), las plantas nativas no difirieron de los controles ($P > 0.10$). Las diferencias en PG24 entre las especies fueron evidentes ($P < 0.05$). Por ejemplo, SQ alcanzó el nivel más alto, mientras que LD tuvo el PG24 más bajo.

La concentración de amonio aumentó numéricamente durante la incubación para todas las especies nativas (amonio inicial: 1,64 mM; amonio final: 2,57 mM), pero no difirieron entre ellas ($P = 0,35$).

Cuadro 2.2. Efecto de la fermentación *in vitro* de hojas de especies forrajeras nativas sobre la desaparición de la MO y la producción de gas durante 24 h de incubación.

Materiales	DMOIV ¹	PG 24 h ²
	g/Kg	ml/g DOM
CP ⁷	301,4 cd	164,9 cd
CT ⁸	297,3 cde	211,7 bc
AF ⁹	288,8 cde	188,3 bcd
LD ¹⁰	278,6 de	105,4 d
GD ¹¹	274,7 de	215,5 bc
PN ¹²	264,5 e	207,0 bc
ZM ¹³	192,9 f	204,8 bc
SQ ¹⁴	182,8 f	362,6 a
AA ¹⁵	173,8 f	273,1 ab
PA ¹⁶	163,3 f	270,5 ab
CC	370,7 ab	266,3 abc
CF	313,1 bcd	303,6 ab
EEM ³	8,6	11,6
Efectos	P-valor	
Tratamientos	<0,01	<0,01
CC ⁴ vs Sp ⁵	<0,01	0,40
CF ⁶ vs Sp	<0,01	0,13

Letras diferentes representan diferencias significativas ($\alpha=0.05$). ¹DMOIV: Digestibilidad *In vitro* de la Materia Orgánica. ²PG24 h: Producción de gas acumulado en 24 h. ³EEM: Error estándar de la media. ⁴Control concentrado (grano de maíz). ⁵Sp: Especies. ⁶Control forraje (heno de alfalfa). Nombre científico de las especies: ⁷*Caesalpinia paraguariensis*, ⁸*Celtis tala*, ⁹*Acacia furcatispina*, ¹⁰*Larrea divaricata*, ¹¹*Geoffroea decorticans*, ¹²*Prosopis nigra*, ¹³*Ziziphus mistol*, ¹⁴*Schinopsis quebracho-colorado*, ¹⁵*Acacia aroma* y ¹⁶*Prosopis alba*.

Durante el inicio de la fermentación, las especies nativas y los controles no evidenciaron diferencias significativas en las concentraciones de ácido acético (AC),

ácido propiónico (PROP) y Relación AC: PROP (Cuadro 2.3). Sin embargo, después de 24 h de fermentación, todas las especies fueron significativamente diferentes en la concentración de AGV ($P < 0.01$; Cuadro 2.3). Se destaca que AA tuvo la relación A: P más baja, seguida de LD, PN y AF. La relación A: P en el CC fue más alta que AA, pero más baja que las otras especies como se esperaba. Estos tratamientos son los que lograron una mayor proporción molar de PROP, siendo el CC el control positivo de referencia. Para AC, los tratamientos con menor proporción molar fueron CC, AA y LD ($P < 0.01$).

Cuadro 2.3. Perfil de ácidos grasos volátiles de especies forrajeras nativas en fermentación *in vitro* a las 0 y 24 h de incubación.

Materiales	0 h				24 h			
	AC ¹	PROP ²	BUT ³	A : P ⁴	AC	PROP	BUT	A : P
	%				%			
CP ⁶	71,8	15,1	12,7 d	4,7	82,5 cd	14,8 ab	2,7 a	5,7 def
CT ⁷	67,5	21,7	10,7 cd	3,8	82,8 cd	13,1 ab	4,1 abc	7,1 f
AF ⁸	78,9	15,1	5,9 ab	5,8	68,3 ab	25,3 bcde	6,5 cde	3,3 abc
LD ⁹	78,6	14,1	7,3 abc	5,5	67,7 ab	28,3 cde	3,9 abc	3,5 abc
GD ¹⁰	78,9	15,6	5,5 ab	5,1	77,7 bcd	15,7 ab	6,5 cde	4,9 cde
PN ¹¹	78,7	11,6	9,7 bcd	6,7	73,6 bc	21,6 bcd	4,8abcd	3,4 abc
ZM ¹²	81,3	13,5	5,2 ab	6,2	79,8 cd	13,2 ab	6,9 de	6,1 ef
SQ ¹³	80,7	14	5,3 ab	6,3	75,4 bcd	17,3 abc	7,3 de	4,4 cde
AA ¹⁴	80,1	14,5	5,5 ab	5,5	57,7 a	33,7 de	8,9 e	1,8 a
PA ¹⁵	83,1	12,7	4,3 a	6,7	85,6 d	8,8 a	5,0 bcd	9,7 g
CC ¹⁶	83,3	12,3	4,4 a	6,8	59,1 a	34,5 e	6,4 cde	2,1 ab
CF ¹⁷	80,5	14,3	5,2 ab	6,9	76,7 bcd	19,8 abc	3,14 ab	3,9 bcd
EEM ⁵	3,5	2,3	3	0,8	3,8	4,2	0,9	0,7
Efectos	P- valor							
Tratamientos	0,12	0,28	0,01	0,27	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01

Letras diferentes representan diferencias significativas ($P \leq 0.05$). ¹Acético. ²Propiónico. ³Butírico. ⁴Relación Acético: Propiónico. ⁵EEM: Error estándar de la media. Nombre científico de las especies: ⁶*Caesalpinia paraguariensis*, ⁷*Celtis tala*, ⁸*Acacia furcatispina*, ⁹*Larrea divaricata*, ¹⁰*Geoffroea decorticans*, ¹¹*Prosopis nigra*, ¹²*Ziziphus mistol*, ¹³*Schinopsis quebracho-colorado*, ¹⁴*Acacia aroma* y ¹⁵*Prosopis alba*. ¹⁶Control concentrado (grano de maíz), ¹⁷Control forraje (heno de alfalfa)

La producción de H₂S total, producción de H₂S por g de MO desaparecida (MOD; µg / g), producción de H₂S por g de MO incubada (MOI; materia orgánica incubada; µg / g) y la ingesta total de S elemental (%; Cuadro 2.4) evidenciaron diferencias significativas entre tratamientos (P < 0.01). La producción de H₂S fue menor en especies nativas en comparación con el CC (P < 0.01). Las especies nativas tendieron a tener menor producción de H₂S (P = 0.08) que el CF. Entre los materiales estudiados, LD presentó menor producción de H₂S, y con menor porcentaje de H₂S por S elemental. En este sentido, AA, ZM y PA presentaron menor porcentaje de H₂S por S elemental que CF. Como era de esperar, el CC fue el sustrato que alcanzó la mayor producción de H₂S.

La producción de CH₄ difirió entre las especies (P < 0.05) en ambas formas de expresión - MOD o MOI (Cuadro 2.4). Las AA fue la planta leñosa nativa con mayor producción de CH₄, diferenciándose de otras especies, pero no de los controles. Las especies que se diferenciaron del CF fueron LD, CP y PA, obteniendo menor producción de CH₄ en comparación con el CF.

Cuadro 2.4. Efecto de la incubación de las hojas de especies forrajeras nativas sobre la producción de sulfuro de hidrógeno y metano.

Materiales	$\mu\text{g H}_2\text{S}^1$			$\text{H}_2\text{S}/\text{S}$	CH_4^2	
	Total	g MOD ³	g MOI ⁴	%	g/Kg MOD	g/Kg MOI
CP ⁹	127,6 def	495,3 cd	285,1 def	2,4 de	55,3 bc	34,0 bcd
CT ¹⁰	191,7 bc	705,4 bc	444,9 b	3,7 bc	61,4 bc	38,3abcd
AF ¹¹	149,1cdef	560,8 c	338,0 cde	2,7 cde	57,1 bc	34,8 bcd
LD ¹²	64,3 g	295,5 d	146,8 g	1,2 f	45,1 c	27,1 d
GD ¹³	174,1 bcd	684,0 bc	389,3 bcd	3,2 bcd	63,5 bc	36,8 bcd
PN ¹⁴	142,8 cdef	579,9 c	319,7 def	2,6 de	58,0 bc	34,3 bcd
ZM ¹⁵	102,1 efg	514,7 c	233,4 efg	1,9 ef	68,6 bc	36,9abcd
SQ ¹⁶	150,3 cde	820,4 b	357,6 bcd	2,9 bcd	69,5 bc	35,8 bcd
AA ¹⁷	94,7 fg	490,7 cd	214,5 fg	1,7 ef	100,9 a	48,6 a
PA ¹⁸	103,1 efg	565,0 c	233,4 efg	1,9 ef	56,3 bc	30,0 cd
CC	596,6 a	1680,2 a	1315,4 a	10,9 a	69,5 abc	47,8 ab
CF	190,5 bcd	660,8 bc	421,8 bcd	3,5 bcd	86,4 ab	53,0 a
EEM ⁵	19,3	68,8	42,9	0,4	11,9	8,0
Efectos	P- valor					
Tratamiento	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,05	<0,05
CC ⁶ vs Sp ⁷	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	0,70	0,09
CF ⁸ vs Sp	0,08	0,50	0,09	0,09	0,15	0,01

Letras diferentes representan diferencias significativas ($\alpha=0.05$).¹ $\mu\text{g H}_2\text{S}$: Producción de sulfuro de hidrógeno.² CH_4 : Producción de metano. ³MOD: Materia orgánica digerida. ⁴MOI: Materia orgánica incubada. ⁵EEM: Error estándar de la media. ⁶Control concentrado (grano de maíz). ⁷Sp: Especies. ⁸Control forraje (heno de alfalfa). Nombre científico de las especies: ⁹*Caesalpinia paraguariensis*, ¹⁰*Celtis tala*, ¹¹*Acacia furcatispina*, ¹²*Larrea divaricata*, ¹³*Geoffroea decorticans*, ¹⁴*Prosopis nigra*, ¹⁵*Ziziphus mistol*, ¹⁶*Schinopsis quebrachocolorado*, ¹⁷*Acacia aroma* y ¹⁸*Prosopis alba*.

Las Figuras 2.1 y 2.2 representan gráficamente la posición relativa de las especies nativas con respecto al CF y CC, respectivamente, en términos de producción de H_2S y CH_4 .

En la Figura 2.1 al comparar el CF con las especies, se observó que existen materiales que produjeron H_2S por debajo de la producción del CF, salvo SQ que se ubicó por encima del valor relativo de CF (línea cortada). La diferencia significativa respecto al control se representa cuando los valores están por debajo del límite inferior del intervalo de confianza estimado en la prueba de T (línea de puntos). De esta manera, LD se diferenció significativamente de CF, mientras que CP y ZM se encontraron en el límite.

Con respecto a la producción de CH_4 , todas las especies tuvieron una producción significativamente menor que el CF (límite inferior del intervalo de confianza obtenido en la prueba de T -línea de puntos), siendo AA la única especie que no evidenció diferencia significativa.

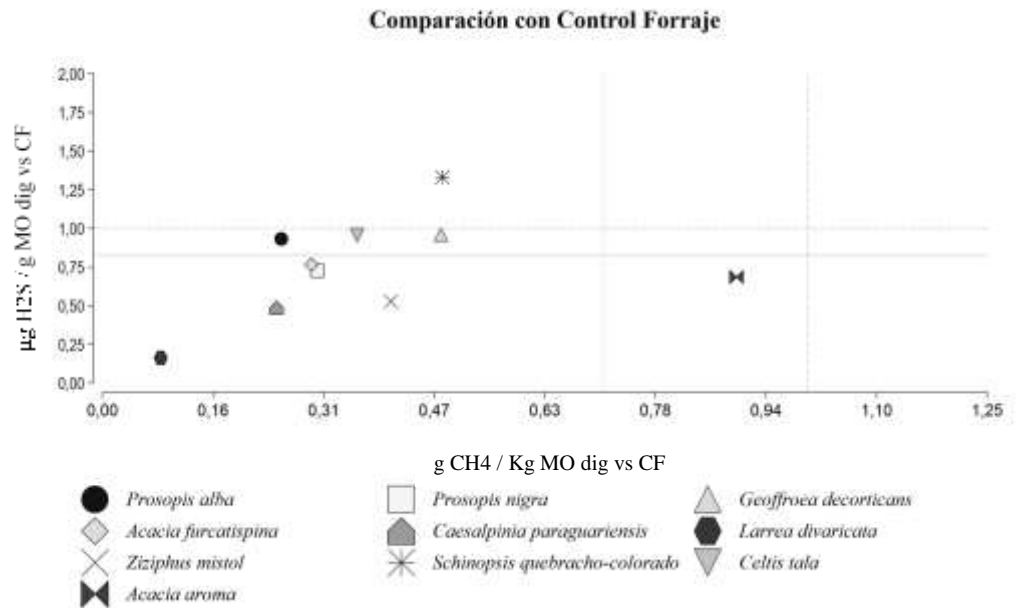


Figura 2.1. Posición relativa de las especies nativas respecto al control forraje en cuanto a producción de H_2S y CH_4

En la Figura 2.2 se muestran los resultados obtenidos de la prueba T comparando la especie con el CC. Todas las especies difirieron significativamente del CC para H_2S ($P < 0.05$). Mientras que para el CH_4 , solo LD presentó diferencias significativas con respecto al CC. Al evaluar los dos parámetros, la especie que presentó menor producción de ambos gases fue LD.

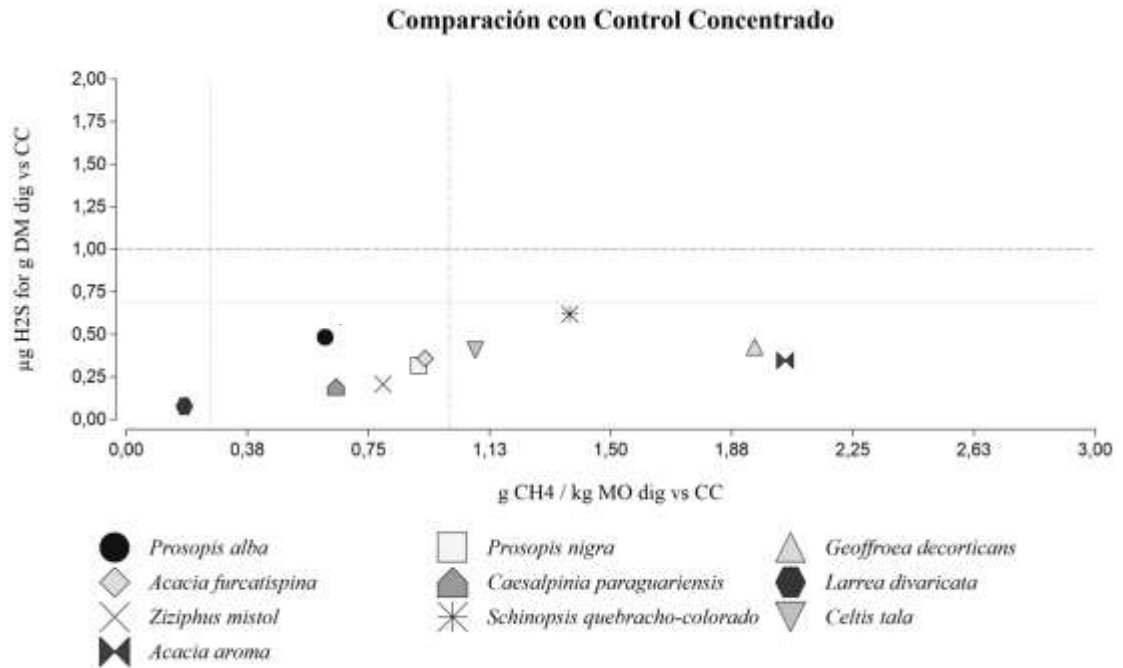


Figura 2.2. Posición relativa de las especies nativas respecto al control concentrado en cuanto a producción de H₂S y CH₄.

2.4. Discusión

El uso de especies nativas del bosque chaqueño como complemento para la alimentación de rumiantes y como fuente de metabolitos secundarios es una alternativa por el efecto que pueden ejercer sobre la fermentación ruminal. El objetivo de este estudio fue explorar el potencial del follaje de especies nativas para reducir la producción *in vitro* de H₂S y CH₄, y evaluar además su valor nutricional (composición de nutrientes y digestibilidad *in vitro*).

El valor nutricional de las hojas de las plantas nativas obtenidos en este ensayo coinciden con los valores reportados por García *et al.*, (2015) y fueron similares a diversos estudios realizados previamente (Karlín y Díaz 1984; Martin *et al.*, 1993).

Nuestros resultados demostraron que las especies nativas evaluadas presentan potencial para mitigar la producción ruminal de H₂S y CH₄, debido principalmente a la baja producción de dichos gases obtenidos con la incubación de las especies nativas en los ensayos *in vitro*. Los taninos de estas especies podrían ser responsables de la

mitigación de la producción de H₂S. En este sentido, Scalbert (1991) observó actividad bacteriostática asociada con el uso de taninos suministrados a través del consumo de especies involucradas en la reducción de SO₄ (por ejemplo, *Desulfomaculum nigrificans*, *Desulfovibrio spp.*). En las especies evaluadas en este estudio, García *et al.*, (2017) reportaron la presencia de taninos condensados con actividad biológica en LD, AA, CP, ZM y PA. Al evaluar el efecto de las especies nativas sobre la producción de H₂S, se observa que todas tuvieron menor producción que el control concentrado. Los granos tienen mayor potencial de producción de H₂S, el almidón es metabolizado a lactato en el rumen y es el principal dador de carbono, y junto con el SO₄ son captados por la BRS para su reducción (Campbell y Postgate, 1965). La producción de nivel de H₂S observada en nuestro estudio concuerda con Drewnoski *et al.*, (2014), ellos sugirieron que las poblaciones de BRS y / o su metabolismo aumentan con dietas ricas en concentrados, debido a la mayor disponibilidad de lactato. En nuestro estudio, a diferencia de otros (Gould, 1998; Morine *et al.*, 2014; Drewnoski *et al.*, 2014), la producción de H₂S no coincide con la obtención de un pH más bajo. Sin embargo, nuestros resultados concuerdan con Qi *et al.*, (1993) quienes reportaron un aumento en la concentración de H₂S sin afectar el pH ruminal en cabras suplementadas con sulfato. En un trabajo realizado por Sarturi *et al.*, (2013), la variación de la concentración de H₂S se explica por el pH solo en una proporción del 12%.

