

EXCESO DE AZUFRE DIETÉTICO EN BOVINOS DE ENGORDE A CORRAL

Damián Jesús Nahuel Castro

Trabajo de tesis a presentarse como requisito parcial para optar por el título de

MAGISTER SCIENTIAE EN SANIDAD ANIMAL

Área de Producción y Sanidad Animal

PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS AGRARIAS

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

UNIVERSIDAD NACIONAL DE MAR DEL PLATA

Balcarce, Argentina

Diciembre de 2018

EXCESO DE AZUFRE DIETÉTICO EN BOVINOS DE ENGORDE A CORRAL

Damián Jesús Nahuel Castro

.....
Director: Vet. Germán Cantón PhD.

.....
Co-director: MV. María Esperanza Cerón Cucchi Dra.

.....
Asesor: MV. Gustavo Depetris MSc.

EXCESO DE AZUFRE DIETÉTICO EN BOVINOS DE ENGORDE A CORRAL

Damián Jesús Nahuel Castro

Aprobada por:

.....
MV. Néstor Latimori MSc.

.....
MV. Ricardo Sager PhD.

.....
MV. Alejandro Rodríguez MSc.

INDICE

INDICE DE TABLAS	vi
INDICE DE FIGURAS	viii
LISTADO DE ABREVIATURAS	ix
ABSTRACT	xiii
INTRODUCCIÓN	1
1. Azufre dietético en bovinos: niveles requeridos y máximos sugeridos. Efectos productivo-sanitarios de su exceso	2
2. Fisiopatología de los perjuicios por exceso de azufre dietético	4
2. 1. Polioencefalomalacia nutricional	4
2. 2. Reducción subclínica de la eficiencia productiva	12
3. Ingredientes dietéticos potencialmente ricos en azufre suministrados en engordes a corral del sudeste de Córdoba y sudoeste de Santa Fe.....	13
3. 1 Granos de destilería	13
3. 2. Agua de bebida	16
4. Contexto y marco teórico general de la tesis. Hipótesis y objetivos	24
MATERIALES Y MÉTODOS	26
1. ESTUDIO DESCRIPTIVO.....	26
1. 1. Agua de bebida	26
1. 2. Azufre total en granos de destilería	26
1. 3. Nivel de azufre dietético total	27
2. ESTUDIO EXPERIMENTAL	29
2. 1. Material experimental y tratamientos aplicados	29
2. 2. Manejo y alimentación de los animales. Estimación de los parámetros productivos	33
2. 3. Parámetros clínicos.....	35
2. 4. Parámetros ruminales	35
2. 5. Análisis estadístico.....	41
RESULTADOS.....	44
1. ESTUDIO DESCRIPTIVO.....	44

1. 1. Agua de bebida: sales totales y sulfatos	44
1. 2. Azufre total en granos de destilería	47
1. 3. Azufre dietético total.....	48
2. ESTUDIO EXPERIMENTAL	50
2. 1. Parámetros clínicos.....	50
2. 2. Concentración de H ₂ S ruminal	51
2. 3. Parámetros productivos	52
2. 4. Ambiente ruminal	53
DISCUSIÓN.....	58
1. ESTUDIO DESCRIPTIVO.....	58
1. 1. Sulfatos en el agua de bebida	58
1. 2. Azufre en granos de destilería.....	59
1. 3. Nivel estimado de azufre dietético total	60
2. ESTUDIO EXPERIMENTAL	61
2. 1. Parámetros clínicos y concentración de H ₂ S ruminal	62
2. 2. Parámetros productivos	65
2. 3. Ambiente ruminal, y concentración de bacterias totales y bacterias ruminales sulfo-reductoras desasimilatorias	66
2. 4. Consideraciones integradoras de los resultados y discusiones de los estudios descriptivo y experimental	69
CONCLUSIONES	71
BIBLIOGRAFÍA	72
APÉNDICE DE TABLAS	82
APÉNDICE DE GRÁFICOS	88

INDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1. Contenido de azufre (% MS) en granos de destilería producidos por diferentes plantas industriales de Argentina y Estados Unidos de América (USA).....</i>	15
<i>Tabla 2. Estadísticas descriptivas de las concentraciones de sulfatos (mg/l), reportadas en agua subterránea del sur de la provincia de Santa Fe</i>	22
<i>Tabla 3. Composición (base seca) de las dietas estándar de engorde a corral, utilizadas para estimar el % de azufre (S) aportado por el alimento sólido</i>	27
<i>Tabla 4. Dietas estándar de engorde a corral, utilizados para seleccionar los niveles de azufre (S) de las dietas BS (bajo azufre) y AS (alto azufre) aplicadas en el estudio experimental.....</i>	30
<i>Tabla 5. Análisis nutricional de los ingredientes de las dietas experimentales</i>	31
<i>Tabla 6. Composición de las dietas experimentales BS (bajo azufre) y AS (alto azufre) (% de MS).....</i>	32
<i>Tabla 7. Composición del núcleo vitamínico-mineral utilizado en las dietas experimentales</i>	33
<i>Tabla 8. Cronograma de adaptación a las instalaciones y a la dieta basada en concentrados.....</i>	34
<i>Tabla 9. Secuencias nucleotídicas, tamaños (pb) y temperaturas de hibridación de los cebadores utilizados para la identificación de BT (bacterias totales) y BRSD (bacterias ruminales sulfo-reductoras desasimilatorias).....</i>	39
<i>Tabla 10. Valores descriptivos de la concentración de sulfatos (mg/l) en el agua de bebida suministrada a bovinos de engorde a corral de la región en estudio</i>	47
<i>Tabla 11. Valores descriptivos del contenido de azufre en granos de destilería (% de MS) provenientes de las dos plantas industriales proveedoras de la región en estudio.....</i>	48
<i>Tabla 12. Estadística descriptiva del % estimado de azufre total, en dietas suministradas a bovinos de engorde a corral de la región en estudio, según incluyeran o no granos de destilería (GD).....</i>	49
<i>Tabla 13. Concentraciones medias y desvíos estándar de H₂S ruminal (ppm) según días de muestreo en bovinos de engorde a corral consumiendo las dietas BS (bajo azufre) y AS (alto azufre).....</i>	52
<i>Tabla 14. Promedios y desvíos estándar de parámetros productivos en bovinos de engorde a corral consumiendo las dietas BS (bajo azufre) y AS (alto azufre) durante 38 días.....</i>	52

<i>Tabla 15. Promedios y desvíos estándar del consumo de azufre total (g/animal/día) en bovinos de engorde a corral consumiendo las dietas BS (bajo azufre) y AS (alto azufre), según días de muestreo</i>	53
<i>Tabla 16. Promedios y desvíos estándar de la concentración de azufre (% de MS) en el alimento consumido por bovinos de engorde a corral consumiendo las dietas BS (bajo azufre) y AS (alto azufre) según los días de muestreo.....</i>	53
<i>Tabla 17. Concentraciones medias relativas (% de bacterias totales) y desvíos estándar, de BRSD (bacterias ruminales sulfo-reductoras desasimilatorias) en contenido ruminal de bovinos consumiendo las dietas BS (bajo azufre) y AS (alto azufre).....</i>	56
<i>Tabla XVIII. Promedios y desvíos estándar de % de acetato (referido a la concentración de AGVs totales) en líquido ruminal de bovinos de engorde a corral consumiendo las dietas AS (alto azufre) y BS (bajo azufre) según días de muestreo.</i>	86
<i>Tabla XIXV. Promedios y desvíos estándar de % de propionato (referido a concentración de AGVs totales) en líquido ruminal de bovinos de engorde a corral consumiendo las dietas AS (alto azufre) y BS (bajo azufre) según días de muestreo.</i>	87

INDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1. Evolución de la frecuencia de ocurrencia de PEM y la concentración de H₂S ruminal, en función de los días post-ingreso al engorde a corral (reproducido de Loneragan et al., 2005).....</i>	9
<i>Figura 2. Departamentos del sudeste de la provincia de Córdoba</i>	19
<i>Figura 3. Distribución de sulfatos en el agua del acuífero libre del sur de la provincia de Córdoba (reproducido de Blarasin et al., 2014).....</i>	20
<i>Figura 4. Subregiones hidrogeológicas del sur de la provincia de Santa Fe (reproducido de Auge 2004)</i>	23
<i>Figura 5. Distribución de frecuencia de las perforaciones utilizadas en establecimientos de engorde a corral de la región en estudio, según la concentración de sales totales en sus correspondientes muestras de agua de bebida (n=68)</i>	45
<i>Figura 6. Distribución de frecuencia de las perforaciones utilizadas en establecimientos de engorde a corral de la región en estudio, según el porcentaje de sulfatos (referido a sales totales) en sus correspondientes muestras de agua de bebida (n=68).....</i>	46
<i>Figura 7. Distribución porcentual de las perforaciones utilizadas en establecimientos de engorde a corral, según la concentración de sulfatos en sus correspondientes muestras de agua de bebida (n=68).....</i>	47
<i>Figura 8. Proporción de perforaciones muestreadas durante el año 2017 en la región en estudio, que suministraban agua de bebida a bovinos de engorde a corral consumiendo o no, granos de destilería (GD).....</i>	48
<i>Figura 9. Niveles medios y desvíos estándar de las concentraciones estimadas de azufre (S) total, en dietas suministradas a bovinos de engorde a corral de la región en estudio, en verano e invierno del año 2017, según incluyeran o no granos de destilería (GD).....</i>	49
<i>Figura 10. Frecuencias respiratorias medias y desvíos estándar, según la fecha de exploración clínica, en bovinos de engorde a corral consumiendo las dietas AS (alto azufre) y BS (bajo azufre).....</i>	50