Debido a que todos los materiales se incubaron con el mismo porcentaje de S elemental inicial, al agregar Na₂SO₄ a la solución tampón, un parámetro importante es el porcentaje de producción de H₂S en relación al S elemental inicial. Por lo tanto, la proporción de S refleja las diferencias en el potencial de cada especie para mitigar la reducción de SO₄ a H₂S en el medio de incubación. El control concentrado superó ampliamente a todos los demás sustratos, lo que denota que las condiciones del ambiente

en el que se desarrolló la fermentación fueron bastante favorables para la reducción de sulfatos.

Con respecto a la fermentación *in vitro*, las especies nativas tuvieron valores similares a los controles en cuanto a DMOIV y producción de gas acumulado a las 24 h. En un estudio similar, Durmic *et al.*, (2010) evaluaron 128 especies nativas de Australia y obtuvieron disminución de la producción de gas en 24 h y en la DMOIV en algunas de las especies estudiadas. Dichos investigadores atribuyeron este efecto a la presencia de compuestos secundarios, como los taninos. En contraste con Durmic *et al.*, (2010), en nuestro estudio no se verificó reducción en la producción de gas y DMOIV. El pH registrado en nuestro trabajo en todos los tratamientos estuvo dentro de rangos normales, lo que asegura que las condiciones de la fermentación fueron las adecuadas para que se desarrollara con normalidad y permitiera una reducción óptima de sulfatos. Kandyli (1984), considera que un pH ruminal de 6,5 es óptimo para la producción de H₂S a partir de SO₄. Los valores obtenidos demuestran que no habría grandes diferencias fermentativas entre las especies nativas y los alimentos comúnmente utilizados en las dietas de los rumiantes, como lo son el grano de maíz y el heno de alfalfa.

Durante la fermentación *in vitro*, la concentración de amonio ruminal aumentó al final de la incubación en todos los tratamientos. Satter y Slyter (1994) afirmaron que la máxima eficiencia microbiana se produce cuando la concentración de amonio ruminal está entre 2,7 y 4,4 mM. En nuestro estudio, la concentración de amonio en casi todas las especies osciló alrededor de la concentración óptima. Los valores obtenidos en las especies nativas evaluadas no difirieron significativamente de los obtenidos por ambos controles, lo que demuestra que las plantas nativas estudiadas se comportan de manera similar a los forrajes comúnmente utilizados como alimento animal.

La incubación de las plantas nativas tuvo un efecto variado sobre la producción de AGV. Algunas especies mantuvieron o disminuyeron la proporción de PROP durante la incubación, mientras que LD, AA, PN, AF, SQ y GD aumentaron esta proporción, logrando una reducción en la relación A: P. Dichas especies también redujeron las producciones de H₂S y CH₄. Esto puede deberse a que la producción de PROP compite por hidrógenos con la producción de H₂S y CH₄, y por lo tanto disminuye la producción de ambos gases (Moss *et al.* 2000; Patra *et al.* 2006). Durmic *et al.*, (2010) reportaron tendencias similares en especies nativas de Australia, que disminuyeron la producción de gas CH₄ *in vitro* y aumentaron la proporción de PROP durante la fermentación de las especies.

En cuanto a la producción de CH₄ observada por las especies nativas, AA fue el material que mayor valor alcanzó, cercano al obtenido por el heno de alfalfa. Las demás plantas nativas obtuvieron valores significativamente inferiores al forraje de alfalfa. Esta menor producción de CH₄ en la fermentación de LD, CP y PA también podría deberse a la presencia de taninos condensados (García *et al.*, 2017). Esta respuesta podría tener un efecto directo e indirecto sobre la metanogénesis y la digestión de las fibras, respectivamente (Woodward *et al.*, 2001; Waghorn *et al.*, 2002). Patra y Saxena (2010) informaron una disminución del 50% en la producción de CH₄ *in vitro* en respuesta al extracto que contiene taninos. Existen varios estudios que probaron especies de plantas nativas como aditivos para la reducción de la producción de CH₄ (Brodiscou *et al.*, 2000; Kamra *et al.*, 2008; Soliva *et al.*, 2008, Durmic *et al.*, 2010), basándose en el efecto de compuestos secundarios presentes en plantas.

2.5. Conclusión

Los resultados obtenidos en este estudio muestran que las hojas de las especies nativas forrajeras podrían ser una alternativa para la alimentación de rumiantes expuestos a un elevado consumo de azufre, debido a su capacidad para disminuir el H₂S *in vitro*. Otro aspecto para destacar es que las hojas de las plantas nativas estudiadas presentan características fermentativas similares a los alimentos comúnmente utilizados en animales y de calidad nutricional semejante o superior a dichos alimentos. En este estudio en particular, destacamos a LD, AA, ZM, PA y CP como especies con mayor potencial de mitigación para H₂S y CH₄. No obstante, es necesario profundizar mediante estudios *in vitro* con extractos para evaluar niveles de inclusión y reducir la posibilidad de efectos confundidos debido a interacciones otros compuestos (i.e., proteína, carbohidratos, etc.). Finalmente, es relevante la necesidad de validar lo observado *in vitro*, en condiciones *in vivo* para evaluar el efecto directo de dichas plantas en la fermentación ruminal y desempeño animal.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31

CAPITULO 3

Efecto del nivel de inclusión de extractos de especies nativas sobre los parámetros de fermentación ruminal *in vitro* en un medio enriquecido con azufre

Resumen

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la inclusión de niveles crecientes de dos tipos de extractos de hojas (i.e., acuoso vs. orgánico) de tres especies nativas (*Prosopis alba* (PA), *Larrea divaricata* (LD) y *Acacia aroma* (AA)) sobre los productos de fermentación ruminal *in vitro* y la producción de sulfuro de hidrógeno (H₂S) en un medio enriquecido con azufre (S). El experimento se diseñó sobre un arreglo factorial 3 especies × 2 extractos (orgánico vs. acuoso) × 4 niveles de inclusión de extractos (0, 12,5, 25, 50% en equivalente de material vegetal) distribuidos en un diseño completamente al azar, agregados a un sustrato base (50:50 grano de maíz – heno de alfalfa) de un medio enriquecido con S (1,2%). El total acumulado de H₂S, como así también el H₂S expresado por g materia orgánica digestible (MOD), y como proporción del S elemental presentaron diferencias significativas entre los tratamientos ($P < 0,05$; $P < 0,01$ y $P < 0,01$, respectivamente). La dosis 12,5% del extracto acuoso de AA fue la que mayor disminución de producción de H₂S evidenció en las tres variables analizadas, seguido por la dosis 50% del extracto orgánico de la misma especie, y de la dosis 50% en ambos extractos de PA. En base a los resultados obtenidos en este ensayo, se concluye que las especies estudiadas presentaron potencial de reducción del H₂S y CH₄, y dicho potencial fue dependiente de la dosis, el tipo de extractos, y la especie. No obstante, el efecto sobre la producción de H₂S y CH₄, digestibilidad y fermentación ruminal parece estar asociados con los TC – presentes en el extracto orgánico – más que otros compuestos solubles en extracto acuoso (ej., saponinas).

3.1. Introducción

Las plantas son una fuente importante de compuestos bioactivos (i.e., taninos, saponinas, compuestos organosulfurados y aceites esenciales; Patra y Saxena, 2010; Durmic y Blache, 2012; Dermitas *et al.*, 2018). La formación de dichos compuestos es un mecanismo de defensa de las plantas como respuesta a factores ambientales, competición entre plantas, patógenos y predadores. Para estos últimos, los compuestos secundarios actúan disminuyendo la palatabilidad de la planta, al producir sabores y aromas indeseables que pueden llegar a causar daños en los consumidores (Da Silva *et al.*, 2017).

De los compuestos secundarios encontrados en distintas plantas nativas y forrajes, los taninos son los que mayor atención captaron dentro del área de nutrición de rumiantes. Los taninos son un grupo de compuestos fenólicos que se clasifican principalmente en dos clases: taninos hidrolizables (TH) y condensados (TC), y se considera que tienen efectos adversos y beneficiosos dependiendo de su concentración y naturaleza. Además, sus efectos también dependen de otros factores como especies, estado fisiológico y composición de la dieta (Makkar, 2003).

En los rumiantes, los principales efectos adversos que pueden generar los TC son la disminución de la ingesta de alimento y la digestibilidad de nutrientes (Bravo, 1998; Goel *et al.*, 2005; Mezzomo *et al.*, 2011). Sin embargo, estudios revelaron que el uso de TC en concentraciones controladas puede generar efectos benéficos, como, por ejemplo: la modulación del patrón de fermentación ruminal, reducción de la proteólisis ruminal con posterior aumento del flujo de salida de proteína posruminal e inhibición de la metanogénesis (Khelalfa *et al.*, 2020). Debido a esto, la actividad antimicrobiana de los TC en el ambiente ruminal se convirtió en una temática relevante en el área de la investigación por el potencial que evidenciaron para modificar la microbiota ruminal

(Scalbert, 1991). Morales y Ungerfeld (2015) informaron que las propiedades antimicrobianas de los taninos posibilitarían su utilización para manipular la actividad microbiana ruminal en direcciones favorables. Por ejemplo, ralentizar la digestión de proteínas, aumentar la síntesis de proteína microbiana, disminuir la metanogénesis, y modificar la biohidrogenación de los ácidos grasos, entre otros. Por otra parte, se ha reportado un efecto inhibitorio de los TC sobre las bacterias sulforreductoras (*e.g. Desulfomaculum nigrificans, Desulfovibrio spp.*; Scalbert, 1991) disminuyendo la reducción de sulfatos a sulfuro de hidrógeno (H₂S).

Los sulfatos consumidos en cantidades elevadas a través del alimento o del agua, son captados por bacterias reductoras de sulfato y reducido a H₂S dentro del rumen (Drewnoski *et al.*, 2011). Este gas H₂S en concentraciones elevadas afecta negativamente la ganancia de peso del animal debido a una disminución del consumo de alimento y agua (Kandyliis, 1984; Drewnoski *et al.*, 2014). Bajo estas condiciones, la actividad antimicrobiana de los TC puede significar una alternativa para mitigar la producción elevada de H₂S ruminal. Whitehead *et al.*, (2012) reportaron una reducción significativa en la producción de H₂S en incubaciones *in vitro* de muestras de estiércol de cerdos con taninos de quebracho. Si bien los taninos condensados son los compuestos secundarios más estudiados, existen compuestos con potencial antimicrobiano como los taninos hidrolizables (McSweeney *et al.*, 2001; O'donovan y Brooker, 2001) y de las saponinas (Hess *et al.*, 2003; Wallace, 2004; Hu *et al.*, 2005), destacándose estas últimas por afectar principalmente a los protozoos ruminales (Navas-Camacho *et al.*, 1994; Moss *et al.*, 2000).

Debido a que la concentración de los compuestos secundarios en las plantas enteras es relativamente bajo, resulta necesario trabajar con extractos para poder identificar compuestos o grupos de compuestos biológicamente activos con potencial de

manipulación de la fermentación ruminal. Los extractos de sustancias biológicamente activas presentes en los distintos tejidos de las plantas se obtienen mediante el uso de diferentes solventes, orgánicos (i.e., alcoholes), acuoso (i.e., agua), u otro solvente selectivo (Azmir *et al.*, 2013). Dependiendo de la técnica de extracción y del solvente utilizado, se puede obtener diferentes gamas de sustancias (Santamaria *et al.*, 2015). En extractos orgánicos que hayan utilizado alcohol para la extracción podemos encontrar azúcares simples, glucósidos triterpénicos y compuestos fenólicos (i.e., taninos, pigmentos flavonoides). Mientras que con el extracto acuoso se solubilizan glúcidos simples, glucósidos (e.g., saponinas), alcaloides (sales), y vitaminas solubles entre otros (Ringuelet y Viña, 2013). Por lo tanto, el uso de extractos acuosos permite evaluar en forma general el efecto potencial de compuestos bioactivos como saponinas, mientras que el extracto orgánico permite evaluar el efecto de taninos condensados en la fermentación *in vitro*.

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de niveles de inclusión de extractos acuosos (EA) y orgánicos (EO) de hojas de *Prosopis alba* (PA), *Larrea divaricata* (LD) y *Acacia aroma* (AA) sobre la producción de gas total, desaparición de la MO, H₂S, y CH₄ ruminal *in vitro* en un medio enriquecido con azufre.

3.2. Materiales y métodos

El experimento *in vitro* se llevó a cabo en el Laboratorio de Forrajes y Nutrición Animal del EEA INTA Santiago del Estero, Argentina. Se utilizaron dos novillos fistulados para recolectar licor ruminal. El procedimiento quirúrgico para realizar las cánulas en los bovinos fue aprobado por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Experimentación CICUAE Aval 02/2019)

Los tratamientos evaluados en la fermentación ruminal *in vitro* fueron producto de la combinación factorial especie, tipo de extracto y nivel de inclusión (Factorial $3 \times 2 \times 4$), conformando un total de 24 tratamientos. El primer factor fue especie: (*Prosopis alba* (PA), *Larrea divaricata* (LD) y *Acacia aroma* (AA). El segundo factor fue tipo de extracto (acuoso vs. orgánico), y el tercer factor fue el nivel de inclusión de extracto (0; 12,5; 25 y 50% de la especie en términos equivalentes a la inclusión de material original).

En este experimento se decidió no incluir a las especies *Ziziphus mistol* (Mistol, ZM) y *Cesaelpinia paraguariensis* (Guayacan, CP), debido principalmente a la complejidad para que los rumiantes las consuman, ya que ZM posee espinas en sus ramas y CP no es una especie muy abundante, por lo que cosechar grandes cantidades de material se volvería dificultoso, en contraste con las hojas de las especies AA y PA, las cuales son utilizadas por el ganado. El PA se utiliza también en la industria maderera y al momento de la explotación las hojas se descartan, las cuales pueden convertirse en un subproducto para alimentación de rumiantes.

3.2.1. Preparación de los extractos y determinación de FT y TC

Los extractos de PA, LD y AA fueron preparados en el Laboratorio de Antioxidantes y Procesos Oxidativos de la Facultad de Agronomía y Agroindustrias de la Universidad Nacional de Santiago del Estero, Argentina. Dichos extractos se prepararon utilizando como soluciones extractantes solo agua o metanol/agua (1:1 y 0,95:0,05, v/v), para obtener dos extractos, uno en medio acuoso (EA) y otro en medio orgánico (EO) por especie de acuerdo a lo descrito por López *et al.*, (2010). La extracción se realizó disolviendo 20 g de cada material en 400 ml del solvente correspondiente. La suspensión se agitó por 12 h para luego ser centrifugado a 3000 rpm durante 10 min. El sobrenadante fue colectado y el metanol (en caso de haberse utilizado) se evaporó en un evaporador

giratorio (Rotavapor R-3000; Buchi, Suiza). Finalmente, el extracto crudo obtenido fue liofilizado y su recuperación se calculó como el peso del extracto liofilizado dividido el peso inicial del material.



Figura 3.1. Extractos orgánicos y acuosos de las especies *Larrea divaricata*, *Prosopis alba* y *Acacia aroma*.

La determinación del contenido de compuestos fenólicos totales se realizó según el método de Folin-Ciocalteu (Singleton y Rossi, 1965). Se tomaron 0,15 ml del extracto fenólico y se llevó a un volumen de 1,20 ml con agua destilada, se agregaron 0,65 ml del reactivo comercial de Folin- Ciocalteu y 3,15 ml de la solución de carbonato de sodio al 20% p/v. Se agitó y calentó a 50 °C durante 10 minutos. Se registró la absorbancia a 725 nm. El contenido total de compuestos fenólicos se expresó como equivalente de ácido gálico (AGa) a partir de una curva de calibración. Para la evaluación del contenido de taninos condensados (TC) se utilizó el método espectrofotométrico butanol-HCl (Porter *et al.*, 1986). En un tubo de ensayo, se colocó 1 ml del extracto vegetal, se agregó 6 ml del reactivo butanol-HCl (95:5). Se llevó a calentamiento a una temperatura de 95 °C durante 60 minutos. Se enfrió hasta temperatura ambiente y se registró la absorbancia a 550 nm. El contenido de TC se expresó como equivalentes de TC sd purificado para cada especie.

Una vez obtenidos los valores de TC para cada especie se calcularon las proporciones de cada extracto para conformar las dosis utilizadas en el *in vitro*: 0; 12,5; 25 y 50% de la concentración de TC. Se pesaron distintas cantidades de cada material liofilizado según dichas dosis, se diluyeron en agua destilada para agregar igual cantidad de ml por tratamiento a las distintas botellas (4 ml por botella para la dosis 50%, 2 ml por botella para la dosis 25% y 1 ml por botella para la dosis 12,5%) previo a la incubación.

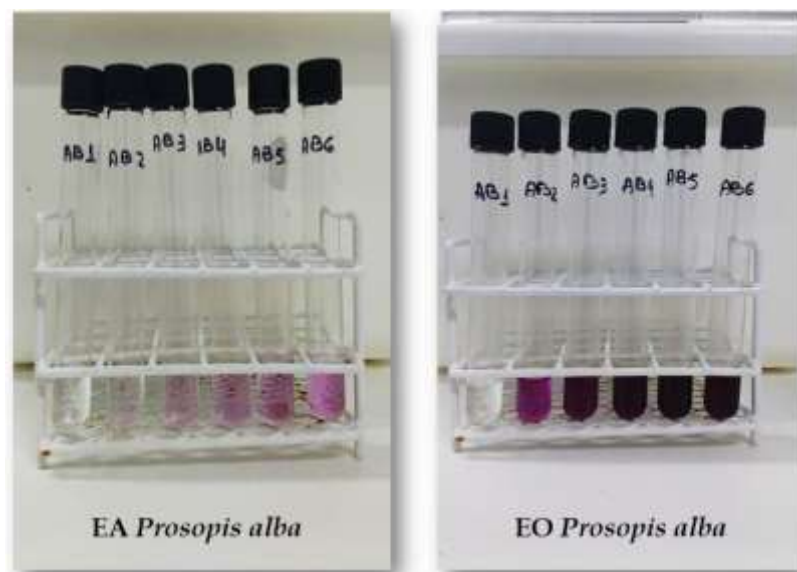


Figura 3.2. Determinación de Taninos Condensados de los extractos orgánico y acuoso de la especie *Prosopis alba* mediante el método espectrofotométrico butanol-HCl (Porter *et al.*, 1986)

3.2.2. Incubación *in vitro*

En este experimento se utilizó la técnica de fermentación ruminal *in vitro* con 24 h de incubación. Para simular el consumo de agua con alto contenido de SO_4 , todos los tratamientos (incluidos los controles) se enriquecieron con Na_2SO_4 a razón de 1,2% de S elemental como proporción de sustrato (base MS). Los fermentadores fueron inoculados con licor ruminal colectado de dos novillos fistulados de rumen alimentados con heno de alfalfa de calidad media (12% PB). Se incubaron en frascos de fermentación (125 ml) con aproximadamente 500 mg de cada material más 90 ml de solución buffer (SB) y 10 ml de licor ruminal (LR) en un baño termostático a 39 ° C. El experimento consistió en agregar

niveles crecientes de extractos obtenidos de las especies PA, AA y LD a los frascos fermentadores que contenían un sustrato base (50:50 grano de maíz – heno de alfalfa) enriquecido con S (~1,2% S como proporción del sustrato total). Además se testearon controles, donde se agregó solamente el extracto con SB y LR sin sustrato base, para evaluar el efecto de los extractos por si solos, y también se incluyeron blancos con SB y LR sin agregado de S y con agregado de S.

En todos los fermentadores se registró el pH inicial y final con el objetivo de evaluar si el medio de fermentación se producía en condiciones normales. Las variables de estudio fueron: producción de gas acumulada a las 24 h de incubación (PG24); desaparición de la MO *in vitro* (DMOIV), concentración de H₂S y metano CH₄. A su vez, la concentración de amonio fue determinada a las 0 h y 24 h de incubación.

3.2.3. Determinación de sulfuro de hidrógeno, metano y nitrógeno amoniacal

La producción de gas se evaluó a las 3, 6, 12 y 24 h de incubación y se estimó mediante manómetro diferencial (SPER SCIENTIFIC, Wide Range Pressure Meter 840065 con un transductor de presión PS 100 - 2BAR, Taiwán). En cada medición, se extrajo todo el gas producido con una jeringa (igualando la presión interna con la atmosférica), lo que permitió registrar el volumen producido a la presión atmosférica. Adicionalmente en cada período de incubación se llevó un registro de la presión atmosférica de acuerdo a lo informado por el Servicio Meteorológico Nacional de Argentina (Sitio: Estación Santiago del Estero). Las muestras de gas de cada material extraídas en cada horario de medición fueron particionadas para la determinación de la concentración H₂S y CH₄. La concentración ruminal de H₂S fue medida espectrofotométricamente (Cole-Parmer 1200, Cole-Parmer, Vernon Hills, IL) siguiendo el procedimiento de Leibovich *et al.* (2009). Paralelamente se recogió una submuestra de

gas de cada tratamiento en cada horario de muestreo, la cual fue colectada en un frasco previamente gaseado con nitrógeno (para eliminar toda molécula de carbono que pudiera estar presente) y sellado para evitar pérdidas de gas. De esta manera se obtuvo una muestra de gas acumulado hasta las 24 h para cada tratamiento. . La concentración de CH₄ se determinó mediante cromatografía de gases siguiendo el procedimiento descrito por López y Newbold (2007).

3.2.4. Análisis estadístico

El experimento respondió a un diseño completamente aleatorizado. La unidad experimental fue el valor medio de cuatro fermentadores utilizados para cada período de incubación (3 en total). Las variables PG24, DMOIV, Producción de H₂S total (acumulado, expresado como g de MODIV y como proporción de S inicial) fueron analizadas utilizando el procedimiento MIXED de SAS (SAS Inst. Inc., Cary, NC). Para calcular las medias de los tratamientos se utilizó la opción LSMEANS, siendo declaradas estadísticamente significativas las medias de los tratamientos con $P < 0,05$.

3.3. Resultados

3.3.1. Fenoles totales y Taninos condensados

El contenido de FT de los extractos de las especies nativas puede observarse en la Figura 3.1. Los EO fueron los que mayor contenido de FT presentaron ($P < 0,01$), destacándose entre ellos el extracto orgánico de PA. Los extractos acuosos obtuvieron menor contenido de fenoles totales, LD fue la especie con mayor concentración de fenoles totales en extractos acuosos.

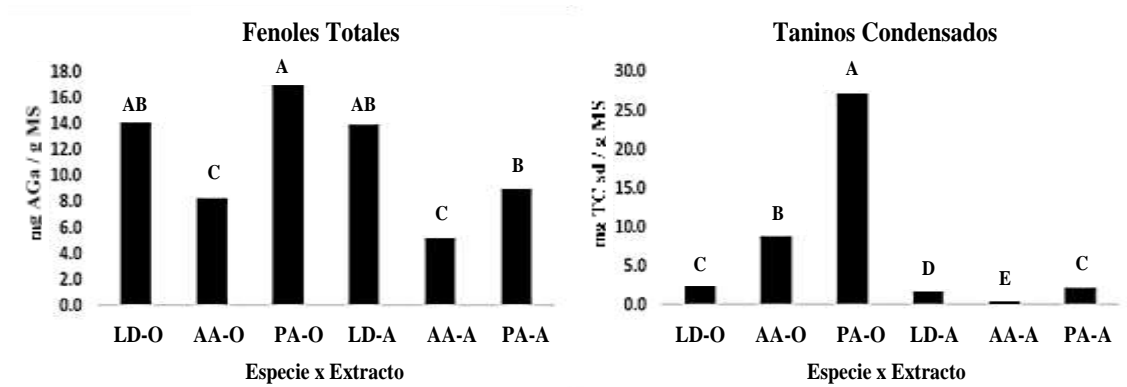


Figura 3.3. Contenido de Fenoles totales (AGa = ácido gálico) y Taninos condensados (TC = mg TC sd/g MS) en extractos de hojas de especies nativas. Letras distintas representan diferencias significativas entre medias ($P < 0,01$). LD-O: extracto orgánico de *Larrea divaricata*; AA-O: extracto orgánico de *Acacia aroma*; PA-O: extracto orgánico de *Prosopis alba*; LD-A: extracto acuoso de *Larrea divaricata*; AA-A: extracto acuoso de *Acacia aroma* y PA-A: extracto acuoso de *Prosopis alba*.

Todas las especies en ambos extractos presentaron TC (Figura 3.1). El extracto orgánico de PA fue el que presentó mayor contenido de taninos, diferenciándose ampliamente de las especies restantes.

3.3.2. Fermentación *in vitro*

Los valores de pH registrados inicial y final fueron $7,20 \pm 0,09$ y $7,05 \pm 0,07$ respectivamente, indicando un ambiente ruminal adecuado para el desarrollo de un correcto proceso de fermentación.

La triple interacción (especie \times extracto \times dosis de inclusión) resultó significativa ($P < 0,05$) para PG24, DMOIV, producción de H_2S , y CH_4 (Cuadro 3.1). La variable PG24 tuvo una respuesta cuadrática ($P < 0,01$) a niveles crecientes de inclusión de extractos orgánicos para todas las especies evaluadas. En las tres especies se observó un incremento o mantenimiento de la producción de gas hasta la dosis de 25% y luego disminuyó con la dosis 50% de inclusión. No obstante, si bien todas tuvieron un comportamiento cuadrático, la magnitud de respuesta fue distinta. Por ejemplo, LD y PA tuvieron una leve reducción en la producción de gas en la dosis más elevada en contraste con AA donde la

disminución de PG en la dosis 50 fue mayor, evidenciando diferencias significativas respecto al control dosis 0, al igual que la dosis 50 del EO de LD. Al analizar los EA de PA y AA la producción de gas se redujo linealmente, evidenciando diferencias significativas respecto al control (0) solamente en las dosis 50%. En tanto que LD tuvo una respuesta cuadrática ($P < 0,05$) con el agregado de EA de esta especie y tuvo mayor PG24 en todas las dosis. Además, se observó una doble interacción ($P < 0,01$) en extracto \times dosis, donde LD-O (*Larrea divaricata* – orgánico) y PA-O (*Prosopis alba* – extracto orgánico) obtuvieron la mayor producción de gas, sin diferencias significativas entre ambos extractos ($P = 0,22$). La mayor PG24 se registró para LD-A (*Larrea divaricata* – extracto acuoso). La especie AA, independientemente del extracto, mostró una tendencia lineal ($P < 0,10$) (Cuadro 3.1) a reducir la PG24, y solo la dosis más elevada de extracto acuoso difirió del control dosis cero. Podría generalizarse que independientemente de los extractos y las especies, a dosis 50% de inclusión deprimió la PG24 respecto al control ($P < 0,01$).

La DMOIV se redujo con la inclusión de la dosis más alta utilizada, con patrones afectados por la especie. De modo similar a PG24, la DMOIV con extractos orgánicos tuvo una respuesta cuadrática en todas las especies. Las DMOIV de PA y AA no fueron inicialmente afectadas, reduciéndose sólo con las dosis de 25 y 50%. Mientras que la DMOIV del tratamiento extracto orgánico de LD se redujo con dosis superiores a 12,5%. En lo que respecta a los EA, el aumento de inclusión de este tipo de extracto generó una disminución de la DMOIV de forma lineal, excepto en AA que tuvo un incremento con las dosis intermedias para luego disminuir con la dosis 50%. En general, con dosis superiores a 25% todos los extractos de las especies evaluadas disminuyeron la DMOIV.

La producción de H₂S total acumulado, H₂S expresado por g de MOD o como proporción del S inicial presentaron diferencias significativas entre los tratamientos ($P =$

0,02; $P < 0,01$ y $P < 0,01$, respectivamente; Cuadro 3.2). Al analizar la especie LD, podemos destacar que el extracto orgánico manifestó una respuesta lineal produciendo significativamente mayor H_2S por g de MOD en todas las dosis de inclusión, comparado con lo producido por el EA. Sin embargo, no se evidenciaron diferencias significativas en las distintas dosis de inclusión de ambos extractos, al compararlo con el control (0). Por otro lado, los extractos de PA no evidenciaron una disminución significativa de la producción de H_2S por g de MOD entre las dosis de los distintos extractos. Se destaca que la dosis 50% de inclusión del EA se diferenció significativamente con respecto al control (0), debido a que la producción de gas fue menor. La especie AA tuvo una respuesta cuadrática para ambos extractos, donde el EO disminuyó la producción de H_2S por g de MOD con el aumento de dosis, evidenciando diferencia significativa con respecto al control en la dosis 50%. En cuanto al EA, la producción del gas disminuyó significativamente con respecto al control en la dosis 12,5%, para luego incrementar a medida que aumentaron las dosis.

Al analizar la producción de CH_4 , se observaron diferencias significativas entre los tratamientos ($P < 0,01$). Independientemente de la especie, se observó que los extractos orgánicos evidenciaron una tendencia a disminuir la producción de CH_4 , en comparación con los extractos acuosos. Para la especie LD, la producción de CH_4 en la dosis 50% fue significativamente menor con respecto al control, mientras que el EA tuvo una respuesta lineal con variaciones casi nulas en las 4 dosis testeadas. El EO en la especie PA disminuyó la producción de CH_4 hasta la dosis 25% y luego se incrementó en la dosis 50%. El EA de PA respondió linealmente a las distintas dosis sin evidenciar efecto dosis. Por último, la especie AA, no evidenció efecto dosis en el EA, mientras que el EO tuvo una respuesta cuadrática hasta disminuir la producción de CH_4 significativamente en comparación con el control dosis 0.

Cuadro 3.1. Efecto del nivel de inclusión de especies nativas en medios con elevado nivel de sulfatos, sobre la producción de gas acumulada y la desaparición de MO en 24 h de incubación ruminal *in vitro*.

Especies	Extracto orgánico, % MS					Extracto acuoso, % MS					Efectos ² , Valores de P								
	0	12,5	25,0	50,0	Cont ¹	0	12,5	25,0	50,0	Cont	EEM ³	E ⁴	Ex ⁵	D ⁶	E×Ex	E×D	Ex×D	E×Ex×D	
Producción de gas acumulada - 24 h, mL/ MOD											13,5	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	0,25	0,32	<0,01	
LD ⁷	174,9	187,9	186,3	178,4 ^y	Q***	216,9	217,3	230,7	216,0	Q**									
PA ⁸	201,9	211,7	223,5	216,2	Q**	209,5	196,4	213,1	180,4 ^x	Q**									
AA ⁹	191,5	194,2	196,3	137,9 ^y	Q**	189,5	172,9	183,2	185,9 ^y	NS									
Desaparición <i>in vitro</i> MO, g/kg MO											5,5	<0,01	<0,01	<0,01	0,29	0,06	0,21	<0,01	
LD	821,3	821,00	803,7 ^y	803,5 ^y	Q***	823,9	832,8	833,2	809,6	Q**									
PA	821,9	819,6	810,4 ^y	791,7 ^y	Q***	824,3	805,6 ^x	801,7 ^x	822,9	L**									
AA	823,2	839,6	812,9	819,7	Q***	822,3	844,8 ^x	831,1	818,1	L***									

¹ Contrastes polinomiales: L = lineal, Q = cuadrático - Significancia: *** P<0,01, ** P<0,05, * P<0,10, NS: no significativo - ³EEM: Error estándar de la media ⁴E: especie, Ex: tipo de extracto, D: dosis - Indican diferencias estadísticas respecto a la dosis 0: ^x = extracto acuoso, ^y = extracto orgánico. ⁷LD: *Larrea divaricata*, ⁸PA: *Prosopis alba*, ⁹AA: *Acacia aroma*.

Cuadro 3.2. Efecto del nivel de inclusión de especies nativas en medios con elevado nivel de sulfatos, sobre la producción de Sulfuro de Hidrógeno, producción de Sulfuro de Hidrógeno a partir de Azufre inicial y la producción de metano en 24 h de incubación ruminal *in vitro*.

Especies	Extracto orgánico, % MS					Extracto acuoso, % MS					Efectos ² , Valores de P							
	0	12,5	25,0	50,0	Cont ¹	0	12,5	25,0	50,0	Cont	EEM ³	E ⁴	Ex ⁵	D ⁶	E×Ex	E×D	Ex×D	E×Ex×D
Producción de Sulfuro de Hidrógeno, µg / g MOD											87,3	<0,01	<0,05	<0,05	<0,01	0,15	<0,05	<0,01
LD ⁷	1409,7	1467,9	1497,2	1425,6	L**	1209,3	1209,0	1212,1	1148,2	NS								
PA ⁸	1365,3	1438,2	1369,2	1291,6	L**	1429,2	1236,1	1427,6	1134,2 ^y	C***								
AA ⁹	1250,8	1208,9	1297,3	917,5 ^x	Q**	1235,2	908,9 ^y	1361,9	1452,4	Q**								
Producción de Sulfuro de Hidrógeno a partir de Azufre inicial, %											2,0	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	0,15	<0,05	<0,01
LD	32,3	33,6	34,9	33,3	C*	27,7	27,3	27,3	26,6	NS								
PA	31,2	33,0	31,8	30,6	NS	32,6	28,8	33,5	20,2 ^y	NS								
AA	28,4	27,1	30,0	21,0 ^x	Q***	28,3	20,2 ^y	30,9	33,3	NS								
Producción de Metano, g / Kg MOD											0,5	<0,01	0,86	0,05	<0,05	0,1	0,88	<0,01
LD	6,0	5,5	6,2	4,8 ^x	C**	4,9	4,8	4,9	5,1	L*								
PA	5,6	4,6	4,1 ^x	6,2	NS	5,8	5,5	5,8	5,1	NS								
AA	4,9	4,6	5,3	3,1 ^x	Q***	5,3	4,1	4,8	4,5 ^x	NS								

¹ Contrastes polinomiales: L = lineal, Q = cuadrático, C= cúbico - ²Significancia: *** P<0,01, ** P<0,05, * P<0,10, NS= no significativo- ³EEM: Error estándar de la media ⁴E: especie, ⁵Ex: tipo de extracto, ⁶D: dosis - Indican diferencias estadísticas respecto a la dosis 0: ^x = extracto acuoso, ^y = extracto orgánico, ⁷LD: *Larrea divaricata*, ⁸PA: *Prosopis alba*, ⁹AA: *Acacia aroma*,

Con respecto a la concentración de amonio, no hubo diferencias significativas entre los tratamientos ($P = 0,95$). La concentración de amonio aumentó al final de la incubación en todos los tratamientos ($P < 0,01$).

3.4. Discusión

El propósito de este trabajo fue evaluar el efecto de niveles de inclusión de extractos de metabolitos secundarios orgánicos o acuosos de hojas de PA, LD y AA sobre la fermentación ruminal y su potencial para mitigar la producción H_2S , y CH_4 ruminal *in vitro* en un medio enriquecido con S, en relación con la presencia de distintos compuestos bioactivos presentes en los extractos.

En concordancia con los resultados obtenidos por García *et al.*, (2017), en los extractos las hojas de las especies estudiadas se detectó la presencia de fenoles totales y taninos condensados (TC). Los contenidos de FT y TC fueron mayores en los extractos orgánicos que los acuosos. La extracción orgánica remueve fenoles totales (Singleton y Rossi, 1965), y dentro de este tipo de extractos coexisten ácido cinámico y benzoico, antocianinas, catequinas, flavonoides y taninos (Paladino y Zuritz, 2011). Los extractos acuosos, por su parte, solubilizan saponinas dentro del grupo de compuestos biológicamente activos. El análisis de FT y TC evidencia mayor presencia en PA. García (2014) observó elevada actividad biológica – capacidad de precipitar proteína – de los TC de LD, PA, y AA relacionada con una alta proporción de delfidina en la estructura de los TC.

La PG24 obtenida en el estudio no demuestra una inhibición de la fermentación *in vitro* ante el agregado de extractos en la incubación con dosis bajas o moderadas de inclusión. Tiemann *et al.*, (2008) al adicionar mayor proporción de TC obtuvieron una menor producción de gas y por ende una inhibición de la fermentación *in vitro*. La dosis

25% de todos los tratamientos evidenció mayor PG24 que el tratamiento control, con excepción del extracto acuoso de AA, el cual produjo menos gas que el control en todas las dosis testeadas. Estos resultados concuerdan con García (2014) quien trabajando con las mismas especies nativas, las cuales fueron adicionadas en diferentes dosis sobre un forraje base (alfalfa, *Medicago sativa*), obtuvo la mayor producción de gas a las 48 h de incubación con la dosis 25%. La autora sugiere que la PG en su trabajo estuvo significativamente influenciada por la dosis de inclusión, y a partir de la dosis 50 % y 100 % de inclusión, se registra depresión en la producción de gas y en la fermentación.

Las producciones de gas obtenidas en este estudio denotan un menor efecto de los tratamientos empleados en comparación a los obtenidos en la variable DMOIV. Esta variación de la PG24 con respecto a la DMOIV, sugiere que la adición de los extractos podría afectar algún parámetro de digestión sin afectar la fermentación.