LISTADO DE ABREVIATURAS

ADP: aumento diario de peso
AS: alto azufre
BRSD: bacterias ruminales sulfo-reductoras desasimilatorias
BRSDT: BRSD totales
BS: bajo azufre
BSR: bacterias sulfo-reductoras ruminales
BT: bacterias totales
CA: conversión alimenticia
CEDA: consumo estimado diario de agua
CMS: consumo de materia seca
DMS: digestibilidad de la materia seca
EC: engorde a corral
EE: extracto etéreo
EEA: estación experimental agropecuaria
EM: energía metabolizable
FDA: fibra insoluble en detergente ácido
FDN: fibra detergente neutra
FR: frecuencia respiratoria
G1: grupo 1
G2: grupo 2
G3: grupo 3
GD: granos de destilería
GDHS: granos de destilería húmedos con solubles
GDS: granos de destilería secos
GSR: gen codificante de la enzima sulfito-reductasa
H₂S: sulfuro de hidrógeno
MS: materia seca
N-NH₃: nitrógeno amoniacal
PB: proteína bruta
PEM: polioencefalomalacia
PND: proteína no degradable
PV: peso vivo
S: azufre

S²⁻: ión sulfuro

SDC: solubles de destilería condensados

SNC: sistema nervioso central

SO₄: sulfato

SO₄Na₂: sulfato de sodio

SRD: azufre ruminalmente disponible

ST: sales totales

RESUMEN

En el sudeste de Córdoba y el sudoeste de Santa Fe, han proliferado sistemas de engorde a corral (EC) de bovinos, con creciente inclusión de granos de destilería (GD) en sus dietas. Según los antecedentes de las altas concentraciones de azufre (S) en estos subproductos, y de sulfatos (SO_4) en el agua de bebida de la región, podría existir un excesivo aporte dietético de S total. En los últimos años se han comunicado problemáticas productivo-sanitarias en bovinos de EC de dicha región, compatibles con las causadas por exceso de S dietético, y asociadas al consumo de GD y/o agua de bebida con altas concentraciones de SO_4 . Con este contexto, se realizó un estudio descriptivo cuyo objetivo fue evaluar el nivel estimado de S total en las dietas suministradas a bovinos de EC en las mencionadas regiones del país. En verano e invierno del 2017 se recolectaron muestras de agua de bebida de 68 perforaciones para determinar la concentración de SO_4 , se recolectaron muestras de GD provenientes de dos plantas industriales para la determinación de S total, y se realizó una encuesta en cada establecimiento acerca del suministro o no, de GD. Las concentraciones medias de SO_4 en el agua, fueron de 184 ± 160 y 90 ± 78 mg/l, en los muestreos estival e invernal respectivamente. El contenido promedio de S en GD fue de $0.67 \pm 0.07\%$ (n=12 lotes) y $0.69 \pm 0.03\%$ (n=6 lotes) para cada una de las plantas industriales. Los promedios estimados de S dietético total en verano fueron de $0.34 \pm 0.02\%$ y $0.23 \pm 0.02\%$ para las dietas con y sin GD, respectivamente, mientras que en el invierno fueron de $0.33 \pm 0.01\%$ y $0.21 \pm 0.01\%$ para las dietas con y sin GD, respectivamente.

Complementariamente se realizó un estudio experimental con el objetivo de evaluar parámetros clínicos, productivos y ruminales, en bovinos de EC sometidos a un exceso de S dietético, similar al que podría resultar de la inclusión de GD y agua de bebida con aportes promedio de S, según antecedentes de la región estudiada. Se utilizaron 12 terneros Aberdeen Angus x Hereford, con un peso inicial de 268 ± 13 kg, a cada uno de los cuales se les asignó aleatoriamente uno de los dos tratamientos propuestos (6 repeticiones para cada uno): BS (control, 0.19% de S dietético) y AS (0.39% de S dietético). Los animales se dispusieron individualmente, recibiendo agua y alimento *ad libitum*. El estudio tuvo 38 días de duración, y los días 0, 22 y 38 se tomaron muestras de gas ruminal para cuantificar la concentración de sulfuro de hidrógeno (H_2S), y de líquido ruminal para determinar las concentraciones de bacterias totales, bacterias sulfo-reductoras, protozoos, nitrógeno amoniacal y ácidos grasos

volátiles. Bisemanalmente se realizó una exploración clínica a cada animal, y se estimó el consumo diario de MS, el aumento diario de peso y la conversión alimenticia. Los parámetros ruminales y clínicos se analizaron como medidas repetidas en el tiempo mediante modelos mixtos. Los parámetros productivos se analizaron mediante pruebas t. A excepción de la elevación de la concentración de H₂S ruminal, el exceso de S dietético evaluado no tuvo efectos clínicos, productivos ni ruminales. En consecuencia, es poco probable que los niveles de S dietético estimados en la mayoría de los EC de la región estudiada, sean perjudiciales para la salud y desempeño animal.

Palabras clave: azufre, granos de destilería, agua de bebida, ambiente ruminal

EXCESS OF DIETARY SULFUR IN FATTENING FEEDLOT CATTLE

ABSTRACT

In the southeast of Córdoba and southwest of Santa Fe provinces, feedlot cattle (FC) systems have proliferated, with growing inclusion of distillery grains (DG) in their diets. According to the high sulfur (S) concentrations in DG, and sulfates (SO_4) on the drinking water of the region, there could be an excessive dietary contribution of total S. In recent years, productive-sanitary problems have been reported in FC in the region, compatible with those due to excess of dietary S, and associated with the consumption of DG and / or drinking water with high SO_4 concentrations. Therefore, a descriptive study was carried out in order to estimate the total S on the diets supplied to FC in this region. During the summer and winter of 2017, drinking water from 68 different perforations were collected to determine the SO_4 concentration, and also DG samples from two different industrial plants for the determination of total S (% DM) and a survey was carried out in each establishment regarding the supply or not of GD. Mean SO_4 concentrations in water were 184 ± 160 and 90 ± 78 mg / l, in the summer and winter samples, respectively. The average content of S in DG was $0.665 \pm 0.07\%$ (n = 12 lots) and $0.687 \pm 0.03\%$ (n = 6 lots) for each of the industrial plants. The estimated averages of total dietary S in summer were $0.34 \pm 0.02\%$ and $0.23 \pm 0.02\%$ for diets with and without GD, respectively, while in winter they were $0.33 \pm 0.01\%$ and $0.21 \pm 0.01\%$ for diets with and without GD, respectively.

Additionally, an experimental study was carried out to evaluate clinical, productive and ruminal parameters, in steers subjected to different levels of dietary, similar to that resulting from the inclusion of GD, according to antecedents of the region. In this experiment, 12 crossbred Aberdeen Angus \times Hereford steers, with initial weight of 268 ± 13 kg, were randomly assigned to two treatments (6 repetitions for each), consisting of two levels of dietary S: BS (control, 0.19%) and AS (0.39%). Animals were disposed individually receiving water and food *ad libitum*. The study lasted 38 days, and on days 0, 22 and 38 ruminal gas were sampled to quantify the concentration of hydrogen sulfide (H_2S), and ruminal fluid to determine the concentrations of total bacteria, sulfur-reducing bacteria, protozoa, and ammoniacal nitrogen. Clinical examination was performed on each animal fortnightly. Furthermore, daily consumption of MS, daily weight gain and feed conversion were calculated. The ruminal and clinical parameters were analyzed as measures repeated over time using mixed models. The productive

parameters were analyzed by t tests. With the exception of the elevation of ruminal H₂S concentration, the excess of dietary S evaluated did not have clinical, productive or ruminal effects. Consequently, it is unlikely that the dietary S levels estimated in most of the FC of the region studied, are detrimental to animal health and performance.

Key words: sulfur, distillery grains, drinking water, rumen environment

INTRODUCCIÓN

En los últimos años, la producción argentina de carne bovina se ha intensificado (Demarco, 2010). En la etapa de engorde, dicho proceso fue reflejado por la difusión del sistema de engorde a corral (EC), de manera que alrededor del 26 al 30% del total nacional de cabezas faenadas entre el 2008 y el 2016, provino de establecimientos formalmente inscriptos como tal (SENASA 2016). La implementación de este sistema de engorde ha sido más acentuada en la región central del país (Rossanigo *et al.*, 2010), lo que se debió principalmente, al desplazamiento de los sistemas ganaderos pastoriles por la agricultura (Demarco, 2010), y la disponibilidad de alimentos idóneos para el EC.