La DMOIV evidenció un efecto variable entre los extractos y dosis dentro de cada especie. En líneas generales se observó que en la dosis 50 de los extractos, la DMOIV declina con respecto al control. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Tiemann *et al.*, (2008), quienes evaluaron el efecto en la fermentación ruminal de niveles crecientes de TC de 4 leguminosas tropicales de porte arbustivo. Los autores observaron que las dosis más altas de TC utilizadas deprimieron notablemente la producción de gas y la digestibilidad de la materia seca, inhibiendo el proceso de fermentación. En la misma línea, Roca-Fernández *et al.*, (2020) al evaluar cuatro leguminosas con distintas concentraciones de TC sobre un forraje base de gramínea - *Dactylis glomerata L*, en una concentración 50:50 gramínea – leguminosa, evidenciaron que la digestibilidad *in vitro* de la MS disminuyó significativamente en el tratamiento que incluía la especie con mayor contenido de TC (*Sericea lespedeza*), en comparación con el resto de las especies testeadas con menor contenido de TC.

La producción de H₂S ruminal (en las tres expresiones estudiadas) registrada durante la fermentación *in vitro* tuvo resultados variables entre especies y entre dosis de una misma especie, al compararlo con el tratamiento control. Se observó una disminución en la producción de H₂S a partir del S inicial en el EA de LD, en la dosis 50 % de EO de PA, y en las dosis 12,5 y 50 % del EA de PA y EO de AA respectivamente. La mayor disminución se obtuvo con la dosis 50% del extracto orgánico de AA, pero este resultado puede estar relacionado con la caída en PG24, lo que estaría indicando alguna supresión en la fermentación *in vitro* en este tratamiento. El segundo valor más bajo de producción de H₂S se registró con la dosis 12,5% del EA de AA. Este efecto mitigador de la producción de H₂S ruminal pudo deberse a la actividad antimicrobiana que se atribuye a la acción de los TC (Wallace, 2004). En un estudio realizado por Whitehead *et al.*, (2012) donde evaluaron el efecto de TC sobre la producción de H₂S y sobre poblaciones de bacterias reductoras de sulfato (BRS) en la fermentación *in vitro* de estiércol porcino, demostraron una reducción de las poblaciones de BRS en más del 90% tras la adición de 0,5% taninos de quebracho, lo que refleja la inhibición de la producción de H₂S por los taninos condensados. Estos autores sugieren que, de acuerdo a los resultados obtenidos en su experimento, las BRS pueden ser más sensibles a la presencia de taninos en el ambiente.

El efecto de los distintos tratamientos empleados sobre la producción de CH₄ ruminal *in vitro*, permitió destacar los EO de las especies PA y AA, los cuales lograron una disminución en la producción de dicho gas, en la dosis 12,5 y 25% para PA y en las dosis 12,5 y 50% para AA. Estos resultados coinciden con numerosos estudios los cuales demostraron que los taninos disminuyen la producción de CH₄ en rumiantes (Puchala *et al.*, 2005; Min *et al.*, 2006; Tan *et al.*, 2011). Por el contrario, Beauchemin *et al.*, (2007) no observaron efecto de los TC en la emisión de CH₄ en vaquillonas alimentadas con silo

de cebada. Las diferencias en respuesta al uso de TC sobre la producción de CH₄ *in vitro* e *in vivo* se debe a la gran variación en la estructura, consecuentemente en la actividad biológica que tienen entre TC de distintas especies (Tiemann *et al.*, 2008; Aerts *et al.*, 1999; Patra y Saxena, 2010).

Con respecto a la concentración de amonio ruminal, todos los tratamientos obtuvieron mayor concentración al final de la incubación, lo que sugiere que la proteólisis por parte de los microorganismos no fue inhibida con las dosis de extractos estudiadas, difiriendo de otros estudios donde evidenciaron una disminución de la proteólisis ruminal por el efecto de TC (Min *et al.*, 2003; Roca-Fernández *et al.*, 2020). En contraste, García *et al.*, (2017), reportaron una reducción del 35% en la concentración de amonio al final de la fermentación *in vitro*, al testear las mismas especies de nuestro ensayo. Esta diferencia registrada entre los resultados obtenidos en este ensayo y los reportados por García *et al.*, (2017) pueden deberse a múltiples factores. A pesar de que se testearon las mismas especies, la autora utilizó las hojas molidas de las plantas nativas y las incorporó (de acuerdo con cada dosis planteada) al material molido de alfalfa para armar un sustrato compuesto. Cuando se utilizan hojas y no extractos, pese a que los sustratos de incubación se formulen isoproteicos, es posible que la incorporación de proteína por parte de las especies testeadas tenga una dinámica de digestión ruminal distinta a la del sustrato principal y de este modo introduzca un efecto confundido en la dinámica del N ruminal.

De acuerdo con los resultados expuestos, encontramos diferencias dentro de una misma especie entre los dos extractos (acuoso vs orgánico), y dentro de las especies en general, a pesar que la cantidad de TC agregados en cada dosis fue la misma. Esto puede deberse principalmente a la actividad diferenciada que tienen los TC de cada especie, lo cual explicaría las diferencias encontradas entre especies dentro de un mismo tipo de extracto. En cuanto a la diferencia existente entre extractos dentro de una misma especie,

esto puede deberse a que se extraen diferentes tipos de moléculas con los distintos extractos empleados, por lo tanto, en el solvente acuoso podrían estar presentes otras moléculas – como las saponinas- , además de TC, las cuales podrían afectar las variables estudiadas. Sin embargo, este efecto confundido que podría estar presente en el extracto acuoso se descarta al haber seleccionado en el primer experimento a las plantas, las cuales fueron testeadas como planta entera, durante el *in vitro*.

3.5. Conclusión

En base a los resultados obtenidos en este ensayo, se concluye que las especies estudiadas presentaron potencial de reducción del H₂S y CH₄, y este potencial fue dependiente de la dosis, el tipo de extractos, y la especie. No obstante, dichos efectos sobre la producción de H₂S y CH₄, digestibilidad y fermentación ruminal parecen estar más asociados con los TC – presentes en el extracto orgánico – que otros compuestos solubles en extracto acuoso (ej., saponinas). En este sentido, es necesario seguir trabajando para poder explicar los modos de acción, y en una identificación específica de compuestos relacionados con el efecto de los metabolitos secundarios de especies nativas del Chaco para aprovechar su potencial como moduladores naturales de la fermentación.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20

CAPITULO 4

Efecto del agregado de hojas de *Prosopis alba* sobre el consumo, y respuestas metabólicas en corderos consumiendo agua con elevados tenores de sulfatos

Resumen

El objetivo de este trabajo fue evaluar el consumo, digestibilidad, balance de N y concentración ruminal del gas H₂S en respuesta a la adición de hojas de *Prosopis alba* (PA) como fuente de compuestos bioactivos naturales a la ración de corderos bebiendo agua con elevado contenido de SO₄. Se utilizaron 8 corderos criollos (n = 8; 26,6 ± 3,8 kg peso vivo, PV), los cuales se alojaron en jaulas metabólicas durante el experimento, en un ensayo de 4 tratamientos por 2 períodos. La estructura de los tratamientos fue un factorial de 2 × 2, resultado de la combinación de 2 calidades de agua (tenor salino bajo, TSB: 499 mg/L de sólidos totales disueltos [STD], 150 mg/L de SO₄; tenor salino alto, TSA: 10.100 mg/L de STD, 5.400 mg/L de SO₄) y 2 niveles de inclusión de PA (0% y 33%) en una ración base compuesta de heno de alfalfa (*Medicago sativa*) y grano de maíz. Las hojas de PA incrementaron la producción de H₂S en rumen (P < 0,01). Sin embargo, las altas concentraciones del gas no disminuyeron el CMOT (P = 0,1388) ni el CA (P = 0,6697) en los corderos que bebieron agua con TSA, registrándose un leve incremento de dichas variables en comparación con los corderos que bebieron agua con TSB. El consumo de hojas de PA por parte de los corderos incrementó la digestibilidad de la materia orgánica (DigMO) de la ración (P < 0,01), disminuyó la excreción de N urinario (P < 0,05), mejorando la utilización del N, y mejoró el balance total de N (P < 0,05). En base a los resultados obtenidos, los compuestos bioactivos de PA no disminuyeron la producción de H₂S dentro del rumen, por lo que se sugiere seguir estudiando la temática para comprender la interacción de los TC en el metabolismo del S de los rumiantes.

4.1. Introducción

El agua es un nutriente esencial para la alimentación de los rumiantes, y para lograr una producción satisfactoria, es necesario suministrar este nutriente en cantidad y calidad adecuada (NRC, 2001). La calidad de agua para bebida animal hace referencia principalmente a diferentes parámetros, entre los cuales encontramos: características organolépticas (olor y sabor), características fisicoquímicas (e.g. pH, sales totales, dureza), presencia de sustancias químicas (nitratos, sulfatos, sodio, minerales en general), de compuestos tóxicos (e.g. arsénico, fosforados, etc.) y de microorganismos (bacterias, parásitos; NRC, 2007). Dentro de estos parámetros, el contenido de sales totales disueltas (STD) es el que más frecuentemente afecta la producción ganadera.

En las regiones áridas y semiáridas del mundo, el ganado suele estar expuesto al consumo de agua de bebida de mala calidad o marginal durante varios meses del año, o durante todo su ciclo de vida. Estas fuentes de agua suelen ser generalmente subterráneas, con elevadas concentraciones de sales, provocando alteraciones fisiológicas que reducen el consumo de alimento y en casos severos, la muerte del ganado (FAO, 2007).

Entre las sales contenidas en el agua, los sulfatos (SO_4) son más perjudiciales que los cloruros (Coria *et al.*, 2007). En particular, niveles elevados SO_4 reducen significativamente el consumo de agua (35%), alimento (30%), y consecuentemente la ganancia de peso (Weeth y Hunter, 1971; Loneragan *et al.*, 2001; Uwituze *et al.*, 2011; Ritcher, 2011; López *et al.*, 2014). Aunque todavía no hay un entendimiento completo de los mecanismos fisiológicos, se atribuyen estos efectos negativos a las elevadas concentraciones ruminales de sulfuro de hidrógeno (H_2S) en forma gaseosa que se produce como consecuencia de la reducción de los SO_4 por el accionar de las bacterias sulforreductoras (BSR; Radostits *et al.*, 2007). El H_2S dentro del rumen, genera

intoxicación con S con riesgo de poliencefalomalacia (PEM; Vanness *et al.*, 2009), pero en niveles subclínicos, provoca la disminución de consumo de alimento y agua, debido principalmente a una reducción de la motilidad ruminal e intestinal (Kandyliis, 1984; Drewnoski *et al.*, 2014). Por lo tanto, estudiar mecanismos que reduzcan la producción de H₂S permitiría mejorar el desempeño de animales expuestos al consumo de aguas con elevadas concentraciones de SO₄. Una estrategia posible para reducir el impacto negativo de los SO₄ presentes en el agua de bebida, sería intervenir en el metabolismo del azufre (S) dentro del rumen, inhibiendo la reducción de los SO₄ por parte de las BSR. Los taninos condensados (TC), compuestos secundarios presentes en las plantas leñosas nativas, presentan el potencial de interferir en el metabolismo del S, debido a que fueron testeados en diferentes estudios y demostraron actividad antimicrobiana (Scalbert, 1991; Wallace, 2004; Morales y Ungerfeld, 2015; Fagundes *et al.*, 2020).

La especie *Prosopis alba* (PA) es una planta nativa abundante en el monte del Chaco Semiárido Argentino, y se ha comprobado que los rumiantes se alimentan de ella cuando son sometidos a pastoreo del monte, en situación de falta de alimento (Carrizo y Palacio, 2010; Méndez, 2016). García *et al.*, (2017) reportaron presencia de TC en hojas de PA, y en un estudio anterior (Juarez Sequeira *et al.*, 2016) mediante un ensayo *in vitro* observaron que esta especie junto a otras tendría la capacidad de mitigar la reducción de SO₄ a H₂S. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la adición de hojas de PA como fuente de compuestos bioactivos (principalmente TC) a la ración de corderos bebiendo agua con elevado contenido de SO₄ sobre consumo de alimento y agua, digestibilidad, balance de N y concentración ruminal de H₂S.

4.2. Materiales y Métodos

El experimento *in vivo* se llevó a cabo en el Campo Experimental “Francisco Cantos” del EEA INTA Santiago del Estero, Argentina, previa aprobación de protocolo de bienestar animal por el CICUAE INTA CRTSE – IIACS, aval N° 01/20.



Figura 4.1. Estructura del ensayo con 4 tratamientos y 2 repeticiones utilizando jaulas metabólicas.

Se utilizaron 8 corderos criollos ($n = 8$; $26,6 \pm 3,8$ kg PV), los cuales se alojaron en jaulas metabólicas durante el experimento, en un ensayo de 4 tratamientos por 2 períodos. La estructura de los tratamientos fue un factorial de 2×2 , resultado de la combinación de dos calidades de agua y dos niveles de inclusión de hojas de *Prosopis alba* (PA) (0% y 33% de la ración total) incluidos en una ración base compuesta de heno de alfalfa (*Medicago sativa*) y grano de maíz (*Zea mays*). La calidad de agua fue definida por la concentración de sales totales disueltas (STD) y SO_4 : agua de tenor salino bajo (TSB; 499 mg/l de sólidos totales disueltos [STD], 150 mg/l de SO_4) y agua de tenor salino alto (TSA; 10.100 mg/l de STD, 5.400 mg/l de SO_4 ; Cuadro 4.1). Para obtener las concentraciones de sales objetivo en TSA, se agregó sulfato de sodio (Na_2SO_4) al agua de TSB.



Figura 4.2. Alimentación diaria de los corderos.

Los corderos se alimentaron una vez al día (0800 h) al 130% del consumo voluntario y tuvieron libre acceso al agua de bebida. La duración de cada período experimental fue de 21 d. Los primeros 15 d se destinaron para adaptación de los corderos a los tratamientos, del d 16 al 20 se evaluó el consumo de agua y de alimento, el balance de nitrógeno (N) y la digestibilidad de nutrientes, y en el d 21 se extrajeron muestras de gas ruminal para determinación de H_2S .

4.2.1. Toma de muestras y variables estudiadas

4.2.1.1. Composición química

Diariamente se recolectaron muestras de oferta y del remanente de la ración del día anterior de cada tratamiento para posterior procesamiento. Los ingredientes de las raciones utilizadas en el ensayo, las muestras de remanente, las muestras de heces y orina fueron caracterizados de acuerdo a los protocolos normalizados propuestos por el PROMEFA (Jaurena y Wawrzkievicz., 2013). Las muestras de alimento y heces fueron secadas hasta peso constante y molidas a 1 mm con un molino Willey para calcular

contenido de materia seca (MS) y cenizas (AOAC, 1984). La proteína bruta (PB) se determinó por el método de Kjeldahl (AOAC, 1984). Las fracciones de fibra detergente neutro y Fibra detergente ácida (FDN y FDA, respectivamente) se determinaron de acuerdo a Van Soest *et al.* (Van Soest *et al.*, 1991) con un equipo ANKOM® (modelo 220) y ácido (FDA_{MO}, reportado libre de cenizas). El consumo de alimento y agua se calculó como la diferencia entre la cantidad de ración, agua ofrecido y rechazado. La digestibilidad de la materia orgánica (DigMO) se determinó a partir de los datos de consumo nutrientes y de la producción total de heces recolectadas en las jaulas metabólicas.



Figura 4.3. Toma de muestras de heces y orina.

En cada período, se tomó una muestra de heces por animal y por día para almacenar en freezer para posteriormente realizar los análisis de laboratorio. Se colectó orina durante el intervalo de evaluación mediante contenedores con el agregado suficiente de HCl 1,25N con el propósito de mantener el pH por debajo de 3 y evitar pérdidas de N por volatilización. Posteriormente se midió el pH de la muestra de orina (pH-metro

portátil Oakton, Vernon Hills, IL) y se almacenó en freezer para luego ser procesada. Se estimó la partición en la excreción y el balance de N mediante las diferencias entre el N consumido y excretado por orina y heces. Para la determinación de H₂S gaseoso se colectó una muestra de 20 ml de gas ruminal por punción, 8 h post-alimentación, siguiendo el procedimiento utilizado por Gould *et al.*, (1997). Dicha muestra fue fragmentada en dos dosis de 10 ml cada una gaseándose en forma invertida en tubos vacutainer con agua alcalina (pH > 8) para su posterior análisis dentro de las 2 h de realizada la colección. La concentración ruminal de H₂S se midió espectrofotométricamente a 665 nm de longitud de onda, siguiendo el procedimiento de Leibovich *et al.*, (2009).



Figura 4.4. Toma de muestra de gas ruminal para determinación de concentración de sulfuro de hidrogeno.

4.2.1.2. Concentración de compuestos fenólicos y taninos condensados en los ingredientes de las raciones utilizadas.

Para la determinación de la concentración de compuestos fenólicos (FT) y TC en los ingredientes utilizados para formular las raciones, se realizó la extracción para cada ingrediente (heno de alfalfa –*Medicago sativa*-, maíz –*Zea mays*- y PA), y luego se determinó el contenido de fenoles totales y taninos condensados. Para esto se pesó 0,1 g de cada ingrediente y se agregó 10 ml de la mezcla acetona-agua 70:30 (v/v) sometiendo

durante una hora a períodos de sonicación a temperatura ambiente. Luego se centrifugaron las mezclas a 10.000 rpm durante 10 minutos, se transfirió el sobrenadante a un matraz y se llevó a volumen final de 10 ml con agua destilada.

Los compuestos fenólicos se determinaron tomando 0,15 ml del extracto de cada ingrediente llevando a un volumen de 1,20 ml con agua destilada, luego se agregó 0,65 ml del reactivo Folin-Ciocalteu y 3,15 ml de la solución de carbonato de sodio al 20%. Posteriormente se agitó y calentó a 50°C durante 10 min. Se registró la absorbancia a 725 nm con el equipo UNICAM UV2 (UNICAM Limited, Thermo Optek, Torfaen, UK).

El contenido de TC se determinó espectrofotométricamente por el método butanol-HCl (Porter y col., 1986). En un tubo de ensayo, se colocó 1 ml del extracto vegetal y se agregaron 6 ml del reactivo butanol-HCl (95:5). Se sometió a una temperatura de 95°C durante 60 minutos. Posteriormente se dejó enfriar hasta temperatura ambiente y se registró la absorbancia a 550 nm.

4.2.2. Análisis estadístico

Los tratamientos estudiados fueron aplicados de acuerdo a un diseño crossover de dos períodos. El experimento responde a un diseño factorial 2 x 2. Los resultados fueron analizados utilizando el procedimiento MIXED de SAS (SAS Inst. Inc., Cary, NC) Para calcular las medias de los tratamientos se utilizó la opción LSMEANS, siendo declaradas estadísticamente significativas las medias de los tratamientos con $P < 0,05$.

Los términos del modelo fueron:

$$y_{ijkl} = \mu + p_i + s_j + r_k + c_l + (rc)_{kl} + \varepsilon_{ijkl}$$

Donde y_{ijkl} es la respuesta para el período i sobre el cordero j en la suplementación k y calidad de agua l , μ es la media general, p_i es el efecto aleatorio del período i , s_j es el efecto aleatorio del cordero j , r_k es el efecto fijo suplementación k , c_l es el efecto fijo de la

calidad del agua l , $(rc)_{kl}$ es el efecto fijo de la interacción entre la suplementación k con la calidad de agua l , y ε_{ijkl} es el error aleatorio.

4.3. Resultados

4.3.1. Composición química del agua y dietas experimentales.

El agua de TSA tuvo un contenido de STD por encima de los umbrales de tolerancia como así también para el nivel de sulfatos, el cual fue superior a 5 g/L (Cuadro 4.1)

Cuadro 4.1. Composición química de las aguas de bebida experimentales

Item	TSB ¹	TSA ²
	g / L	
Sales Totales Disueltas	0.50	10.10
Calcio	0.04	0.06
Magnesio	0.01	0.02
Sodio	0.11	3.52
Sulfatos	0.15	5.04
Bicarbonatos	0.17	0.08
Cloruros	0.09	2.07

¹TSB = agua de bajo tenor salino; ²TSA = agua de alto tenor de salino

Por su lado, las hojas de PA presentaron mayor contenido de FT y TC que el heno de alfalfa y que el grano de maíz (Cuadro 4.2). El PA tuvo un contenido de PB y FDN similar a la alfalfa, con excepción de la variable FDA que mostró valores ligeramente más altos en PA en comparación con el heno de alfalfa.

Cuadro 4.2. Composición química de los ingredientes de las dietas utilizados en las dietas experimentales.

Ítems	Heno de Alfalfa	Grano de Maíz	Hojas de PA ¹
Materia Orgánica, % MS	77,3	85,0	82,8
Proteína Bruta, % MS	23,7	10,3	20,2
Fibra Detergente Neutro, % MS	51,9	22,4	52,3
Fibra Detergente Ácido, % MS	37,1	5,4	41,0
Fenoles Totales; mg Aga/g MO ¹	5,3	0,7	68,0
Taninos Condensados; mg TC sd / g MO ²	1,2	0,5	117,1

¹ mg Acido gálico equivalente - ² mg Taninos condensados; ¹PA: *Prosopis alba*

Las dietas experimentales se formularon de modo que el contenido de PB y fibras fuera similar entre dietas (isoproteicas y similares en FDN; Cuadro 4.3). El contenido de PB fue suficientemente elevado para cubrir los requerimientos de corderos en crecimiento (NRC, 2007), y los niveles de fibras relativamente bajos para garantizar una buena digestibilidad y consumo de la dieta. Las características no deberían generar limitaciones intrínsecas sobre el consumo, de modo de poner en evidencia la limitación del consumo por acción de los compuestos secundarios en la dieta.

Cuadro 4.3. Composición ingredientes y química de las dietas experimentales

Ítems	Control	PA ¹
<i>Proporción de ingredientes de la dieta, % MS</i>		
Heno de alfalfa	50,0	33,3
Grano de maíz molido	50,0	33,3
Hojas de <i>Prosopis alba</i>	-	33,3
<i>Composición química de las dietas</i>		
Materia Orgánica, % MS	92,8	92,4
Proteína Bruta, % MS	17,1	17,9
Fibra Detergente Neutro, % MS	37,2	41,8
Fibra Detergente Ácido, % MS	21,3	27,8
Cenizas, % MS	7,2	7,4
Fenoles Totales; mg Aga/g MO ¹	3,0	24,6
Taninos Condensados; mg TC sd / g MO ²	0,9	39,6

mg Acido gálico equivalente; ² mg Taninos condensados; ¹PA: *Prosopis alba*

4.3.2. Consumo de agua y alimento

Los resultados registrados para consumo de agua y alimento se presentan en el Cuadro 4.4. No se registraron interacciones dieta \times agua estadísticamente significativas en ninguna de las variables de consumo estudiadas ($P > 0,20$), con excepción del consumo de MO total ($P = 0,05$; CMOT).

Cuadro 4.4. Efecto de la suplementación con hojas de *Prosopis alba* (PA) y calidad de agua en consumo de materia orgánica total (CMOT), consumo de Fibra Detergente Neutro (CFDN), consumo de materia orgánica digestible (CMODig) y consumo de agua (CA).

Ítems	Tratamiento				P-valor			
	TSB ¹		TSA ²		EEM ³	PA	Agua	PA x Agua
	Control	PA ⁴	Control	PA				
CMOT, g/kg PV ^{0,75}	76,1	90,4	68,4	91,8	5,00	<0,05	0,13	0,05
CFDNT, g/kg PV ^{0,75}	30,3	39,4	27,3	39,9	1,87	<0,01	0,34	0,20
CMODig, g/kg PV ^{0,75}	54,9	64,5	48,6	63,8	4,11	0,05	0,24	0,33
CA, g/kg PV ^{0,75}	223,7	259,0	269,1	286,1	25,49	0,41	0,13	0,66

¹TSB = agua de bajo tenor salino; ²TSA = agua de alto tenor salino; ³EEM: error estándar de la media, ⁴PA: *Prosopis alba*

El CMOT fue estadísticamente mayor en el tratamiento PA, aunque el crecimiento en consumo por la inclusión de PA en la dieta de referencia al control fue mayor cuando bebían aguas de TSA. En la Figura 4.5 se puede observar que el CMOT en TSB con o sin PA no difirió entre sí, no obstante el CMOT en TSA fue significativamente mayor para la dieta PA comparada con la dieta control. El consumo de agua (CA), por su parte, no fue afectado por la dieta ni por la calidad del agua (Cuadro 4.4), aunque fue numéricamente mayor en las dietas con PA en comparación con la dieta control. El consumo de fibra detergente neutro (CFDN) fue menor en el tratamiento control ($P < 0,01$), mientras que el tratamiento TSA-PA registró el mayor valor de CFDN, seguido del

tratamiento TSB-PA. Por último, el CMOD fue afectado únicamente con el factor dieta ($P < 0,05$; Cuadro 5). Las dietas PA tuvieron mayor CMODT ($P < 0,05$) que las dietas control independientemente del agua de bebida. Sin embargo, el incremento relativo de CMODT por la inclusión de PA, fue mayor en TSA que en TSB, 32,3% vs. 17,5% respectivamente.

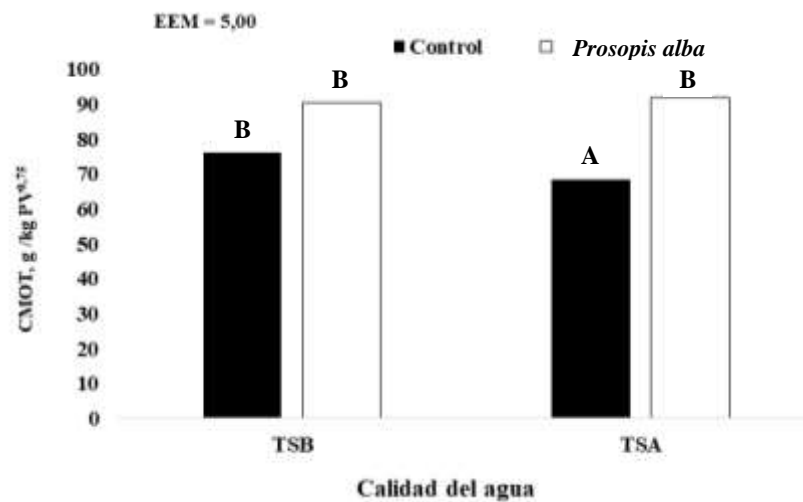


Figura 4.5. Consumo de MO total de acuerdo a la calidad del agua y la inclusión de *Prosopis alba* en la dieta (TSB = tenor salino bajo, TSA = tenor salino alto) – Letras distintas indican diferencias significativas entre medias según LSD.

4.3.3. Digestibilidad aparente del tracto digestivo total

La digestibilidad aparente del tracto digestivo total de la MO (DATDMO) no fue afectada por la interacción dieta \times agua ($P = 0,79$; Cuadro 4.5), ni por la dieta y el tipo de agua ($P > 0,60$). En cuanto a la digestibilidad aparente del tracto digestivo total de la PB (DATDPB), tampoco se registraron diferencias significativas.

Cuadro 4.5. Efecto de la suplementación con *Prosopis alba* (PA) y calidad de agua en digestibilidad aparente del tracto digestivo de la MO (DATDMO) y de la proteína bruta (DATDPB).

Ítems	Tratamiento				P-valor			
	TSB ¹		TSA ²		EEM ³	PA	Agua	PA x Agua
	Control	PA ⁴	Control	PA				
DATDMO, %	72,1	71,3	71,6	69,3	2,73	0,6	0,65	0,79
DATDPB, %	65,2	65,7	65,2	67,4	2,87	0,65	0,78	0,77

¹TSB = agua de bajo tenor salino; ²TSA = agua de alto tenor salino; ³EEM: error estándar de la media, ⁴PA: *Prosopis alba*

4.3.4. Balance de nitrógeno

El total de N consumido (Cuadro 4.6) por los animales durante el ensayo fue similar en los cuatro tratamientos, debido posiblemente a que las dietas fueron formuladas para que sean isoproteicas (Cuadro 4.3), no obstante las dietas con PA tuvieron un consumo de N numéricamente mayor a la dieta sin PA.

Cuadro 4.6. Efecto de la suplementación con *Prosopis alba* (PA) y calidad de agua en consumo de nitrógeno, excreción fecal y urinaria de nitrógeno, excreción de nitrógeno total, % de nitrógeno excretado a través de orina y balance de nitrógeno.

Ítems	Tratamientos				P-valor			
	TSB ¹		TSA ²		EEM ³	PA	Agua	PA x Agua
	Control	PA ⁴	Control	PA				
N consumido, g/d	27,4	31,3	25,5	31,0	2,74	0,24	0,40	0,55
N en orina, g/d	7,1	6,5	8,0	7,3	0,97	0,65	<0,05	0,84
N en heces, g/d	9,1	9,8	8,8	10,0	1,49	0,62	0,92	0,76
N excretado como orina, %	45,6	39,3	47,6	42,2	2,89	0,12	0,37	0,88
Balance de N, g/d	11,1	15,0	9,0	13,6	0,99	<0,01	0,10	0,68
Eficiencia del uso de N, %	40,0	48,3	32,6	43,6	5,78	<0,05	0,16	0,75

¹TSB = agua de bajo tenor salino; ²TSA = agua de alto tenor salino; ³EEM: error estándar de la media; ⁴PA: *Prosopis alba*

En los tratamientos sin PA, se observó una disminución en el consumo de N cuando los animales bebieron agua TSA, mientras que en los animales que consumieron

hojas de PA, el consumo de N fue similar independientemente si bebieron agua de TSB o TSA. La excreción de N a través de la orina y heces no fue significativamente afectada por dieta. Sin embargo, los animales que consumieron hojas de PA excretaron numéricamente menor cantidad de N en comparación con el tratamiento control. A pesar de esto, el porcentaje de N excretado a través de orina no evidenció diferencias significativas, aunque numéricamente la excreción porcentual de N en orina fue menor en PA.

Los animales que consumieron PA tuvieron un mejor balance total de N ($P < 0,01$) independientemente si bebieron TSB o TSA, mientras que la calidad del agua tendió a reducir el balance de N en los animales que recibieron TSA ($P = 0,10$).

La dieta con PA tuvo mayor eficiencia de uso del N que la dieta control (Figura 4.6) independientemente del agua de bebida. Cabe destacar, que si bien el tipo de agua no afectó la eficiencia de uso del N, si se observó una menor eficiencia numérica en el uso del N consumido en el agua de TSA, y numéricamente la eficiencia fue superior en las dietas PA que el control tanto en TSB como TSA.

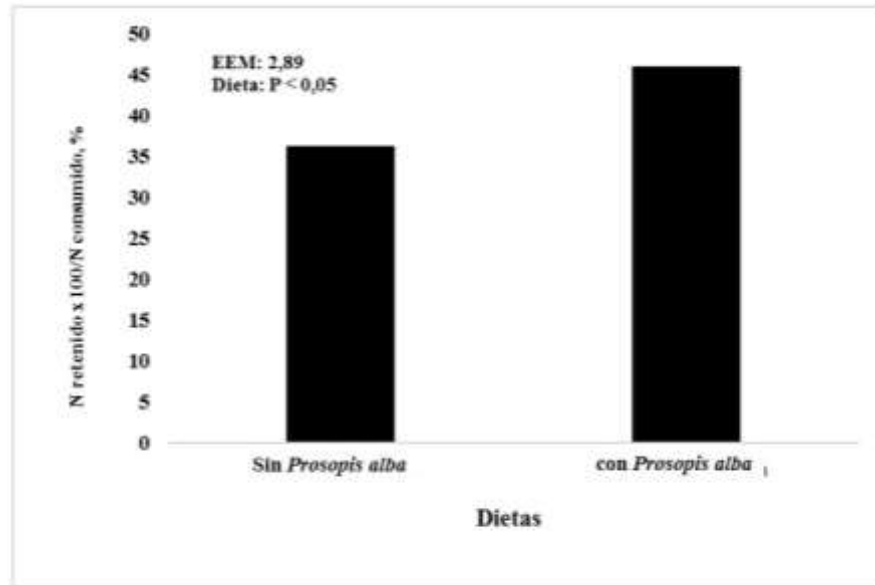


Figura 4.6. Eficiencia de uso de N (%) de acuerdo a la calidad del agua y la inclusión de hojas de *Prosopis alba* en la dieta.

4.3.5. Consumo de Azufre y concentración de sulfuro de hidrógeno gaseoso

El consumo de S a través del agua de bebida no fue afectado por la interacción PA × Agua ($P = 0,26$). El consumo de S fue mayor para los animales consumiendo aguas de TSA ($P < 0,01$). La concentración ruminal de H_2S tendió a ser modificada por la interacción PA × Agua ($P = 0,07$), siendo afectada por ambos factores principales ($P < 0,05$). La inclusión dietaria de PA incrementó la concentración ruminal de H_2S comparado con el control. Sin embargo, los valores observados estuvieron en todo momento por debajo de los umbrales a partir de los cuales se afecta la productividad.

Cuadro 4.7. Efecto de la suplementación con *Prosopis alba* (PA) y calidad de agua en consumo de S en agua y en concentración ruminal de sulfuro de hidrógeno (H₂S)

Ítems	Tratamiento				P-valor			
	¹ TSB		² TSA		³ EEM	PA	Agua	PA × agua
	Control	PA ⁴	Control	PA				
Consumo de S en agua, g S/kg PV ^{0,75}	2,4	2,8	498,6	599,6	41,81	0,29	<0,01	0,26
⁵ H ₂ S, log	2,2	2,9	3,2	3,3	0,14	0,03	0,01	0,07
⁶ (H ₂ S, ppm)	165,9	812,8	1513,5	1949,8				

¹TSA: agua con bajo tenor salino; ²TSA: agua con alto tenor salino; ³EEM: error estándar de la media; ⁴PA: *Prosopis alba*, ⁵H₂S, log: sulfuro de hidrógeno expresado como logaritmo para satisfacer el supuesto de igualdad de varianzas; ⁶(H₂S, ppm): concentración de sulfuro de hidrógeno expresado en partes por millón.

4.4. Discusión

El propósito de este estudio fue evaluar el beneficio potencial de la inclusión de hojas de PA sobre el uso de aguas de bebida de alto tenor de sulfatos, mediante una reducción en la producción de H₂S, un incremento de consumo de alimento, y una mejora en la eficiencia de uso del N debido a la presencia de TC bioactivos.