El notable desarrollo regional de la agricultura, acompañado por un incremento en la industrialización de las materias primas, ha generado una gama de alimentos alternativos, que permiten mejorar la eficiencia y rentabilidad de los sistemas ganaderos (Gallardo, 2014; Bagues, 2016). Entre aquellos alimentos, se destacan los subproductos derivados de la industria del bioetanol, conocidos como granos de destilería (GD). Su bajo costo relativo y elevado valor nutricional, sumados a la cercanía de las plantas elaboradoras de bioetanol, fundamentan su difundida y creciente utilización, en las dietas de EC de la región central del país. Sin embargo, a pesar de sus excelentes cualidades nutricionales, uno de los potenciales inconvenientes de los GD, sería su alto contenido de azufre (S) (Klopfenstein *et al.*, 2008). Esto último, sumado a los antecedentes de altos contenidos de sulfatos (SO_4) en el agua subterránea de la región central de Argentina (Bitesnik, 1968; Sager, 2000; Fresina, 2001, Minatel *et al.*, 2004; Postma *et al.*, 2010; Blarasin, Cabrera, Matteoda, Aguirre, Giuliano Albo *et al.*; 2014), y que ésta es la fuente exclusiva de agua de bebida para los sistemas de EC, podría resultar en dietas con excesivo aporte de S total. El exceso de S dietético en bovinos de EC, se ha identificado como perjudicial para la productividad y salud animal, en países pioneros en el uso de GD, y con problemáticas hidrogeológicas semejantes a las reportadas en dicha región nacional (Gould *et al.*, 2002, Crawford, 2007).

Aunque la información nacional y regional es escasa respecto del contenido de S en las dietas de bovinos en EC, en el sudeste de la provincia de Córdoba y el sudoeste de la provincia de Santa Fe, se han comunicado problemáticas productivo-

sanitarias compatibles con las causadas por exceso de S dietético, y efectivamente asociadas al consumo de GD y/o agua de bebida con altas concentraciones de SO_4 (Margineda, C. 2016 com. pers.; Descarga, C. 2018, com. pers.; Castro *et al.*, 2018).

Con este contexto regional, en el presente trabajo se realizó un estudio descriptivo, cuyo objetivo fue caracterizar preliminarmente el contenido de S en GD, la concentración de SO_4 en el agua de bebida, y el nivel estimado de S total, en las dietas suministradas a bovinos en EC del sudeste de la provincia de Córdoba y el sudoeste de la provincia de Santa Fe. Complementariamente, se realizó un estudio experimental, cuyo objetivo fue evaluar parámetros clínicos, productivos y ruminales, en bovinos de EC consumiendo una dieta con exceso de S.

1. Azufre dietético en bovinos: niveles requeridos y máximos sugeridos. Efectos productivo-sanitarios de su exceso

El S es un mineral esencial para la vida y el óptimo desempeño de los bovinos, dado que es un sustrato para la síntesis ruminal de aminoácidos azufrados y vitaminas hidrosolubles (NRC 2000). Sus requerimientos se expresan en términos de S dietético total, siendo del orden del 0.15 al 0.2% de la materia seca (MS) dietética, considerando todas las formas químicas aportadas por el alimento sólido, como por el agua de bebida (NRC 2005). La mayoría de las dietas satisfacen esta demanda, por lo que exceptuando contextos nutricionales particulares, la deficiencia de S es relativamente poco frecuente (NRC 2000).

Según la bibliografía internacional, el exceso de S dietético es una condición relativamente frecuente. Los límites máximos de S sugeridos para consumo de bovinos, solamente se han definido en base al riesgo de generar cuadros de Polioencefalomalacia (PEM) nutricional, considerando el nivel de inclusión de forraje dietético. En el caso de dietas con menos de 15% de forraje, como las utilizadas en el periodo de terminación en EC, el máximo sugerido es de 0.3% de S total, mientras que para animales consumiendo más del 40% de forraje, es de 0.5% (NRC 2005). De lo anterior se desprende que en el caso de dietas de EC, los niveles de S presentan un estrecho intervalo, entre el nivel requerido, y el potencialmente tóxico.

Además de la asociación entre exceso de S dietético y la predisposición a cuadros de PEM, se han reportado perjuicios subclínicos de variable magnitud sobre parámetros productivos, tales como la reducción del consumo de materia seca (CMS), la disminución del aumento diario de peso (ADP) y el detrimento de la conversión alimenticia (CA) (Zinn *et al.*, 1999; Loneragan *et al.*, 2001; Ritcher *et al.*, 2011; Drewnosky *et al.*, 2014). Así, mediante un meta-análisis integrador de varios ensayos con bovinos de EC, Drewnosky *et al.* (2014) reportaron que cada 0.1% de S dietético inorgánico que se adiciona por encima del 0.2% del S total, la reducción del ADP promediaba los 80 g/día.

Como se mencionó anteriormente, la estimación del nivel de S de la dieta debe contemplar la totalidad de la misma, es decir, el aportado por el alimento sólido y por el agua de bebida (NRC 2005; Crawford, 2007). En esta última, el S se encuentra principalmente en forma de SO_4 (Gould, 2000). Se ha reportado que en muchas regiones de Norteamérica, el aporte de SO_4 en el agua de bebida de origen subterráneo, puede ser muy elevado, implicando perjuicios productivo-sanitarios en los sistemas ganaderos (Gould, 1998; Gould *et al.*, 2002; Crawford, 2007). En este sentido, en un ensayo de EC con el suministro de agua de bebida con 125, 250, 500, 1000 y 2000 mg/l de SO_4 , resultantes en 0.18, 0.19, 0.22, 0.29 y 0.4% de S dietético total respectivamente, Loneragan *et al.* (2001) reportaron que cada 100 mg/l de SO_4 , el ADP y la CA (ADP/CMS diarios) se redujeron en 30 g y 0.002 unidades respectivamente. Estos autores concluyeron que niveles superiores a 0.22% de S dietético total, redujeron el ADP y la eficiencia de CA, especialmente en la primera mitad del ciclo de EC.

Si bien se ha observado que el nivel de S dietético inorgánico es el que mejor explica la reducción subclínica del desempeño productivo (Drewnosky *et al.*, 2014), las fuentes orgánicas también deben ser consideradas (Gould, 1998). De esta manera, se sugiere hacer referencia al nivel de S total, debido a su objetividad como herramienta diagnóstica, como a la positiva asociación dosis-respuesta observada entre dicho parámetro y la incidencia de PEM (Gould, 2000).

2. Fisiopatología de los perjuicios por exceso de azufre dietético

2. 1. Polioencefalomalacia nutricional

El exceso de S dietético es transformado en ion sulfuro (S^{2-}) por bacterias sulforeductoras ruminales (BSR), siendo el metabolito intermediario de la mayoría de los efectos negativos asociados a dicha condición (Gould, 1998). Dentro de este grupo de bacterias se han descrito dos subgrupos metabólicamente diferentes: las BSR asimilatorias que reducen compuestos azufrados a S^{2-} para su posterior incorporación a la síntesis de aminoácidos, y las BSR desasimilatorias (BSRD), que generan S^{2-} como un desecho terminal de su respiración anaeróbica (Barton y Fauque, 2009; Bradley, 2011). En un ambiente ruminal ácido como el frecuentemente encontrado en los bovinos consumiendo dietas de EC, la mayor parte del S^{2-} se reduce a sulfuro de hidrógeno (H_2S), que rápidamente se volatiliza hacia el estrato ruminal gaseoso (Schoemaker y Beitz, 2012). El H_2S gaseoso ruminal se encuentra normalmente en concentraciones inferiores a 500 ppm (Gould, 1998), pero ante la ingesta de exceso de S dietético, se produce en cantidades anormalmente elevadas. Si bien se desconoce cuál es la principal vía de absorción del H_2S , una parte del mismo podría ser absorbido a través de las paredes ruminales (Niles *et al.*, 2000), mientras que otra parte podría ser eructada, inhalada y vehiculizada en sangre luego de atravesar la barrera hemato-gaseosa pulmonar, evadiendo la detoxificación hepática (Dougherty y Cook, 1962; Bray y Till, 1975; Kandyliis, 1983). Bajo esta condición, se ha comprobado que tanto el H_2S como sus derivados, son capaces de inducir injuria tisular sistémica (Truong *et al.*, 2006), sin embargo, los daños más notorios se producirían en el sistema nervioso central (SNC) donde provoca la necrosis de neuronas cerebro-corticales, un cuadro patológico denominado PEM.

La PEM afecta principalmente a rumiantes jóvenes, y en bovinos se asocia a múltiples causas, tales como deficiencia de tiamina, intoxicación por plomo, exceso de sodio dietético concomitante a privación hídrica, y exceso de S dietético (Gould, 1998). En el caso de PEM por exceso de S, el mecanismo que media esta muerte neuronal no ha sido completamente dilucidado, pero se ha comprobado que el H_2S es un potente agente oxidativo e inhibidor de la respiración celular (Bechaump *et al.*, 1984; Olkowski, 1997). Lo anterior, combinado a la extremada exigencia energética, riqueza lipídica y reducida disponibilidad de antioxidantes del SNC, resultaría en que sea el

tejido principal y más severamente afectado (Gilgun-Sherki *et al.*, 2001; Magistretti, 2008).

El rol de la tiamina en la fisiopatología de PEM por exceso de S, aún no ha sido completamente dilucidado, dado que los estudios para evaluar la asociación entre la ocurrencia de dicha patología y la deficiencia de tiamina, han obtenido resultados contradictorios. No obstante, se ha observado que la suplementación de tiamina en el alimento, reduce la incidencia de casos clínicos de PEM en rumiantes consumiendo exceso de S (Olkowski *et al.*, 1992). Adicionalmente, los animales con PEM por exceso de S, frecuentemente responden de manera positiva al tratamiento con tiamina. Hasta el momento se cree que el beneficio del tratamiento con esta vitamina es inespecífico, ya que también hay respuesta positiva en casos de PEM con otras etiologías (Gooneratne *et al.*, 1989; Crawford, 2007; Knighty *et al.*, 2008; Enseley, 2011). Considerando que la tiamina requiere de una serie de procesos de fosforilación para adquirir su función biológica, la controversia de resultados podría deberse a diferencias en la forma química de la tiamina que se determinó en los diferentes estudios. En este sentido se ha observado una disminución en la concentración de pirofosfato de tiamina, la forma activa de esta vitamina, en el tejido cerebral de animales con PEM por exceso de S. Por lo tanto, se menciona que el exceso de S dietético puede incrementar la demanda metabólica de pirofosfato de tiamina, o reducir la formación de la misma (Olkowski *et al.*, 1992; Amat *et al.*, 2013).

2. 1. 1. Signos clínicos y lesiones

La severidad de las lesiones encontradas en los cuadros de PEM, tienen correlato con la magnitud del exceso de S, de manera que se han descrito cursos clínicos agudos y subagudos de PEM por esta causa. La forma subaguda de PEM se desarrolla dentro de horas a días, y se caracteriza principalmente por discapacidad visual y ataxia (Gould, 2000). Los animales afectados se aíslan del resto y suelen presentar anorexia, ataxia, hipermetría, hiperestesia, temblores musculares, movimientos involuntarios de las orejas, contracciones de los músculos faciales, nistagmo, estrabismo y/o desvío de la cabeza. Los signos suelen progresar hacia una ceguera cortical con disminución del reflejo de amenaza, fronto-presión, opistótono, estrabismo dorsomedial, miosis, disfagia y ptialismo. El cuadro subagudo de PEM puede evolucionar hacia la recuperación pero con secuelas neurológicas, ataxia,

disfunción visual y reducción del desempeño productivo, o en otros casos, puede progresar hacia una forma más grave, con decúbito y convulsiones (Radostitis *et al.*, 2006; Cunha *et al.*, 2008). En la mayoría de los casos, a pesar de la disminución del reflejo de la amenaza visual, el reflejo pupilar suele estar presente debido a que la ceguera se origina por la lesión de la corteza occipital (Mendes *et al.*, 2007). La forma aguda de PEM se manifiesta con ceguera, decúbito, episodios de convulsiones tónicas, y con frecuencia, la muerte. Esta sería la forma más grave de la enfermedad, resultante del consumo de grandes cantidades de S y la generación ruminal de grandes cantidades de H₂S (Gould, 2000). El pronóstico es desfavorable para los animales que presentan la forma aguda o los signos más graves de la subaguda (Kandyliis, 1983; Olkowski, 1997; Burgess, 2008). A pesar de que la lesión afecta inicialmente la corteza cerebral causando ceguera y otros signos de origen cerebral, se puede observar estrabismo y nistagmo debido a la compresión del tronco encefálico, y opistótono por la compresión del cerebelo (Riet-Correa *et al.*, 2007).

Histopatológicamente, la PEM se caracteriza por necrosis de neuronas cerebrocorticales. Inicialmente, las neuronas se encogen y tienen un citoplasma eosinofílico homogéneo. Los núcleos son picnóticos, descoloridos o ausentes. El neuropilo asociado pierde el patrón de marcación dendrítica normal y se vuelve homogéneo, y a veces hipereosinofílico. En esta etapa, si el tejido cerebral es observado bajo iluminación ultravioleta de 366 nm, suele detectarse una autofluorescencia corticocerebral. En etapas posteriores, el tejido cerebrocortical afectado suele cavitarse, a medida que los macrófagos se infiltran y eliminan el tejido necrótico. La cavitación puede ser evidente, y la autofluorescencia no es detectada en esta etapa. En los casos agudos de PEM, además de necrosis neuronal laminar, puede haber espongirosis cortical laminar. La zona de cambio esponjoso se encuentra en las capas profundas de la corteza cerebral, y puede extenderse una corta distancia hacia la sustancia blanca subyacente. El patrón de cambio esponjoso es indicativo de tumefacción astrocítica. En algunos casos, esto es suficiente para provocar una presión intracraneal elevada, que se suele manifestar por herniación cerebelar a través del *foramen magnum*, con tumefacción y hematomas parahipocampales, causados por herniación transtentorial caudal de los lóbulos occipitales (Gould, 2000). Otro patrón patológico observado con la forma aguda de PEM, es la necrosis vascular multifocal, hemorragias y necrosis parenquimatosa en materia gris profunda, incluyendo el cuerpo estriado, el tálamo y el mesencéfalo (Jeffrey *et al.*, 1994; Low *et al.*, 1996; Gould, 2000).

2. 1. 2. Concentración umbral de H₂S respecto del riesgo de Polioencefalomalacia

Si bien hay consenso sobre las concentraciones normales de H₂S gaseoso ruminal (inferiores a 500 ppm), no sucede lo mismo con la concentración umbral para la inducción de PEM. Se han reportado valores muy variables en animales con PEM, así como concentraciones muy elevadas H₂S en animales sin signología clínica de dicha patología (Drewnosky *et al.*, 2014). Estos contrastes podrían deberse a que la concentración de H₂S ruminal es afectada por múltiples factores, tales como el lapso pos-prandial en el que se realiza su medición, el nivel de consumo de alimento, el nivel de S dietético, la forma química del S suministrado, la composición nutricional de la dieta, el régimen de alimentación, el grado de adaptación ruminal a la dieta en cuestión y una predisposición individual de cada animal (Drewnosky *et al.*, 2014). Adicionalmente, podría existir una susceptibilidad metabólica individual al H₂S, dado que, si bien las concentraciones ruminales de H₂S y la incidencia de PEM se asocian positivamente (Gould *et al.*, 1997; Loneragan *et al.*, 2005), el primer parámetro no explica completamente al segundo (Drewnosky *et al.*, 2014). Por todo lo anteriormente mencionado, en casos de brotes de PEM, la concentración de H₂S ruminal se debe determinar sobre una muestra de animales cohabitantes a los enfermos, pero que no manifiesten signología clínica, dado que los animales afectados reducen su ingesta de alimento, reduciéndose la concentración de H₂S ruminal (Gould, 2000). Aunque este contexto dificulta la comparación de los resultados de diferentes estudios, y el establecimiento de una concentración ruminal umbral de H₂S para el desarrollo de PEM, Gould (1998) sugirió que niveles superiores a 2000 ppm serían riesgosos de inducirla. Este valor podría tomarse como referencia dado que supera ampliamente al límite normal de 500 ppm, a la vez que la mayoría de las concentraciones medias de H₂S reportadas en brotes naturales de PEM, así como en momentos previos al desarrollo de PEM en condiciones experimentales, han superado dicho umbral (Gould, 2000; Cunha *et al.*, 2008).

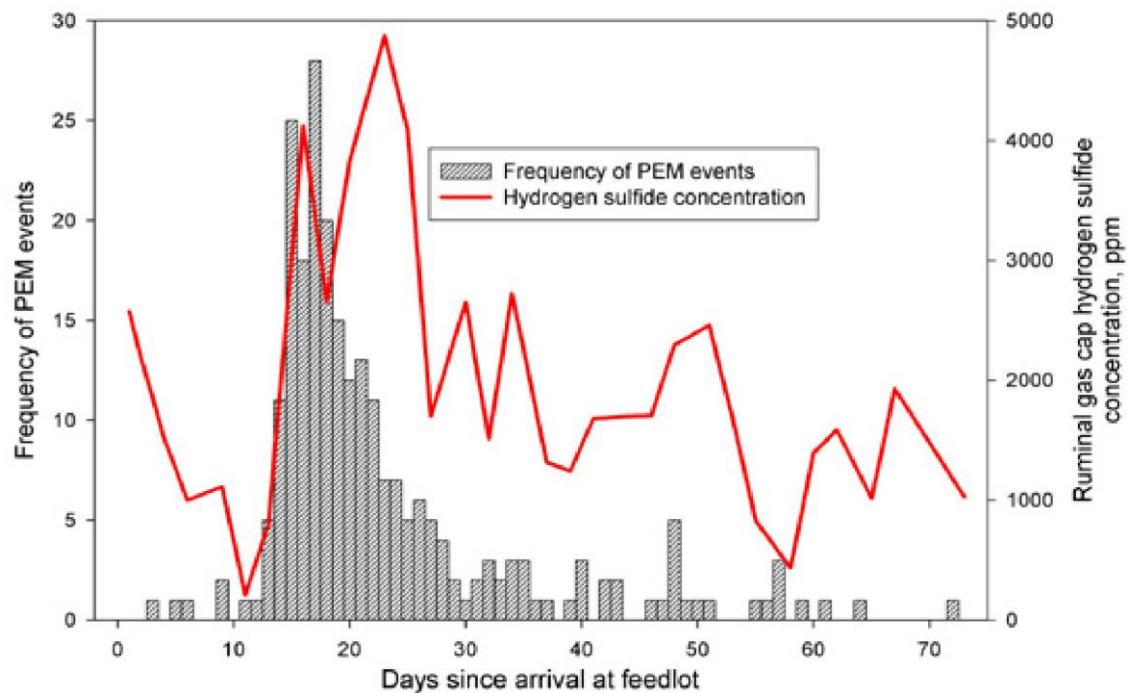
2. 1. 3. Factores que afectan la concentración de H₂S ruminal

Como se mencionó en el apartado anterior, las concentraciones de H₂S ruminal son afectadas por múltiples factores, aunque en algunos casos, aun no se han dilucidado completamente. A continuación se describen los factores más importantes que explican su variabilidad.