Los resultados de este estudio mostraron una mejora en el consumo total de alimento, de mayor impacto relativo en los animales que bebían aguas con alto tenor de sulfatos, y en el consumo de MO digestible. El consumo de agua y la concentración de H₂S ruminal no se tradujeron en una mejora por la inclusión dietaria de PA, sin embargo, el CA tuvo buenos niveles y la concentración de H₂S en ningún momento del estudio superó el umbral a partir del cual puede ser afectado el desempeño animal y evidenciar niveles tóxicos (Drewnoski *et al.*, 2014). Si bien, como era de esperar los corderos que bebieron agua de TSA produjeron mayor concentración de H₂S ruminal, en comparación con los corderos que bebieron agua con TSB. Este aumento en la concentración de H₂S

ruminal en respuesta a un mayor consumo de S es coincidente con lo observado en estudios previos con agua de alto tenor de SO_4 (López *et al.*, 2014; López *et al.*, 2017) o mediante el consumo de alimentos con elevado contenido de S (Vanness *et al.*, 2009; Loneragan *et al.*, 2011; Uwituze *et al.*, 2011; Drewnoski y Hansen, 2013). La inclusión dietaria de hojas de PA -como fuente de TC- contrariamente con lo esperado en este estudio, incrementó la concentración de H_2S gaseoso en los corderos. No obstante, el incremento del H_2S gaseoso no estuvo correlacionado con una disminución en consumo como fue observado por Drewnoski y Hansen (2013) y López *et al.*, (2021). Kandyliis (1984) y Drewnoski y Hansen (2013) sugieren que la reducción en consumo por la concentración H_2S se debe a que este gas inhibe la motilidad ruminal e intestinal. En el presente estudio, los consumos de alimento y agua aumentaron con la inclusión dietaria de PA, probablemente debido a que los niveles concentración de H_2S en ningún momento superaron el umbral sugerido de 2000 ppm (Drewnoski *et al.*, 2014). En este sentido, Wolf *et al.*, (2019), en un experimento con niveles de suplementación energético proteica de forrajes de baja calidad en corderos bebiendo aguas con elevada concentración de SO_4 , observaron concentraciones ruminales de H_2S similares a las observadas aún con elevados niveles de grano de maíz que debería generar un ambiente ruminal favorable para la reducción de SO_4 a H_2S . Existen controversias en los resultados obtenidos por diferentes investigadores donde tratan de especificar un umbral a partir del cual comienza a ser evidente la toxicidad por H_2S en los rumiantes. La variabilidad de resultados demuestra que es necesario seguir investigando todos los factores que afectarían el metabolismo del S en el organismo de los rumiantes. Por otro lado, en este ensayo no se observó mitigación de la reducción de los SO_4 por el efecto de los TC sobre las poblaciones de bacterias sulforreductoras, al menos cuantificado mediante la concentración de H_2S gaseoso. En síntesis, si bien la concentración ruminal de H_2S

gaseoso aumentó con la inclusión dietaria de hojas de PA, estos resultados muestran que las hojas de PA como fuente de TC podrían repercutir en una mejora en la utilización de alimentos en rumiantes sujetos a aguas de bebidas de alto tenor de sulfatos. En la actualidad, no hay un completo entendimiento de los mecanismos por los cuales las sales disueltas en el agua afectan el consumo de alimento (López *et al.*, 2021), pero se especula que puede deberse a varios efectos que podrían producir las sales en el organismo animal. En lo que respecta a la inclusión en la dieta de fuentes de TC, existen estudios que muestran incrementos del consumo de alimento en forrajes con concentraciones moderadas de estos metabolitos secundarios (Scharenberg, 2007; Maugen *et al.*, 2014). La concentración de TC aportadas a las raciones, junto al tipo de TC presente, ejercen un efecto importante sobre el consumo de alimento. Diversos autores (Barry y Manley 1984; Waghorn *et al.*, 1994; Beauchemin *et al.*, 2007) afirman que el consumo de alimento puede ser afectado cuando la concentración de TC en la ración es superior 50 g TC / kg MS. En nuestro estudio la concentración de TC estuvo por debajo del valor mencionado, lo que explicaría el aumento en el consumo de MO total cuando se suplementó a los corderos con PA. La respuesta en consumo observada por la inclusión de PA en la dieta puede sustentarse mecanísticamente por posibles cambios en la tasa de pasaje y tasa de digestión ruminal, debido a que la extensión de la digestión de la MO y la PB no difirieron entre dietas y aguas (Min y Solaiman, 2018). Por lo tanto, aunque la concentración ruminal de H₂S gaseoso no fue afectada por la presencia de hojas de PA en la dieta como fuente para reducir la producción de este gas, es probable que haya ejercido una reducción en la producción de H₂S en fase líquida más relacionada con la motilidad, lo que podría justificar el impacto de los TC presentes en las dietas con PA. El incremento en el consumo de MO digestible de mayor magnitud relativa en aguas con elevado contenido

de sulfatos podría sustentar un posible efecto positivo debido a la inclusión de fuentes de TC en la dieta.

En términos generales, los TC forman complejos con carbohidratos, proteínas, y minerales a pH neutro o ligeramente neutro que son disociados en el tracto digestivo inferior, digeridos y absorbidos en el intestino delgado o fermentados en intestino grueso (Barry y Mandey, 1984; Wang *et al.*, 2015; Kelln *et al.*, 2020). Valores de digestibilidad similares de MO y PB observados en este estudio son producto de dietas similares en composición, y es posible que la presencia de TC en la dieta con PA haya cambiado el sitio de digestión sin afectar la extensión de la digestión. Este efecto potencial de los taninos sobre el sitio de digestión de la PB, puede haber sido responsable de un incremento en el consumo con dietas enriquecidas con TC. En este sentido, García (2014) en un estudio *in vitro* para evaluar la actividad biológica de los TC, observó que los TC del PA tuvieron una alta capacidad de formación de complejos con albúmina comparado con otras especies.

Diversos estudios sugieren que el incremento de PB pasante ruminal por la presencia de TC incrementaría el flujo de aminoácidos absorbibles estimulando el consumo de alimento por la presencia de los mismos a nivel intestinal (Owen y Zinn, 1988; Ellis *et al.*, 2000). La suplementación proteica en trabajos recientes (Wolf, 2019; López *et al.*, 2014; 2017) muestran la necesidad de niveles superiores de suplementación proteica para incrementar el consumo de MO digestible en animales bebiendo agua de TSA comparado con aguas de TSB. En este aspecto y en base a lo descrito previamente, los TC posiblemente pueden haber incrementado el flujo de N no amoniacal impactando favorablemente sobre el consumo con aguas de TSA. Este incremento se manifestó en los corderos que bebieron aguas de TSB y TSA. La concentración moderada de TC en la

dieta (39 g TC/ kg MS) de acuerdo a reportado en la bibliografía (Aerts *et al.*, 1999; Min *et al.*, 2003) mejoran el valor nutritivo del forraje en rumiantes, sin deprimir la ingesta voluntaria de alimento ni la digestión de fibra ruminal. De la misma manera, Wang *et al* (2015) estudiaron la especie *Onobrychis viciifolia* por su contenido de TC en novillos en una concentración de 50 g / kg MS y recomienda dicha concentración de TC para evitar reducciones en el consumo de alimento y digestibilidad de la MS. En otro estudio llevado a cabo por Krueger *et al.*, (2010), quienes evaluaron el efecto de extractos de TC de quebracho (1 y 2% de la dieta) en novillos alimentados con ración base de forraje, no registraron efecto sobre el consumo de alimento, peso corporal ni en la ganancia diaria de peso vivo.

En cuanto al consumo de fibra, de modo similar a lo observado con las otras variables fue incrementado por la presencia de TC en la dieta. Si bien no fue influenciado por el tipo de agua, el incremento en el consumo de FDN por la presencia de PA en la dieta fue de mayor magnitud en los animales bebiendo aguas con TSA (46,2%) que aquellos bebiendo TSB (31,3%). El consumo de FDN siguió una tendencia similar en ambas dietas. En contraste con lo observado por otros autores, la digestibilidad de la MO y la PB no fue afectada por el suministro de hojas de PA, posiblemente debido al nivel de moderado a bajo de TC en la dieta. Abdullah *et al.*, (2018) y Costa *et al.*, (2020) reportaron que TC ejercen un efecto inhibitor sobre la actividad de una serie de enzimas como proteasas, zimógenos, lipasas, α -amilasas, celulasas, β -glucosidasas y ureasas, deprimiendo de esta manera, la digestibilidad del alimento. Si bien, se hacen comparaciones y suposiciones con otros estudios en cuanto a los niveles de inclusión dietaria y el impacto de los mismos en forma generalizada, la variabilidad en la actividad biológica de estos compuestos dificulta la generalización en la respuesta esperada mediante la inclusión dietaria. Por lo tanto, en el futuro el uso de especies con metabolitos

secundarios como los TC requiere de mayor investigación para poder explorar el potencial de utilización en los sistemas de alimentación.

La retención de N y la eficiencia de uso del N consumido aumentaron por el consumo de hojas de PA, mientras que el N excretado por heces no fue afectado. El N excretado en orina fue mayor con aguas de TSA, mientras que el consumo de TC a través de hojas de PA tendió a reducir la proporción de N excretado por orina. En un trabajo con ovinos bebiendo aguas de TSA, López *et al.*, (2017) observaron una mejora en la eficiencia del uso del N en respuesta al incremento del estatus proteico de la dieta. En este estudio, el nivel de PB de las dietas experimentales fue elevado en ambas dietas, por lo tanto, es de esperar que la eficiencia de uso del N no se vea afectada por el tipo de agua. Por otra parte, la posible formación de complejos TC – PB ruminal pudo haber mejorado la utilización del N incrementando la proteína no degradable en rumen (PNDR) de la dieta aun en condiciones de aguas de bebida con TSA. Barry *et al.*, (1986) reportaron que determinados niveles de TC de *Lotus pedunculatus* en la dieta incrementaron el flujo duodenal de N no amoniacal impactando positivamente en el uso del N dietario. Este incremento en la eficiencia del uso de N podría deberse principalmente a una mayor tasa de reciclado de N, disminuyendo su excreción por orina, e incrementando su aporte al rumen a través de la saliva (Egan y Ulyatt, 1980).

Dentro del N excretado, el N eliminado a través de orina fue mayor cuando los corderos bebieron TSA, lo que indicaría que el organismo de los animales presenta un proceso de diuresis osmótica debido al aumento de la concentración de solutos (debido a las sales) en los túbulos de los riñones (López *et al.*; 2017). La respuesta observada por la inclusión de TC mediante hojas de PA es similar a lo resumido en la revisión de Wang *et al.*, (2015). En esta revisión de trabajos científicos, concluyeron que el consumo de TC

disminuye la excreción de N urinario, mejora la utilización de N en el organismo animal, cuando los rumiantes fueron suplementados con *Onobrychis viciifolia*. El efecto de los taninos condensados por la ingestión de PA se reflejó en una mejora en el balance total de N. No obstante, la inclusión dietaria de PA en los corderos bebiendo agua de TSB incrementó el balance de N 21%, mientras que los que bebían agua de TSA un 59 %. Estos resultados demostrarían que el consumo de TC mejora la utilización del N por parte de los corderos. Diversos autores (Makkar *et al.*, 1988; Min *et al.*, 2003; Wang *et al.*; 2015) afirman que esa mejora en la utilización del N puede deberse a que los TC en rumen disminuyen la degradabilidad de la proteína en rumen de forma directa, a través de la formación de complejos con las proteínas, lo que reduce su disponibilidad para la degradación microbiana; o de forma indirecta, mediante la unión a enzimas extracelulares (Makkar *et al.*, 1988) metaloenzimas y/o membranas celulares, inhibiendo de esta manera la actividad, transporte de nutrientes y crecimiento de los microorganismos (Koenig y Beauchemin, 2018). Esta inhibición de la degradación de la proteína en rumen, permite su pasaje a intestino e incrementa la disponibilidad y absorción de aminoácidos esenciales (Makkar, 2003; Makkar, 2007). Los mecanismos por los cuales los TC de PA afectan el metabolismo de las proteínas en condiciones de elevadas concentraciones de sulfatos en rumen no están esclarecido, por lo tanto es necesario seguir estudiando estos procesos fermentativos en los rumiantes. A pesar de que la inclusión de TC a partir de hojas de PA en la dieta de los corderos incrementó la concentración de H₂S en rumen, ésta no disminuyó el consumo de MO total ni el de agua, y mejoró el consumo de MO y proteína digestible, así como el balance de N en ambas calidades de agua de bebida, siendo este efecto de mayor magnitud relativa cuando los corderos fueron expuestos al consumo de agua elevada en sulfatos.

4.5. Conclusión

Las hojas de PA utilizadas como fuente de TC para alimentación de corderos expuestos al consumo de agua con elevado tenor de SO_4 no inhibieron la producción de H_2S en rumen. Sin embargo, las concentraciones del gas no disminuyeron el consumo total de MO ni el de agua en los corderos que bebieron agua de TSA. Además, el consumo de TC de PA por parte de los corderos incrementó la digestibilidad del N, disminuyó la excreción de N urinario, mejorando la utilización de N consumido y el balance total de N.

La carencia de una asociación entre un mayor consumo de S y el consumo de alimento, pese a que la concentración de H_2S alcanzó niveles cercanos al umbral establecido, genera la pregunta si realmente el H_2S gaseoso u otra variable es realmente relevante en el desempeño animal con aguas de alto tenor de SO_4 . Por lo antes expuesto, surge la inquietud de generar conocimiento en el futuro que profundice sobre los mecanismos que influyen sobre el consumo de alimento y agua con aguas de alto tenor de sulfatos.

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

CAPITULO 5

12

Conclusiones Generales

13

14

15

16

17

18

19

20

El estudio llevado a cabo en esta tesis pretendió contribuir al conocimiento sobre la utilización de plantas nativas como fuentes de taninos condensados (TC) como una alternativa para disminuir los efectos negativos del consumo de agua con elevados tenores de sulfatos (SO_4) en rumiantes. Para lograr este objetivo se llevaron a cabo dos ensayos de fermentación *in vitro* para el testeo preliminar de especies nativas con posibilidades de modular la fermentación. Finalmente, se realizó un ensayo *in vivo* donde se evaluó una especie seleccionada en corderos que bebieron dos calidades de agua.

El primer objetivo específico planteado fue “Identificar las especies nativas que contribuyan a mitigar la producción de sulfuro de hidrógeno (H_2S) ruminal” y se abordó en el experimento 1 donde se testearon las hojas de 10 especies leñosas que son consumidas por los rumiantes en el Chaco Semiárido Argentino.

La composición química de las especies estudiadas demostró tener una calidad nutricional adecuada para su utilización como suplemento en rumiantes, destacándose los valores de proteína bruta superiores al 15% en todas las especies y valores moderados de FDN. En el primer estudio se seleccionaron tres especies (AA, PA, LD) por la capacidad de mitigación de la producción de H_2S y CH_4 *in vitro* y por mostrar características fermentativas similares a los alimentos que se utilizaron como controles en este experimento: heno de alfalfa y granos de maíz.

Los objetivos específicos 2 y 3 de la presente tesis fueron abordados en el experimento 2, donde se cuantificaron los Fenoles Totales (FT) y Taninos Condensados (TC) de las especies seleccionadas en el experimento 1. Esta cuantificación se utilizó para armar las diluciones de los extractos utilizadas en la fermentación *in vitro*.

Las diferentes respuestas en los parámetros de fermentación *in vitro* obtenidas entre especies, se atribuyeron a que los TC varían entre cada planta nativa, otorgándole diferente actividad biológica debido principalmente a diferencias en la estructura química y peso molecular de los TC.

En base a los resultados obtenidos en el experimento 1 y 2 se seleccionó a la especie para el estudio *in vivo*. No obstante, la respuesta en base a la potencialidad para disminuir la reducción de los SO_4 a H_2S durante la incubación *in vitro* por el agregado de distintas dosis al sustrato base utilizado no nos permitió detectar diferencias sustantivas entre especies. Además, se demostró que los tratamientos con extractos de PA evidenciaron una fermentación ruminal y digestibilidad similar al control. Por otra parte, en la selección de la especie para el estudio *in vivo*, además de los resultados obtenidos en los experimentos *in vitro* y lo observado por García (2014), se tuvo en cuenta la factibilidad de uso de la especie por los animales para consumir sus hojas, debido a que no poseen espinas, y es una planta nativa que permite una cosecha sencilla. Además, es una especie de uso en la industria maderera, donde la hoja puede ser un co-producto que puede utilizarse en alimentación animal.

En el experimento *in vivo* se buscó determinar el impacto de la especie PA sobre el consumo de agua y alimento, digestibilidad, balance de nitrógeno y producción de H_2S en corderos que beben agua con elevados tenores de sulfatos (TSA). Los resultados obtenidos demostraron que la adición de las hojas de PA utilizadas como fuente de TC no inhibieron la producción de H_2S ruminal en los corderos que bebieron aguas de TSA, sin embargo, no se vieron reflejados los efectos negativos del gas sobre el consumo de materia orgánica total ni el consumo de agua, además que se evidenció incrementos en el balance de nitrógeno, y cambio la partición del N – disminuyendo la excreción de N en orina, y mejorando en consecuencia la utilización de N consumido.

Existe escasa información acerca del efecto de TC de hojas de especies nativas en la fermentación y en la respuesta animal cuando los rumiantes consumen elevadas cantidades de azufre. En este trabajo se presentan las primeras evidencias sobre la inclusión dietaria de hojas de PA como fuente de TC que intervienen en los procesos fisiológicos que se generan por exceso de gas H_2S dentro del rumen, por lo que estarían impidiendo manifestar los efectos negativos de dicho gas en el desempeño productivo animal.

Por lo antes expuesto, se sugiere seguir estudiando el efecto de los TC de PA en las vías metabólicas del azufre dentro del organismo ruminal, para poder conocer con certeza cómo intervienen dichos compuestos cuando los rumiantes consumen elevadas cantidades de azufre a través del agua de bebida y poder asociar esas intervenciones con parámetros productivos.

Bibliografía

- Abdullah, M.; Farghaly, M. y Youssef, I. 2018. Effect of feeding *Acacia nilotica* pods to sheep on nutrient digestibility, nitrogen balance, ruminal protozoa and rumen enzymes activity. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.*, 102: 662-669.
- ANKOM (2009) Ankom Technology. 2009. Procedures for fiber and in vitro analysis
Disponibile en: <http://www.ankom.com/>.
- AOAC (1984). 1984. Official Methods of Analysis (14th Ed.). Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC.
- Aerts, R.; McNabb, W.; Molan, A.; Brand, A.; Barry, T. y Peters, J. 1999. Condensed tannins from *Lotus corniculatus* and *Lotus pedunculatus* exert different effects on the *in vitro* rumen degradation of ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) protein. *J. Sci. of Food and Agriculture*, 79: 79-85.
- Apte, S. y Batley, G. 2011. Water Quality. CSIRO Science and Solutions of Australia Series. 5: 61-74.
- Arguelles, J., Brime, J.; Lopez-Sela, P.; Perillan, C. y Vijande, M. 2000. Adult offspring long-term effects of high salt and water intake during pregnancy. *Horm. Behav.* 37:156-162.
- Asanuma, N.; Iwamoto, M. y Hino, T. 1999. Effect of the addition of fumarate on methane production by ruminal microorganisms *in vitro*, *J. Dairy Sci.*, 82: 780-787.
- Azmir, J.; Zaidul, I.; Rahman, M.; Sharif, K.; Mohamed, A.; Sahena, F. y Omar, A. 2013. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *J. Food Engineering*, 117: 426-436.

- Badziong, W.; Thauer, R. 1980. Vectorial electron transport in *Desulfovibrio vulgaris* Marburg growing on hydrogen plus sulfate as sole energy source. *Arch. Microbiol.*, 125: 167-174.
- Barry, T. y Manley, T. 1984. The role of condensed tannins in the nutritional value of *Lotus pedunculatus* for sheep. 2. Quantitative digestion of carbohydrates and proteins. *Brit. J. Nutr.*, 51: 493-504.
- Barry, T.; Manley, T. y Duncan, S. 1986. The role of condensed tannins in the nutritional value of *Lotus pedunculatus* for sheep. 4. Sites of carbohydrate and protein digestion as influenced by dietary reactive tannin concentration. *Brit. J. Nutr.*, 55: 123– 137.
- Basán Nickisch, M. 2007. Manejo de los recursos hídricos en zonas áridas y semiáridas para áreas de secano. Ed. INTA EEA Santiago del Estero. 111 p.
- Bavera, G. 2011. Agua y aguadas para el Ganado. 4ta edición. Rio Cuarto – Córdoba. Ed. Imberti-Bavera. 506 p.
- Beauchamp, R. Jr; Bus, J.; Popp, J.; Boreiko, C.; Andjelkovich, D. 1984. A critical review of the literature on hydrogen sulfide toxicity. *CRC Crit. Rev. Toxicol.*, 13:25-97.
- Birbal S.; Bhat, T. y Bhupinder, S. 2003. Potential therapeutic applications of some antinutritional plant secondary metabolites. *J. Agr. and Food Chemistry*, 51: 5579-5597.
- Bird, P. 1972. Sulphur metabolism and excretion studies in ruminants X. Sulphide toxicity in sheep. *Aust. J. Biol. Sci.*, 25: 1087-1098.
- Bravo, L. 1998. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. *Nutrition Reviews*. 56: 317-333.