2. 1. 3. 1. Adaptación ruminal a la dieta con exceso de azufre

Es bien conocida la necesidad de un período de adaptación ruminal de alrededor de los 30 días post-inicio de la ingesta del exceso de S, para que se evidencie la máxima concentración de H₂S ruminal, frecuencia de PEM (Figura 1) y deterioro del desempeño productivo (Loneragan *et al.*, 2001; Ritcher *et al.*, 2011; Drewnosky *et al.*, 2013). Luego de aquel lapso, dichos parámetros tienden a estabilizarse (Loneragan *et al.*, 1997; Drewnosky *et al.*, 2012), de manera que la mayoría de los animales se adapta exitosamente al exceso de S, aunque el mecanismo de esta adaptación es incompletamente entendido (Gould, 1998). Al menos parcialmente, la explicación radicaría en cambios ruminales, que según la mayoría de las hipótesis, asentarían en las poblaciones de BRSD. Si bien en condiciones normales, este tipo de bacterias constituyen menos del 1% de la poblacional ruminal bacteriana (Callaway *et al.*, 2010), al disponer de exceso de S dietético pueden representar un peligro para la vida del animal (Gould, 1998).

Figura 1. Evolución de la frecuencia de ocurrencia de PEM y la concentración de H_2S ruminal, en función de los días post-ingreso al engorde a corral (reproducido de Loneragan *et al.*, 2005)



2. 1. 3. 2. Momento de muestreo relativo a la ingesta de alimento

El lapso post-prandial en el que se realiza la medición de H_2S ruminal, es un factor con influencia relevante sobre su concentración (Drewnosky *et al.*, 2014). En este sentido, se ha observado que con un régimen de alimentación basado en un único suministro diario, la máxima producción de H_2S se produciría entre las 3 y las 12 horas post-suministro del alimento (Felix *et al.*, 2011; Drewnoski *et al.*, 2012). Por tal motivo, se ha cuestionado la concentración umbral de H_2S ruminal inductora de PEM propuesta por Gould *et al.* (1997), dado que estos autores fundamentaron su afirmación en base a mediciones que no fueron realizadas a en el mismo horario, y muchas de ellas se realizaron pre-prandialmente, cuando las concentraciones de H_2S serían menores, y podrían corresponderse con concentraciones pos-prandiales mayores (Drewnosky *et al.*, 2014). De esta manera, varios estudios han reportado

concentraciones de 4000 a 6000 ppm de H_2S , 4 a 9 horas post-suministro del alimento, pero sin evidencia de PEM (Neville *et al.*, 2010; Felix *et al.*, 2011; Morine *et al.*, 2012). Lamentablemente, algunos de estos estudios no han explicitado el horario o lapso posprandial del muestreo, lo que reduce su utilidad para la comparación de sus resultados.

2. 1. 3. 3. Nivel de inclusión de forraje, nivel de fibra dietética y pH ruminal

Se sabe que las dietas de terminación en EC, que incluyen menos de 15% de forraje, incrementan la producción de H_2S ruminal y el riesgo de PEM por exceso de S (NRC, 2005; Ritcher *et al.*, 2011). Este efecto podría estar mediado por la disminución del pH ruminal, contribuyendo a una mayor toxicidad del S dietético, al aumentar la cantidad de S^{2-} que capta hidrogeniones y permanece como H_2S (Schoomaker y Beitz, 2012). También hay evidencias de que la captación de S por parte de las BRS, puede ser favorecida por las altas concentraciones de hidrogeniones (Cypionka, 1989), de manera que la captación de S y la posterior producción de H_2S , aumentaría con el menor pH ruminal. De acuerdo con lo anterior, Morine *et al.* (2014) observaron una correlación negativa entre el pH y la concentración de H_2S ruminal contemporáneos. Dicha relación se mantuvo hasta que el pH ruminal superó a 5.8, por encima del cual el pH fue un mal predictor de las concentraciones de H_2S . Como era de esperar, estos autores también observaron que las concentraciones ruminales de H_2S disminuyeron linealmente a medida que se aumentó la fibra detergente neutra (FDN) dietética. A pesar de todo lo anterior, no está claro si las variaciones en las concentraciones H_2S ruminal, son completa y directamente explicadas por variaciones del pH ruminal, o si se debe a efectos del nivel de inclusión de granos y/o FDN dietéticos sobre la microbiota ruminal.

En este contexto, el desarrollo de PEM podría deberse a exceso de S dietético, o bien, por un posible déficit de tiamina consecuente a cuadros de acidosis ruminal. La deficiencia de tiamina reportada en rumiantes consumiendo dietas basadas en concentrados, podría deberse al reducido contenido de fibra de la dieta y la reducción del pH ruminal. Ambos factores provocarían el crecimiento de poblaciones bacterianas productoras de tiaminasas, en detrimento de poblaciones bacterianas productoras de tiamina, reduciéndose el aporte neto de dicha vitamina para el animal (Radostits *et al.*, 2006). Por lo anterior, el diagnóstico etiológico de PEM por exceso de S, se basa en la

determinación de altos niveles de S dietético total (Gould, 2000; NRC, 2005; Radostits *et al.*, 2006), elevadas concentraciones medias de H₂S ruminal en animales cohabitantes a los enfermos (Gould, 2000), y la evidencia de un período de alrededor de 15 a 30 días entre el inicio del consumo de la dieta con exceso de S y la aparición de animales enfermos (Radostits *et al.*, 2006). Algunos autores sugieren que en los casos agudos de PEM por exceso de S en rumiantes, además de las lesiones en corteza cerebral, se suelen encontrar lesiones en estructuras encefálicas más ventrales, tales como tálamo y mesencéfalo (Gould, 2000). Este patrón de distribución de lesiones, podría ser más sugestivo de PEM por exceso de S, que por déficit de tiamina (Rosseaux *et al.*, 1991; Jeffrey *et al.*, 1994; Low *et al.*, 1996).

2. 1. 3. 4. Disponibilidad ruminal del azufre dietético

La producción de H₂S en el rumen depende de la disponibilidad de S para su reducción por parte de las BRS. Sarturi *et al.* (2013) propusieron el concepto de S ruminalmente disponible (SRD) cuando se considera el potencial S dietético que puede ser transformado en H₂S ruminal. De esta forma, las fuentes proteicas de S deberían ser menos disponibles para su reducción ruminal, porque al menos una parte de la proteína de la dieta, es ruminalmente no degradable (proteína no degradable – PND), lo cual restringe la interacción entre las BRS y el S presente en los aminoácidos azufrados de dicha fracción proteica. Por el contrario, las fuentes inorgánicas de S, como el SO₄ y el ácido sulfúrico, son completamente disponibles para su reducción ruminal a H₂S (Brasche *et al.*, 2012). En este sentido, parte del S en los GD es aportado por el ácido sulfúrico utilizado durante la elaboración de estos subproductos. De esta forma, Nichols *et al.* (2012) estimaron que en GD húmedos con solubles (GDHS), el SRD fue de 0.56% (69% del 0.81% de S total, referido a MS), y del 1.08 % (96% del 1.12 % del S total, referido a MS) para los solubles de destilería condensados (SDC, fracción soluble obtenida durante la elaboración del bioetanol, que generalmente se reincorpora a los GD).

2. 1. 3. 5. Predisposición individual de cada animal

Consistentemente, se ha observado una gran variabilidad en las concentraciones de H₂S ruminal entre animales consumiendo exceso de S, respecto de animales consumiendo dietas control (Gould *et al.* 1997; Cunha *et al.*, 2008; Ritcher *et al.*, 2011). Si bien éste es un fenómeno bien conocido, sus causas son desconocidas. Considerando que las concentraciones de H₂S tienen correlato con la incidencia de PEM (Loneragan *et al.*, 2005; Drewnosky *et al.*, 2014), esta particularidad podría explicar, al menos parcialmente, la baja morbilidad de PEM por exceso de S dietético (Vaness *et al.*, 2009), que afectaría principalmente aquellos animales con mayor capacidad de generación ruminal de H₂S (Drewnosky *et al.*, 2014).

2. 2. Reducción subclínica de la eficiencia productiva

Si bien la manifestación clínica más severa del exceso de S dietético es la PEM, su morbilidad generalmente es baja, de manera que las mayores pérdidas económicas podrían producirse por sus efectos subclínicos (Drewnosky *et al.*, 2014). El H₂S ruminal se ha propuesto como una de las posibles causas de estos efectos subclínicos, dado que se han observado asociaciones significativas entre las altas concentraciones de H₂S, con la disminución del CMS y el ADP (Uwituze *et al.*, 2011; Ritcher *et al.*, 2011; Drewnosky *et al.*, 2013). En este sentido, se ha hipotetizado que las elevadas concentraciones de H₂S en las vías respiratorias pueden ser irritantes y producir incomodidad al animal, con la consecuente reducción de la ingesta voluntaria de alimento (Ritcher *et al.*, 2011). En concordancia con lo anterior, se han reportado episodios de taquipnea y distrés respiratorio en animales experimentalmente sometidos a exceso de S dietético (Sager *et al.*, 1990; Gould *et al.*, 1997; Cunha *et al.*, 2008). Sin embargo, se desconoce si el exceso de S afecta la incidencia de neumonías en condiciones de campo.

Por otra parte, también se ha propuesto que los efectos subclínicos podrían resultar, al menos parcialmente, de la saturación e interferencia de la función hepática por parte del H₂S y sus derivados, como así también del daño tisular sistémico ocasionado por dichas sustancias (Beauchamp *et al.*, 1984; Loneragan *et al.*, 2001; Troung *et al.*, 2006). En este sentido, se ha comprobado que una vez disueltas en

sangre, altas concentraciones de H₂S son capaces de inhibir múltiples enzimas, tales como la anhidrasa carbónica, dopa-oxidasa, catalasas, peroxidasas y deshidrogenasas, comprometiendo el metabolismo oxidativo y la producción de adenosin trifosfato (Kung *et al.*, 1998; Cunha *et al.*, 2008).

Independientemente de las concentraciones de H₂S, se ha comprobado que el S²⁻ media la formación de compuestos inasimilables con varios minerales en el tracto digestivo, resultando en carencias secundarias de estos últimos, y el consecuente detrimento productivo. En este sentido, uno de los efectos negativos mejor conocidos, es la interferencia con el metabolismo del Cobre (Suttle, 1991), aunque también hay evidencias de antagonismo del Zinc (Pogge *et al.*, 2014), Manganeseo (Pogge *et al.*, 2014), Calcio (Spears *et al.*, 1985), Magnesio (Beachaump *et al.*, 1984; Spears *et al.*, 1985; Ritcher *et al.*, 2011) y Selenio (Ivancic y Weiss, 2001; Spears *et al.*, 2011).

3. Ingredientes dietéticos potencialmente ricos en azufre suministrados en engordes a corral del sudeste de Córdoba y sudoeste de Santa Fe

3. 1 Granos de destilería

Los GD son subproductos que se generan luego de la fermentación controlada del almidón de los granos, para la obtención de bioetanol. En Argentina, el grano más comúnmente usado, es el de maíz (Bagues, 2016). La posibilidad de sustituir parte del combustible fósil por bioetanol representa una interesante oportunidad para disminuir la utilización de recursos no renovables, generar valor agregado en los territorios donde este grano se transforma, y mejorar el resultado económico de las actividades ganaderas que pueden utilizar este producto en la alimentación animal (Latimori *et al.*, 2017).

Durante el proceso industrial se extrae el almidón del maíz, obteniéndose dos subproductos utilizados en la alimentación bovina: los GD propiamente dichos, que son la fracción sólida compuesta por las partes no fermentadas del grano, y la fracción líquida, denominada SDC, compuesta por azúcares, proteínas solubles, levaduras y la

mayor parte del aceite del grano. Estos subproductos se pueden comercializar juntos o separados, así como húmedos o secos. De acuerdo al procesamiento utilizado se pueden obtener diferentes subproductos (adaptado de Arroquy *et al.*, 2014):

- GDH: compuestos por partes de grano no fermentado, con un 60% de MS, aproximadamente.

- GDS (Granos de destilería secos): compuestos por partes de grano no fermentado, sometidos a un proceso de secado, con un contenido medio de aproximadamente 87% de MS.

- SDC: resultantes de la condensación de la fracción líquida de la fermentación; con un contenido de 25 al 45% de MS.

- GDHS o burlanda húmeda: compuestos por GDH y SDC. Poseen alrededor del 35% de MS, lo cual constituye una desventaja dado que dificulta su conservación, encarece los costos de transporte, y puede restringir el CMS. Aun así, es la variante más comúnmente comercializada en Argentina (Bagues, 2016).

- GDS con solubles (GDSS) o burlanda seca: compuesto por GDH y SDC sometidos a un proceso de secado, aumentando su contenido de MS hasta alrededor del 90%. Es la segunda alternativa más comúnmente comercializada en nuestro país, dado que el secado, generalmente incrementa de manera desproporcionada su costo respecto de los GDHS (Bagues, 2016).

Nutricionalmente, la burlanda de maíz posee una concentración de energía metabolizable similar o superior a la del grano que la origina (3 a 3.3 Mcal EM/kg MS) y, a excepción del almidón, una concentración de nutrientes aproximadamente tres veces superior a la del maíz entero. Por consiguiente, su contenido de extracto etéreo (EE) es del 9 al 12 %, el de FDN del 27 al 30%, y el de proteína bruta (PB), del 25 al 33%, cuya fracción ruminalmente no degradable es de alrededor del 50% (Klopfenstein *et al.*, 2008; Kononoff, 2010; Arroquy *et al.*, 2014). En consecuencia, este subproducto se utiliza como fuente proteica o proteico-energética, en niveles de inclusión del 15 al 45% de la dieta (base seca) (Di Lorenzo y Russi, 2012). Debido a que el costo de los GDHS es relativamente inferior al de otros concentrados proteicos, he incluso al del maíz, se ha tendido a incrementar su inclusión hasta el nivel máximo mencionado (Bragachini *et al.*, 2014). Dicho límite máximo sugerido se establece en base al riesgo de deterioro del desempeño productivo, y la predisposición a cuadros de PEM por exceso de S (Loza *et al.*, 2010; Di Lorenzo y Russi, 2012).

El contenido de S en los GD se origina en el alto contenido de aminoácidos azufrados del maíz y de los residuos de ácido sulfúrico utilizado durante su

elaboración y el lavado de las instalaciones (Crawford, 2007). La información nacional al respecto es muy escasa, de manera que solamente se dispone de la descripción del contenido de S en GD elaborados por una sola planta industrial (Tabla 1), abastecedora de la región central de la provincia de Córdoba. Dicho trabajo, reportó un contenido promedio de S ligeramente inferior a los reportados por la bibliografía internacional, pero con una variabilidad muy superior entre lotes del subproducto (Tabla 1). En este contexto, si bien el aumento de las tasas de inclusión de los GD disminuye los costos de las dietas de EC, también puede aumentar el riesgo de toxicidad por S, debido a la variación de las concentraciones de S en estos subproductos (Drewnosky *et al.*, 2014).

Tabla 1. Contenido de azufre (% MS) en granos de destilería producidos por diferentes plantas industriales de Argentina y Estados Unidos de América (USA)

Autores	País	Promedio	DE	CV (%)	Mín.	Máx.
Brunetti <i>et al.</i> , 2015	Argentina	0.65	0.25	38.5	0.37	1.13
Buckner <i>et al.</i> , 2011	USA	0.71	----	7.13	----	----
Buckner <i>et al.</i> , 2011	USA	0.74	----	3.98	----	----
Buckner <i>et al.</i> , 2011	USA	0.76	----	5.18	----	----
Buckner <i>et al.</i> , 2011	USA	0.82	----	4.51	----	----
Buckner <i>et al.</i> , 2011	USA	0.76	----	3.99	----	----
Buckner <i>et al.</i> , 2011	USA	0.84	----	3.91	----	----
Buckner <i>et al.</i> , 2008	USA	0.74	----	24.55	0.44	1.72
Buckner <i>et al.</i> , 2008	USA	0.73	----	6.6	0.58	0.84
Buckner <i>et al.</i> , 2008	USA	0.76	----	6	0.6	0.93
Buckner <i>et al.</i> , 2008	USA	0.88	----	8.2	0.61	1.26
Buckner <i>et al.</i> , 2008	USA	0.79	----	4.6	0.69	0.93
Buckner <i>et al.</i> , 2008	USA	0.86	----	5.25	0.73	1.04
Batal <i>et al.</i> , 2003	USA	0.84	0.21	25	0.45	1.1

DE: desvío estándar de la media.

CV: coeficiente de variación.

En un estudio norteamericano, se observó que incrementando el % de S dietético mediante la inclusión de niveles crecientes de GD, la incidencia de casos clínicos de PEM fue del 0.14, 0.35 y 6.06%, para niveles de S total menores a 0.47, de 0.47 a 0.56 y mayores a 0.56%, respectivamente. Dichas concentraciones de S se obtuvieron mediante la inclusión de niveles crecientes de GD a dietas de estándar de EC, con al menos 6 a 7.5% de forraje, agua de bebida con mínimos aportes de SO₄, y con la suplementación de 75 a 150 mg/animal de tiamina en el alimento. Estos autores concluyeron que a fin de minimizar la incidencia de PEM con este tipo de dietas, se podría incluir hasta el 50% de GD, correspondientes a niveles de S dietético total de

hasta 0.46% (Vaness *et al.*, 2009). En concordancia, Nichols *et al.* (2012) propusieron que se podrían suministrar dietas de terminación a corral hasta con 0.46% de S total, provenientes de la inclusión de hasta 47% de GD y suministrando agua de bebida con escaso aporte de SO_4 , sin incrementos en la incidencia de PEM.

Esta reducida incidencia de PEM observada con elevadas concentraciones de S provenientes principalmente de GD, podría deberse a que una parte del S presente en los mismos, es aportado por PND y por lo que no es ruminalmente disponible para la producción de H_2S , el potencial mediador de los perjuicios (Nichols *et al.*, 2012; Drewnosky *et al.*, 2014). Por otra parte, estos subproductos conservan grandes cantidades de somas de levaduras, agregadas durante su elaboración para la fermentación del almidón del grano (Shurson, 2018). Por lo anterior, se ha mencionado que los GD contienen importantes cantidades de vitaminas hidrosolubles del complejo B (Bagues, 2016), entre las cuales podría encontrarse la tiamina. Considerando que la suplementación de dicha vitamina atenúa el riesgo de ocurrencia de cuadros clínicos de PEM, es posible que esta cualidad de los GD, contribuya a reducir la incidencia de dicha patología, a pesar del exceso de S que ellos aportan.