- Brodiscou, L.; Papon, Y. y Brodiscou, A. 2000. Effects of dry plant extracts on fermentation and methanogenesis in continuous culture of rumen microbes *Anim. Feed Sci. Technol.*, 87: 263-277.
- Calsamiglia, S.; Busquet, M.; Cardozo, P.; Castillejos, L.; Ferret, A. 2007. Invited Review: Essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. *J. Dairy Sci.*, 90: 2580-2595.
- Campbell, L. y Postgate, J. 1965. Classification of the spore forming sulfate-reducing bacteria. *Bacteriological Reviews*, 29: 359-363.
- Castro, D.; Cerón-Cucchi, M.; Ortiz-Chura, A.; Depetris, G.; Irazoqui, J.; Amadio, A. y Cantón, G. 2021. Ruminant effects of excessive dietary sulphur in feedlot cattle. *J. Anim. Phy. and Anim. Nutr.*, 00: 1-10.
- Catán, A.; Degano, C.; Renolfi, C.; Larcher, R. y Martiaren, R. 1999. Composición botánica y amplitud de la dieta de caprinos que pastorean en un bosque del Chaco semiárido. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)* 16: 451-460.
- Cebra C.; Cebra M. 2004. Altered mentation caused by polioencephalomalacia, hypernatremia, and lead poisoning. *Vet. Clin. Food Anim.*, 20: 287-302.
- Cerdas Ramírez, R. 2013. Formulación de raciones para carne y leche. Desarrollo de un módulo práctico para técnicos y estudiantes de ganadería de Guanacaste, Costa Rica. *InterSedes: Revista de las Sedes Regionales*, 14: 128-153.
- Chifa, C. y Ricciardi, A. 2000. Antraquinonas en plantas empleadas en etnomedicina en el Chaco Argentino. *Rojasiana*, 5: 131-134.
- Church, D. C. 1988. *The ruminant animal: digestive physiology and nutrition*. Prospect Heights, IL., Waveland Press, Inc. 564 p.

- Cord-Ruwisch, R.; Ollivier, B.; Garcia, J. 1986. Fructose degradation by *Desulfovibrio* sp. in pure culture and in coculture with *Methanospirillum hungatei*. *Curr. Microbiol.*, 13:285-289.
- Coria, M.; Fay, J.; Cseh, S.; Brizuela, M. 2007. Effect of drinking water with high concentrations of total salts and sulphates on *in vitro* ruminal degradability of *Thinopyrum ponticum*. *Arch. Med. Vet.*, 39:8-12.
- Costa, E.; Ribiero, C.; Silva, T.; Ribeiro, R.; Vieira, J.; Lima, A.; Barbosa, A.; da Silva Junior, J.; Bezerra, L. y Oliveira, R. 2021. Intake, nutrient digestibility, nitrogen balance, serum metabolites and growth performance of lambs supplemented with *Acacia mearnsii* condensed tannin extract. *Anim. Feed Sci. and Techn.*, 272: 114744.
- Da Silva, C.; de Souza, E.; Pereira, G.; Cavalcante, E.; de Lima, E.; Torres, T. y Da Silva, D. C. 2017. Plant extracts as phytogetic additives considering intake, digestibility, and feeding behavior of sheep. *Trop. Anim. Health and Prod.*, 49: 353-359.
- Demirtaş, A., Öztürk, H., Y Pişkin, İ. 2018. Overview of plant extracts and plant secondary metabolites as alternatives to antibiotics for modification of ruminal fermentation. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 65: 213-217.
- De Sousa, C.; Colmenares, M.; Correia, A. 2008. Contaminación bacteriológica en los sistemas de distribución de agua potable: Revisión de las estrategias de control. *Bol Mal Salud Amb.*, 48:1. ISSN 1690-4648.
- Di Marco, O. 2006. Crecimiento de vacunos para carne. Ed. INTA, Argentina. 204 p.
- Di Rienzo J, Casanoves F, Balzarini M, Gonzalez L, Cuadroda, M. y Robledo, C. InfoStat versión 2015. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
URL <http://www.infostat.com.ar>.

- Digesti, R. y Weeth, H. 1976. A defensible maximum for inorganic sulfate in drinking water of cattle. *J. Anim. Sci.*, 42:1498–1502
- Dorman, H.; Deans, S. 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J. Appl. Microbiol.*, 88: 308–316.
- Dougherty R.; Mullenax, C. y Allison, M. 1965. Physiological phenomena associated with eructation in ruminants. In *Physiology of Digestion in the Ruminant*, Dougherty RW (ed). Butterworths, Washington, DC, p 159.
- Drewnoski, M.; Beitz, D.; Loy, D.; Hansen, S. y Ensley, S. 2011. Factors Affecting Ruminal Hydrogen Sulfide Concentration of Cattle. Iowa State University Animal Industry Report 8(1).
- Drewnoski, M.; Hansen, S. 2013. Effects of delaying the feeding of high sulfur until 28 days after adaptation to finishing diet on cattle intake, gain, and ruminal hydrogen sulfide concentrations. *Livestock Sci.*, 155: 230-235.
- Drewnoski, M.; Pogge, D. y Hansen, S. 2014. High-sulfur in beef cattle diet: a review. *J. Anim. Sci.*, 92:3763-3780.
- Durmic, Z.; Hutton, P.; Revell, D.; Emms, J.; Hughes, S. y Vercoe, P. 2010. *In vitro* fermentative traits of Australian Woody perennial plant species that may be considered as potential sources of feed for grazing ruminants. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 160:98-109.
- Durmic, Z. y Blache, D. 2012. Bioactive plants and plant products: Effects on animal function, health and welfare. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 176: 150-162.
- Egan, A. y Ulyatt, M. 1980. Quantitative digestion of fresh herbage by sheep. *J. of Agric. Sci.*, 95: 47-56.

- Ellis, W.; Poppi, D. y Matis, J. 2000. Feed intake in ruminants: kinetic aspects. En: J. P. F. D'Mello (Editor): Farm Animal Metabolism and Nutrition, CAB International, Wallingford, pp. 335-363.
- Fagundes, G.; Benetel, G.; Welter, K.; Melo, F.; Muir, J.; Carriero, M.; Souza, R.; Meo-Filho, P.; Frighetto, R.; Berndt, A. y Bueno, I. 2020. Tannin as a natural rumen modifier to control methanogenesis in beef cattle in tropical systems: friend or foe to biogas energy production?. *Research in Veterinary Science*, 132: 88-96.
- FAO, 2007. Water quality for livestock and poultry. En: Water quality for agriculture. <http://www.fao.org/docrep/003/t0234e/T0234E07.htm>.
- Francis, G.; Kerem, Z.; Makkar, H. y Becker, K. 2002. The biological action of saponins in animal systems: a review. *Brit. J. Nutr.*, 88:587–605.
- García, M. 2015. Efecto de metabolitos secundarios sobre la fermentación ruminal *in vitro* e *in vivo*. Obtención de productos cárnicos resistentes a la oxidación. Doctoral thesis. Universidad Nacional de Santiago del Estero, Argentina. 173 p.
- García, M.; Cherry, N.; Lambert, B.; Nazareno, M.; Arroquy, J. 2017. Exploring the biological activity of condensed tannins and nutritional value of tree and shrub leaves from native species of the Argentinean Dry Chaco. *J. Sci. Food and Agric.*, 97: 5021–5027.
- García-López, P.; Kung, L. Jr.; Odom, J. 1996. In vitro inhibition of microbial methane production by 9,10 anthraquinone. *J. Anim. Sci.*, 74: 2276-2284.
- Gibson, G. 1990. A Review physiology and ecology of the sulphate-reducing bacteria. *J. Appl. Bacteriol.*, 69: 769-797.
- Goatcher, W. y Church, D. 1970. Taste responses in ruminants. IV. Reactions of pygmy goats, normal goats, sheep and cattle to acetic acid and quinine hydrochloride. *J. Anim. Sci.*, 31:373–382.

- Goel, G.; Puniya, A.; Aguilar, C. y Singh, K. 2005. Interaction of gut microflora with tannins in feeds. *Naturwissenschaften*, 92: 497-503.
- Goering, M. y Van Soest, P. 1970. Forage Fiber Analysis (apparatus, reagents, procedures and some applications). Agricultural Handbook No. 379, USDA, Washington DC. 20 p.
- Goldhaber, M. 2003. Sulfur-rich Sediments, en *Treatise on Geochemistry*. Editor(s): Heinrich D. Holland, Karl K. Turekian, Pergamon. 257-288.
- Gould, D. 1998. Polioencephalomalacia. *J. Anim. Sci.*, 76:309-14.
- Grout, A.; Veira, D.; Weary, D.; von Keyserlingk, M., y Fraser, D. 2006. Differential effects of sodium and magnesium sulfate on water consumption by beef cattle. *J. Anim. Sci.*, 84: 1252–1258.
- Guineo Alvarado, A.; López, A.; Juárez Sequeira, A. y Arroquy, J. 2013. Consumo y parámetros de degradabilidad en novillos durante adaptación a agua salada. *Revista Argentina de Producción Animal*. 33: 207.
- Heng, L.; Vincken, J.; Hoppe, K.; van Koningsveld, G.; Decroos, K.; Gruppen, H.; van Boekel, M. y Voragen, A. 2006. Stability of pea DDMP saponin and the mechanism of its decomposition, *Food Chemistry*, 99: 326.
- Hess, H.; Kreuzer, M.; Diaz, T.; Lascano, C.; Carulla, J.; Soliva, C. y Machmuller, A. 2003. Saponin rich tropical fruits affect fermentation and methanogenesis in faunated and defaunated rumen fluid. *Anim Feed Sci. Technol.*, 109: 79–94.
- Hu, W.; Liu, J.; Ye, J.; Wu, Y. y Guo, Y. 2005. Effect of tea saponin on rumen fermentation *in vitro*. *Anim. Feed Sci. and Technol.*, 120: 333–339.
- Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, 2013. Guía para el cuidado y uso de animales de experimentación. Centro de Investigación en Ciencias Veterinarias. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación. Argentina. 90 p.

- Jaurena, G. y Wawrzkiwicz, M. 2013. Programa para el mejoramiento de la evaluación de forrajes y alimentos – PROMEFA- Guía de procedimientos analíticos. 62 p.
- Juárez Sequeira, A.; López, A.; Fissolo, H.; Jaurena, G.; Arroquy, J. y Nazareno, M. 2016. Follaje de especies nativas como potenciales inhibidoras de la producción ruminal in vitro de sulfuro de hidrógeno y metano. *Revista Argentina de Producción Animal* 36: 195.
- Kamra, D.; Patra, A.; Chatterjee, P.; Kumar, R.; Agarwal, N. y Chaudhary, L. 2008. Effect of plant extracts on methanogenesis and microbial profile of the rumen of buffalo: a brief overview. *Aust. J. Exp. Agric.*, 48: 175-178.
- Kandyliis, K. 1984. The role of sulfur in ruminant nutrition. A Review. *Livest. Prod. Sci.*, 11:611-624.
- Karlin, U. y Díaz, R. 1984. Potencialidad y Manejo de Algarrobos del Árido Subtropical Argentino. SECYT. Programa Nacional de Recursos Renovables. Pp: 50.
- Kathleen, S.; Krause, E.; Wong, D. y Contreras, R. 2004. Gestational and early postnatal dietary NaCl levels affect NaCl intake, but not stimulated water intake by adult rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 286: 1013-1050.
- Kay, R. 1997. Responses of African livestock and wild herbivores to drought. *J. Arid Env.*, 37: 683–694.
- Kelln, B.; Penner, G.; Acharya, S.; McAllister, T. y Lardner, H. 2020. Impact of condensed tannin-containing legumes on ruminal fermentation, nutrition, and performance in ruminants: a review. *Canadian J. of Anim. Sci.*, 101: 210-223.
- Khelalfa, K.; Arhab, R.; Martín García, A.; Zaabat, N. y Belanche, A. 2020. Effect of Acacia purified tannins extract and polyethylene glycol treatment on in vitro ruminal fermentation pattern and methane production. *AsPac J. Mol. Biol. Biotechnol.*, 28: 50-62.

- Koenig, K. y Beauchemin, K. 2018. Effect of feeding condensed tannins in high protein finishing diets containing corn distillers grains on ruminal fermentation, nutrient digestibility, and route of nitrogen excretion in beef cattle. *J. Anim. Sci.*, 96: 4398-4413.
- Komarek, A. 1993. A filter bag procedure for improved efficiency of fiber analysis. *J. Anim. Sci.* 76: 250-259.
- Köster, H.; Cochran, R.; Titgemeyer, E.; Vanzant, E.; Abdelgadir, I. y St-Jean, G. 1996. Effect of increasing degradable intake protein on intake and digestion of low-quality, tallgrass-prairie forage by beef cows. *J. Anim. Sci.*, 74:2473-2481.
- Kristjansson, J.; Schönheit, P. 1982a. Why do sulfate-reducing bacteria out compete methanogenic bacteria for substrates? *Oecologia*, 60: 264-266.
- Kristjansson, J.; Schönheit, P.; Thauer, R. 1982b. Different K_s values for hydrogen of methanogenic bacteria and sulfate reducing bacteria: an explanation for the apparent inhibition of methanogenesis by sulfate. *Archives in Microbiol.*, 131:278-282.
- Krueger, W.; Gutierrez-Bañuelos, H.; Carstens, G.; Min, B.; Pinchak, W.; Gomez, R. Anderson, R.; Krueger, N. y Forbes, T. 2010. Effects of dietary tannin source on performance, feed efficiency, ruminal fermentation, and carcass and non-carcass traits in steers fed a high-grain diet. *Anim. Feed Sci. and Technol.*, 159: 1-9.
- Kung, L. Jr; Bracht, J.; Tavares, J. 2000. Effects of various compounds on *in vitro* ruminal fermentation and production of sulfides. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 84:69-81.
- Kung, L. Jr.; Smith, K.; Smagala, A.; Endres, K.; Bessett, C.; Ranjit, N.; Yaissle, J. 2003. Effects of 9,10 anthraquinone on ruminal fermentation, total-tract digestion, and blood metabolite in sheep. *J. Anim. Sci.*, 81:323-328.

- Leibovich, J.; Vasconcelos, J. y Galyean, M. 2009. Effects of corn processing method in diets containing sorghum wet distillers grain plus solubles on performance and carcass characteristics of finishing beef cattle and on in vitro fermentation of diets. *J. Anim. Sci.*, 87: 2124–2132.
- Loneragan, G.; Wagner, J.; Gould, D.; Garry, F.; Thoren, M. 2001. Effects of water sulfate concentration on performance, water intake, and carcass characteristics of feedlot steers. *J. Anim. Sci.*, 79: 2941-2948.
- López, S. y Newbold, C. 2007. Analysis of methane. Pp. 1-13. En Makkar H and Vercoe P (eds.) *Measuring methane production from ruminants*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- López, A.; Arroquy, J.; Juárez Sequeira, A.; García, M.; Nazareno, M.; Coria, H. y Distel, R. 2014. Effect of protein supplementation on tropical grass hay utilization by beef steers drinking saline water. *J. Anim. Sci.*, 92: 2152–2160.
- Lopez, A.; Arroquy, J. y Distel, R. 2016. Early exposure to and subsequent beef cattle performance with saline water. *Livestock Sci.*, 185: 68-73.
- Lopez, A.; Arroquy, J.; Juárez Sequeira, A.; DiLorenzo, N.; Barrionuevo, M. y Distel, R. 2017. High-sulfate water consumption determines intake and metabolic responses to protein supplementation in lambs consuming low-quality forage. *J. Anim. Sci.* 95: 2111-2120.
- López, A.; Arroquy, J.; Hernández, O.; Nasca, J.; Juárez Sequeira, A.; DiLorenzo, N. y Distel, R. 2021. A meta-analytical evaluation of the effects of high-salt water intake on beef cattle. *J. Anim. Sci.* 99: 1-10.
- Lovley, D.; Phillips, E. 1987. Rapid assay for microbially reducible ferric iron in aquatic sediments. *Appl. Environ. Microbiol.*, 53: 1536-1540.

- Luque, J. 2018. Calidad de agua para bebida de animales. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. 25 p. URL: <https://inta.gob.ar/documentos/calidad-de-agua-para-bebida-de-animales>
- Makkar, H.; Singh, B. y Dawra, R. 1988. Effect of tannin-rich leaves of oak (*Quercus incana*) on various microbial enzyme activities of the bovine rumen. *Brit. J. Nutr.* 60: 287-296.
- Makkar, H. 2003. Effects and fate of tannins in ruminant animals, adaptation to tannins, and strategies to overcome detrimental effects of feeding tannin-rich feeds. *Small ruminant research*, 49: 241-256.
- Makkar, H.; Siddhuraju, P. y Becker, K. 2007. Tannins. In *Plant secondary metabolites*. Humana Press: 67-81.
- Marini, J.; Klein, J.; Sands, J. y Van Amburgh, M. 2004. Effect of nitrogen intake on nitrogen recycling and urea transporter abundance in lambs. *J. Anim. Sci.* 82: 1157-1164.
- Martín, G.; Nicosia, M. y Lagomarsino, E. 1993. Rol forrajero y ecológico de leñosas nativas del NOA. Pp. 93-98. En: XIV Reunión del grupo técnico regional del Cono Sur en Mejoramiento y Utilización de los Recursos Forrajeros del Área Tropical y Subtropical. Grupo Chaco. Santiago del Estero.
- Mathis, C.; Cochran, R.; Heldt, J.; Woods, B.; Abdelgadir, I.; Olson, K.; Titgemeyer, E. y Vanzant, E. 2000. Effects of supplemental degradable intake protein on utilization of medium to low-quality forages. *J. Anim. Sci.*, 78: 224-232.
- Maugen, B.; Provenza, F.; Tansawat, R.; Maughan, C.; Martini, S.; Ward, R.; Clemensen, A.; Song, X.; Cornforth, D. y Villalba, J. 2014. Importance of grass-legume choices on cattle grazing behavior, performance, and meat characteristics. *J. Anim. Sci.*, 92: 2309-2324.