Con respecto al desempeño productivo, se ha mencionado que el alto contenido de S en los GD, podría ser uno de los posibles contribuyentes a la reducción del CMS y ADP, cuando se los incluye en niveles superiores al 30 a 40 % de la dieta (Klopfenstein *et al.*, 2008).

3. 2. Agua de bebida

En términos generales, los parámetros de calidad de agua de bebida más importantes para los bovinos, son sales totales (ST) y SO_4 (Sager, 2000). En el caso de bovinos en EC, los límites máximos sugeridos de ST y SO_4 , son de 2000 y 500 mg/l, respectivamente (Sager, 2008). Lamentablemente, no se dispone de información acerca del límite máximo recomendable de SO_4 en el agua de bebida, para bovinos consumiendo GD.

La extremada exigencia del EC en cuanto a calidad de agua, se debe principalmente a que el volumen de agua de bebida requerido por kg de MS consumida, se incrementa paralelamente al aumento del porcentaje de MS de la dieta (Sager, 2000, Giménez, 2011, Aello y Di Marco, 2013). Fundamentos adicionales de

esta mayor exigencia, son el predominio de categorías de animales jóvenes, con mayor requerimiento de agua respecto de los adultos, y más sensibles a los efectos perjudiciales de la restricción o deficiente calidad hídrica (Loneragan *et al.*, 2001; Giménez, 2011). También vale aclarar que la mayoría de los bovinos que ingresan a EC, provienen de sitios geográficamente remotos, por lo que si la calidad del agua es inferior a la de su lugar de origen, implica un período de acostumbramiento a la misma, incrementándose el riesgo de diversos grados de deshidratación durante la etapa más crítica del encierre, con el consecuente incremento del riesgo de patologías (López A., 2012) y/o detrimento del desempeño productivo inicial.

La superación de los mencionados valores de referencia, para los parámetros hídricos en cuestión, puede implicar perjuicios productivos proporcionales a la magnitud de su exceso, tales como reducción del CMS (Sager, 2008), disminución del ADP y aumento de la CA (NRC, 2005). Además, puede incrementarse la morbimortalidad por diversas causas, tales como PEM, trastornos digestivos (Radostitis *et al.*, 2006), carencias minerales secundarias (Gooneratne *et al.*, 1989; Sager, 2000; Sager, 2006) y/o intoxicaciones hídricas inespecíficas (Cantón *et al.*, 2006).

La fuente de agua de bebida de los sistemas de EC, es generalmente subterránea, siendo el acuífero libre el más comúnmente utilizado (Blarasin, Cabrera, Matteoda, Aguirre, Frontera *et al.*, 2014). El quimismo del agua subterránea resulta de las características regionales atmosféricas, geológicas, climáticas, bióticas (naturales como artificiales) y complejas interacciones entre ellas, cuyo accionar se resume en tres consecutivos ámbitos: el atmosférico, el no saturado y el saturado. El primero define la composición del agua precipitada, principal fuente de los acuíferos. El ámbito o zona no saturada, incluye los procesos que sufre el agua desde su contacto con el suelo hasta su infiltración hacia el nivel freático, resaltando entre ellos, al proceso de evapotranspiración, por el cual los solutos siempre estarán más concentrados respecto del agua precipitada. Finalmente, el ámbito saturado se produce por intercambios entre el agua y el material que delimita u hospeda al propio acuífero (Iriondo, 2012).

De todo lo anterior, surgen las variaciones temporo-espaciales observadas en la calidad del agua. Es bien conocido que en los últimos años, con la intensificación de las actividades antrópicas y variaciones climáticas, se han producido cambios en los mencionados factores determinantes de la composición hídrica subterránea (Iriondo, 2012). Estos cambios podrían tener distintos impactos sobre la concentración de solutos en el agua, y por ende, en su calidad.

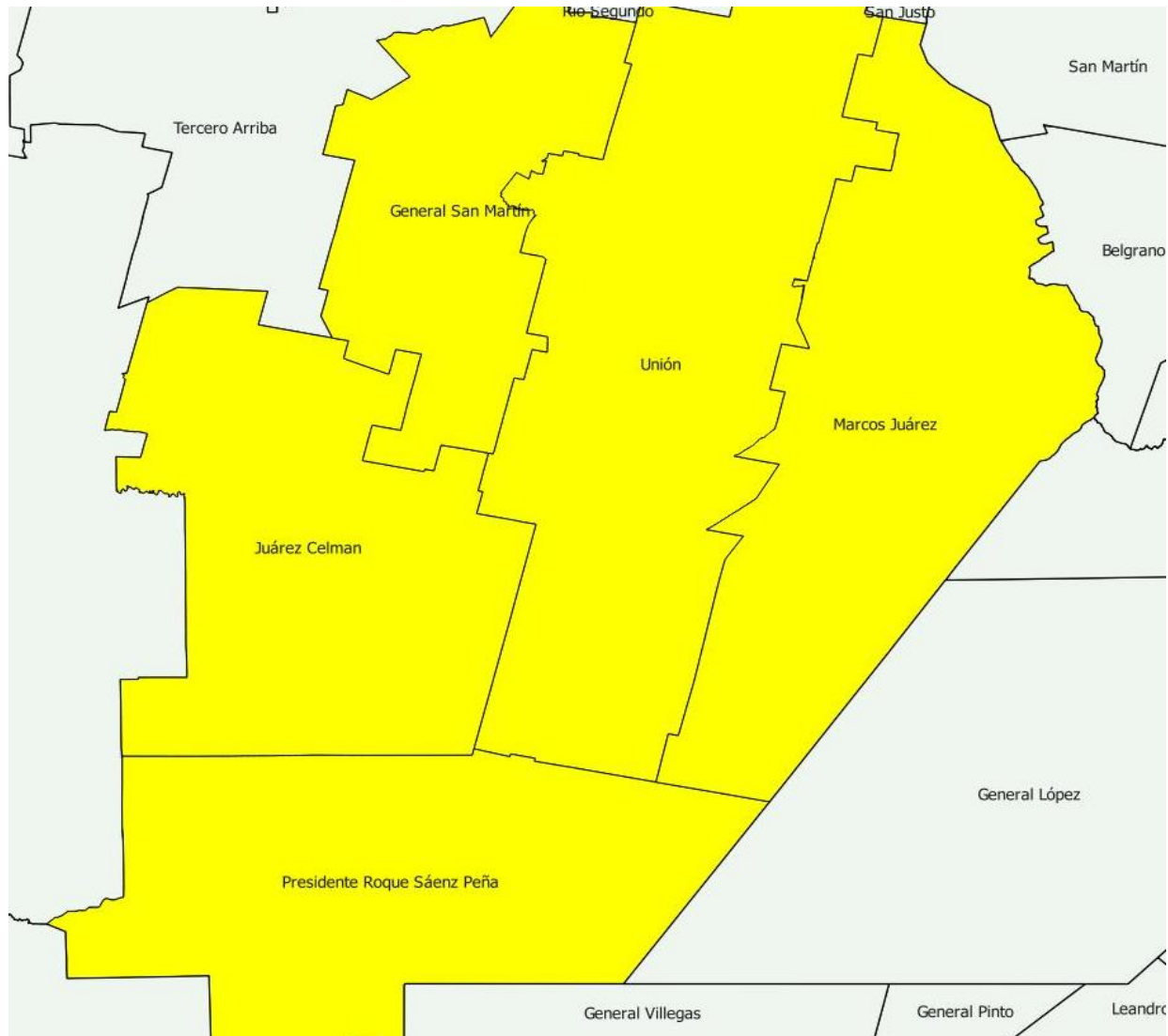
3. 2. 1. Antecedentes regionales sobre la calidad del agua subterránea

En la región a estudiar, la información sobre la calidad del agua de origen subterráneo para consumo bovino, es escasa y/o desactualizada, e invariablemente imprecisa, al no provenir puntualmente de los establecimientos ganaderos, sino de perforaciones exploratorias o abastecedoras de centros urbanos (Iriondo, 2012).

3. 2. 1. 1. Sudeste de la provincia de Córdoba

En esta área se incluyen los departamentos Presidente Roque Sáenz Peña, Marcos Juárez, General San Martín, Juárez Celman y Unión (Figura 2). Esta región pertenece a la llanura pampeana, pero el acuífero de la misma se alimenta principalmente de la región serrana central de la provincia de Córdoba. Las sierras actúan como focos captadores, e infiltradores de agua de lluvia hacia los depósitos subterráneos. Por efecto de la pendiente, el agua del acuífero desciende hacia las regiones peri-serranas y llanuras. A medida que el agua avanza en este sentido, su quimismo se modifica en función de la composición del material que hospeda al acuífero. En términos generales, la concentración de solutos se incrementa con la magnitud de la trayectoria entre las sierras, y la región que se estudie. Por lo tanto, en el caso puntual del sudeste de la provincia de Córdoba, la concentración de solutos en el agua subterránea se incrementa, desde la región serrana central, en sentido noroeste-sudeste (Blarasin, Cabrera, Matteoda, Aguirre, Frontera *et al.*; 2014).