- McAllister, M.; Gould, D. y Hamar, D. 1992. Sulphide-induced polioencephalomalacia in lambs. *J. Comp. Pathol.*, 106:267-278.
- McSweeney, C.; Palmer, B.; McNeill, D. y Krause, D. 2001. Microbial interactions with tannins: nutritional consequences for ruminants, *Anim. Feed Sci. Technol.*, 91: 83-93.
- Mdletshe, Z.; Chimonyo, M.; MarufuI, M. y NsahlaiSlayi, V. 2014. Effects of saline water consumption on physiological responses in Nguni goats. *Small Ruminant Research* 153: 209 – 211.
- Mecawi, A.; Araujo, I.; Fonseca, F.; Almeida-Pereira, G.; Côrtes, W.; Rocha, F. y Reis, L. 2009. Behavioural changes induced by angiotensin-converting enzyme inhibition during pregnancy and lactation in adult offspring rats. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 36: 495-500.
- Mecawi, A.; Macchione, A.; Nuñez, P.; Perillan, C.; Reis, L.; Vivas, L. y Arguelles, J. 2015. Developmental programming of thirst and sodium appetite. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 51: 1-14.
- Meintjes, R. A., y H. Engelbrecht. 2004. Changes in the renal handling of urea in sheep on a low protein diet exposed to saline drinking water. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, 71: 165-170.
- Méndez, R. 2016. Caracterización y valoración nutricional de especies forrajeras consumidas por bovinos en Rivadavia Banda Sur, Salta. Universidad Nacional de La Plata. 23 p.
- Mezzomo, R.; Paulino, P.; Detmann, E.; Valadares Filho, S.; Paulino, M.; Monnerat, J. P. y Moura, L. 2011. Influence of condensed tannin on intake, digestibility, and efficiency of protein utilization in beef steers fed high concentrate diet. *Livestock Sci.*, 141: 1-11.

- Min, B.; Barry T.; Attwood G. y McNabb, W. 2003. The effect of condensed tannins on the nutrition and health of ruminants fed fresh temperate forages: A review. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 106: 3-19.
- Min, M.; Pinchak, W.; Anderson, R.; Fulford, J. y Puchala, R. 2006. Effects of condensed tannins supplementation level on weight gain and in vitro and in vivo bloat precursors in steers grazing winter wheat, *J. Anim. Sci.*, 84: 2546–2554.
- Min, B. y Solaiman, S. 2018. Comparative aspects of plant tannins on digestive physiology, nutrition and microbial community changes in sheep and goats: a review. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.*, 102: 1181-1193.
- Morales, R. y Ungerfeld, E. 2015. Use of tannins to improve fatty acids profile of meat and milk quality in ruminants: A review. *Chilean J. Agric. Research*, 75: 239-248.
- Morine, S.; Drewnoski, A.; Johnson, A. y Hansen, S. 2014. Determining the influence of dietary roughage concentration and source on ruminal parameters related to sulfur toxicity. *J Anim. Sci.*, 92: 4068–4076.
- Moss, A.; Jouany, J. y Newbold, C. 2000. Methane production by ruminants: Its contribution to global warming. *Anim. Res.*, 49: 231-253.
- NASEM. 2016. Nutrient requirements of beef cattle. 8th rev. ed. Washington, DC: Natl. Acad. Press.
- Navas-Camacho, A.; Laredo, M. y Cuesta, A. 1994. Evaluation of tropical trees with high or medium saponin content as dietary alternative to eliminate protozoa from the rumen. *Proc. Soc. Nutr. Physiol.*, 3: 204.
- Nelson, D. y Cox, M. 2005. El Agua. Pp. 45-74. En *Principios de Bioquímica*. 4ta edición. E. Omega.

- Newbold, C.; Hassan, S.; Wang, J.; Ortega, M. y Wallace, R. 1997. Influence of foliage from African multipurpose tree on activity of rumen protozoa and bacteria. *Brit. J. Nutr.*, 78: 237–249.
- NRC (National Research Council). 2000. Nutrient requirements of Beef Cattle. Washington, DC, USA. National Academy Press. 232 p.
- NRC (National Research Council). 2001. Nutrient requirements of Dairy Cattle. 7 rev. ed. Washington, DC., USA. National Academy Press. 381 p.
- NRC (National Research Council). 2007. Nutrient requirements of small ruminants: sheep, goats, cervids, and new world camelids. Washington, DC, USA. National Academy Press. 362 p.
- O'donovan, L. y Brooker, J. 2001. Effect of hydrolysable and condensed tannins on growth, morphology and metabolism of *Streptococcus gallolyticus* (*S. caprinus*) and *Streptococcus bovis*. *Microbiol.*, 147: 1025–33.
- Owens, F. y Zinn, R. 1988. Metabolismo de las proteínas en los rumiantes. En: D. C. Church (Editor): *El Rumiante: Fisiología Digestiva y Nutrición*, Ed. Acribia S.A.: 255-281.
- Paladino, S. y Zuritz, C. 2011. Extracto de semillas de vid (*Vitis vinifera* L.) con actividad antioxidante: eficiencia de diferentes solventes en el proceso de extracción. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias*, 43: 187-199.
- Patra, A.; Kamra, D. y Agarwal, N. 2006. Effect of spices on rumen fermentation, methanogenesis and protozoa counts in in vitro gas production test. *Int. Congr. Ser.*, 1293: 176-179.
- Patra, A. y Saxena, J. 2010. A new perspective on the use of plant secondary metabolites to inhibit methanogenesis in the rumen. *Phytochemistry* 71: 1198-1222.

- Patterson, H.; Johnson, P. y Epperson, W. 2003. Effect of total dissolved solids and sulfates in drinking water for growing steers. Proceedings, Western Section, American Soc. Anim. Sci., 54: 27-30.
- Peck, H. Jr. 1962. The role of adenosine 59 phosphosulfate in the reduction of sulfate to sulfite by *Desulfovibrio desulfuricans*. J. Biol. Chem., 237: 198-203.
- Postgate, J. y Campbell, .L. 1966. Classification of *Desulfovibrio* species, the non-sporulating sulfate- reducing bacteria. Bacteriological Reviews, 30: 732- 738.
- Provenza, F. y Balph, D. 1990. Applicability of five diet-selection models to various foraging challenges ruminants encounters. En: R. N. Hughes (Editor), Behavioural Mechanisms of Food Selection. NATO ASI Series G: Eco. Sci., Springer-Verlag, Berlin. Heidelberg, Germany. 20: 423-459.
- Provenza, F. D. 1995. Postingestive feedback as an elementary determinant of food preference and intake in ruminants. J. Range Manage, 48: 2-17.
- Provenza, F.; Villalba, J.; Cheney, C. y Werner, S. 1998. Self-organization of foraging behavior: From simplicity to complexity without goals. Nutr. Res. Rev., 11: 199-222.
- Puchala, R.; Min, B.; Goetsch, A. y Sahlu, T. 2005. The effect of a condensed tannin-containing forage on methane emission by goats. J. Anim. Sci., 83: 182-186.
- Qi, K.; Lu, C. y Owens, F. 1993. Sulfate supplementation of growing goats: Effects on performance, acid-base balance, and nutrient digestibilities. J. Anim. Sci., 71: 1579 – 1587.
- Radostits, O.; Gay, C.; Hinchcliff, K. y Constable, P. 2007. Veterinary Medicine: A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs, and goats. 10th ed. Saunders Elsevier, Edinburgh, 2006-2012.

- Ray, D. 1989. Interrelationships among water quality, climate and diet on feedlot performance of steer calves. *J. Anim. Sci.*, 67: 357-363.
- Ringuelet, J. y Viña, S. 2013. Introducción a los productos naturales vegetales. En *Productos naturales vegetales*. Coordinado por Ringuelet y Viña. 1a ed.- La Plata: Universidad Nacional de La Plata. E-book. ISBN 978-950-34-0971-8.
- Richter, E. 2011. The effect of dietary sulfur on performance, mineral status, rumen hydrogen sulfide, and rumen microbial populations in yearling beef steers. Iowa State University. 116 p.
- Roca-Fernández, A.; Dillard, S. y Soder, K. 2020. Ruminant fermentation and enteric methane production of legumes containing condensed tannins fed in continuous culture. *J. Dairy Sci.* 103: 7028-7038.
- Roldan, D.; López, A.; Juárez Sequeira, A.; Hernández, O.; Fissolo, H. y Arroquy, J. 2018. Consumo de alimento y agua en vaquillonas alimentadas con diferentes calidades de dieta y bebiendo agua con tenores salinos contrastantes. *Revista Argentina de Producción Animal*, 38: 313-384.
- Rossi, C.; De León, M.; González, G.; Pereyra, A. 2007. Presencia de metabolitos secundarios en el follaje de diez leñosas de ramoneo en el bosque xerofítico del Chaco árido argentino. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 7: 133 – 143.
- Ruiz Moreno, M. 2012. Effect of yeast, protected minerals and bismuth subsalicylate on in vitro fermentation by rumen microbes. Dissertation Submitted To The Faculty Of The Graduate School Of The University Of Minnesota.: 32-34.
- Sager, R.; Casagrande, H. 1998. Efecto de la salinidad del agua de bebida sobre el consumo y digestibilidad de pasto llorón (*Eragrostis curvula*) y alfalfa (*Medicago sativa*). *Invest. Agr. Prod. Sanid. Anim.*, 13: 70-75.

- Santamaria, C.; Martin-Gonzalez, A. y Astorga, F. 2015. Extractos vegetales, aplicación para la reducción del estrés. *Nutrinews*, 75-80.
- Sarturi, J.; Erickson, G.; Klopfenstein, T.; Rolfe, K.; Buckner, C. y Luebke, M. 2014. Impact of source of sulfur on ruminal hydrogen sulfide and logic for the ruminal available sulfur for reduction concept. *J. Anim. Sci.*, 91: 3352 – 3359.
- SAS Institute Inc., SAS OnlineDoc., Version 8, Cary, NC: SAS Institute Inc., 2000.
- Satter, L. y Slyter, L. 1974. Effect of ammonia concentration on rumen microbial protein production *in vitro*. *Brit. J. Nutr.*, 32: 199-208.
- Scalbert, A. 1991. Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry* 30: 3875-3883.
- Scioneaux, A.; Schmidt, M.; Moore, M.; Lindroth, R.; Wooley, S. y Hagerman, A. 2011. Qualitative variation in proanthocyanidin composition of populus species and hybrids: genetics is the key. *J. Chem. Ecol.*, 37: 57–70.
- Scharenberg, A.; Arrigo, Y.; Gutzwiller, A.; Soliva, C.; Wyss, U.; Kreuzer, M. y Dohme, F. 2007. Palatability in sheep and *in vitro* nutritional value of dried and ensiled sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus*), and chicory (*Cichorium intybus*). *Archives of Animal Nutrition*, 61: 481-496.
- Silanikove, N. 1984. Renal excretion of urea in response to changes in nitrogen intake in desert (black Bedouin) and non-desert (Swiss Saanen) goats. *Comp. Biochem. Physiol.*, 79: 651-654.
- Singleton, V. y Rossi, J. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American J. of Enology and Viticulture*, 16: 144-158.
- Solís-Castro, Y.; Zúñiga-Zúñiga, L. y Mora-Alvarado, D. 2018. La conductividad como parámetro predictivo de la dureza del agua en pozos y nacientes de Costa Rica. *Revista Tecnología en Marcha*, 31: 35-46.

- Soliva, C.; Zeleke, A.; Clement, C.; Hess, H.; Fievez, V. y Kreuzer, M. 2008. In vitro screening of various tropical foliages, sedes, fruits and medicinal plants for low methane and high ammonia generating potentials in the rumen. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 147: 53-71.
- Smart, M.; Cohen, R.; Christensen, D.; Williams, C. 1986. The effects of sulfate removal from drinking water on the plasma and liver copper and zinc concentrations of beef cows and their calves. *J. Anim. Sci.*, 66: 669-680.
- Smith, A.; Zoetendal, E. y Mackie, R. 2005. Bacterial mechanisms to overcome inhibitory effects of dietary tannins. *Microbial ecology*, 50: 197-205.
- Squires, V. 1993. Water and its functions, regulation and comparative use by ruminant livestock. Pp: 217-226. En Church, D. *The ruminant animal; digestive, physiology and nutrition*. E. Waverland Press. INC.
- Suttle, N. 1974. Effects of organic and inorganic sulfur on the availability of dietary copper to sheep. *Brit. J. Nutr.*, 32: 559-568.
- Suttle, N. 1991. The interactions between copper, molybdenum and sulfur in ruminants nutrition. *Annu. Rev. Nutr.*, 11: 121-140.
- Tan, H.; Sieo, C.; Abdullah, N.; Liang, J.; Huang, X. y Ho, Y. 2011. Effects of condensed tannins from *Leucaena* on methane production, rumen fermentation and populations of methanogens and protozoa *in vitro*. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 169: 185-193.
- Theodorou, M.; Williams, B.; Dhanoa, M.; McAllan, A. y France, J. 1994. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 48: 185-197.
- Tiemann, T.; Lascano, C.; Wettstein, H.; Mayer, A.; Kreuzer, M. y Hess, H. 2008. Effect of the tropical tannin-rich shrub legumes *Calliandra calothyrsus* and *Flemingia*

- macrophylla* on methane emission and nitrogen and energy balance in growing lambs. *Animal*, 2: 790-799.
- Ultee, A.; Kets, E.; Smid, E. 1999. Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65: 4606–4610.
- Uwituze, S.; Parsons, G.; Karges, K.; Gibson, M.; Hollis, L.; Higgins, J. y Drouillard, J. 2011. Effects of distillers grains with high sulfur concentration on ruminal fermentation and digestibility of finishing diets. *J. Anim. Sci.*, 89: 2817-2828.
- Valdez, F.; Bush, L.; Goetsch, A. y Owens, F. 1986. Effect of steroidal sapogenins on rumen fermentation and on production of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 69: 1568–1575.
- Valtorta, S., Gallardo, M.; Sbodio, O.; Revelli, G.; Arakaki, C.; Leva, P.; Gaggiotti, M. y Tercero, E. 2008. Water salinity effects on performance and rumen parameters of lactating grazing holstein cows. *Int. J. Biomet.*, 52: 239-247.
- Vanness, S.; Meyer, N.; Klopfenstein, T.; Erickson, G. 2009. Ruminal sulfide levels in corn by product diets with varying roughage levels. 2009 Nebraska Beef Report, : 81-83.
- Waghorn, G.; Tavendale, G. y Woodfield, M. 2002. Methanogenesis from forages fed to sheep. *Proc. N. Z. Grassl. Assoc.*, 64: 167– 171.
- Wagner, J.; Loneragan, G.; Gould, D. y Thoren, M. 1998. The effect of varying water sulfate concentration on feedyard performance and water intake of steers. *J. Anim. Sci.*, 75:272.
- Wallace, R.; Arthaud, L. y Newbold, C. 1994. Influence of *Yucca schidigera* extract on ruminal ammonia concentration and ruminal micro-organisms. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60: 1762–1767.

- Wallace, R.; McEwan, N.; McIntosh, F.; Teferedegne, B. y Newbold, C. 2002. Natural products as manipulators of rumen fermentation. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.*, 15: 1458–1468.
- Wallace, R. 2004. Antimicrobial properties of plant secondary metabolites. *Proc. Nutr. Soc.*, 63: 621–629.
- Wang, Y.; McAllister, T.; Newbold, C.; Rode, L.; Cheeke, P. y Cheng, K. 1998. Effect of *Yucca schidigera* extract on fermentation and degradation of steroidal saponins in the rumen simulation technique (RUSITEC). *Anim. Feed Sci. Technol.*, 74: 143-153.
- Wang, Q.; Li, Y.; Sun, F.; Li, X.; Wang, P.; Sun, J.; Zeng, J.; Wang, C.; Hu, W.; Chang, J.; Chen, M.; Wang, Y.; Li, K.; Yang, G. y He, G. 2015. Tannins improve dough mixing properties through affecting physicochemical and structural properties of wheat gluten proteins. *Food Research International*, 69: 64-71.
- Ward, E. y Patterson, H. 2004. Effects of thiamin supplementation on performance and health of growing steers consuming high sulfate water. *Proc. Am. Soc. Anim. Sci. West Sec.*, 55: 375–378.
- Weeth, H.; Hunter, L. 1971. Drinking of sulfate water by cattle. *J. Anim. Sci.*, 32: 277-281.
- Weeth, H. y Capps, D. 1972. Tolerance of growing cattle for sulfate-water. *J. Anim. Sci.*, 34: 256–260.
- Whitehead, D. 2000. Nutrient elements in grassland. *Soil-Plant-Animal relationships*. CAB International. Walingford, UK, 369-370.
- Whitehead, T.; Spence, C.; Cotta, M. 2012. Inhibition of hydrogen sulfide, methane, and total gas production and sulfate-reducing bacteria in in vitro swine manure by

- tannins, with focus on condensed quebracho tannins. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97: 8403-8409.
- Wickersham, T.; Cochran, R.; Titgemeyer, E.; Farmer, C.; Klevesahl, E.; Arroquy, J.; Johnson, D. y Gnad, D. 2004. Effect of postruminal protein supply on the response to ruminal protein supplementation in beef steers fed a low-quality grass hay. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 115: 19-36.
- Wickersham, T.; Titgemeyer, E.; Cochran, R.; Wickersham, E. y Gnad, D. 2008. Effect of rumen-degradable intake protein supplementation on urea kinetics and microbial use of recycled urea in steers consuming low-quality forage. *J. Anim. Sci.*, 86: 3079-3088.
- Wolf Celoné, U., López, A., Fissolo, H., Juárez Sequeira, A. y Arroquy, J. 2016. Efecto de la suplementación energético-proteica de forraje de baja calidad sobre la producción de sulfuro de hidrógeno ruminal en corderos. *Revista Argentina de Producción Animal* 36: 251.
- Wolf Celoné, U. 2019. Efecto de la suplementación energético-proteica sobre la utilización de gramíneas subtropicales de baja calidad, en corderos bebiendo agua de alto tenor salino. Tesis Maestría. Universidad Nacional de Santiago del Estero, Argentina. 93 p.
- Woodward, S.; Waghorn, G.; Ulyatt, M. y Lassey, K. 2001. Early indications that feeding Lotus will reduce methane emissions from ruminants. *Proc. N.Z Soc. Anim. Prod.*, 61: 23-26.
- Wu, H.; Meng, Q.; Zhou, Z. y Yu, Z. 2019. Ferric citrate, nitrate, saponin and their combinations affect in vitro ruminal fermentation, production of sulphide and methane and abundance of select microbial populations. *J. of Applied Microb.*, 127: 150-158.