Figura 2. Departamentos del sudeste de la provincia de Córdoba

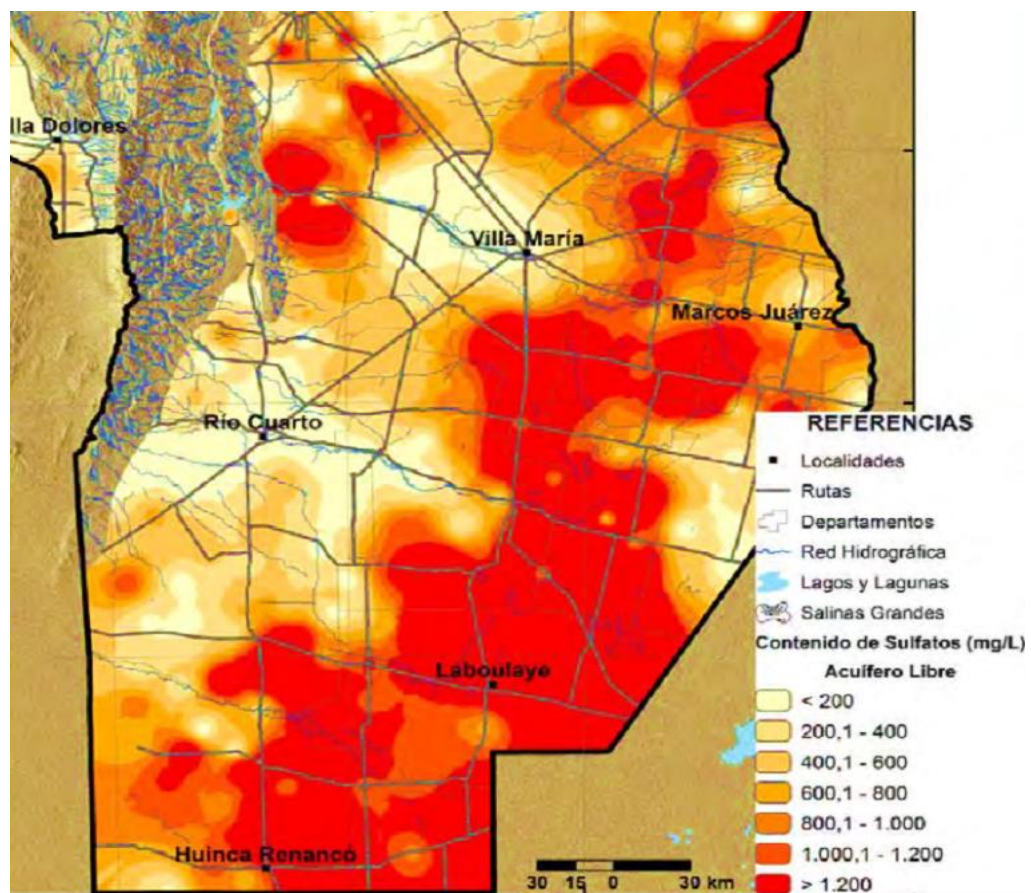


Otra importante fuente de agua para los acuíferos de la llanura, es la precipitada directamente sobre ella, infiltrándose a través de los perfiles del suelo. En el caso del sudeste de Córdoba, esta fuente puede llegar a representar hasta el 20% de la recarga anual del acuífero (Cabrera, 2009; Blarasin, Cabrera, Matteoda, Aguirre, Frontera *et al.*; 2014).

En un meta-análisis hidrogeológico, se describió que gran parte de la región cordobesa en estudio, presenta elevadas concentraciones de SO_4 en el agua del acuífero libre (Figura 3, Blarasin, Cabrera, Matteoda, Aguirre, Giuliano Albo *et al.*, 2014). En concordancia con lo anterior, Bitesnik (1968) catalogó el agua subterránea

del departamento Marcos Juárez y regiones aledañas del sudeste de Córdoba y sudoeste de Santa Fe, como hipersulfatada, con un rango de 39 a 2564 mg/l de SO_4 , con un promedio de 400 a 700 mg/l. Adicionalmente, Fresina (2001) organizó y analizó datos recabados por el Instituto Nacional de Geología y Minería, en 1968 y 1969, sobre la hidroquímica subterránea de la cuenca del río Carcarañá. Dicha autora, también caracterizó como hipersulfatada al agua subterránea del norte del departamento Marcos Juárez, con un promedio de 1184 mg/l, una mediana de 400, un mínimo de 91 y un máximo de 7250 mg/l de SO_4 .

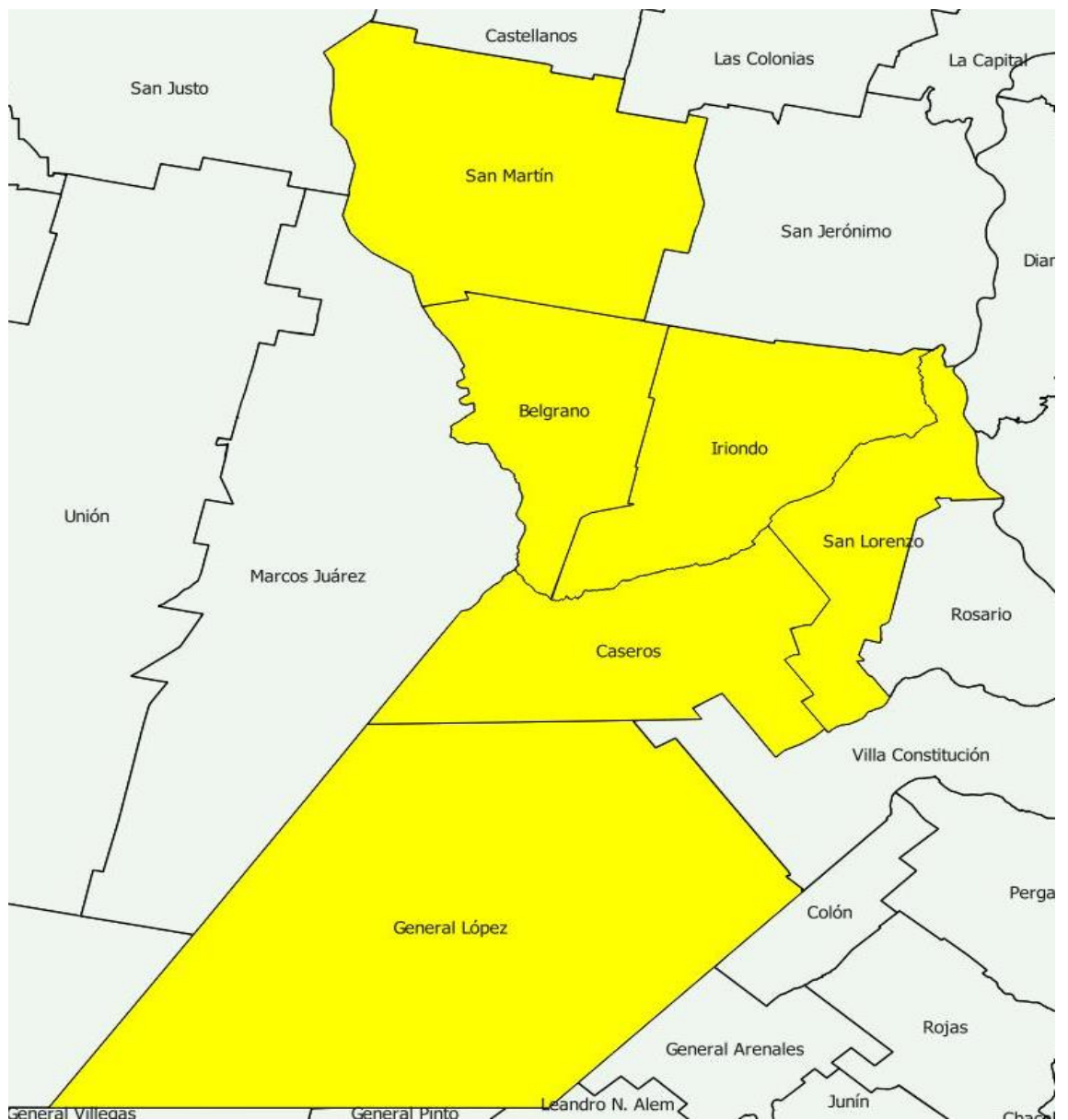
Figura 3. Distribución de sulfatos en el agua del acuífero libre del sur de la provincia de Córdoba (reproducido de Blarasin, Cabrera, Matteoda, Aguirre, Giuliano Albo et al., 2014)



3. 2. 1. 2. Sudoeste de la provincia de Santa Fe

En esta área se incluyen los departamentos Belgrano, Iriondo, Caseros, San Lorenzo y General López (Figura 4).

Figura 4. Departamentos del sudoeste de la provincia de Santa Fe



La información respecto de las características químicas del agua subterránea es relativamente escasa en esta región (Iriondo, 2012), especialmente sobre el contenido de SO_4 . La mayor parte de la misma no proviene de perforaciones de estudio, sino de fuentes indirectas, principalmente de los datos parciales que surgen de las perforaciones realizadas para provisión de agua potable a pueblos y ciudades de la provincia (Iriondo, 2012). Los estudios más detallados fueron realizados por Bitesnik en 1968 sobre la región occidental de los departamentos Caseros, Belgrano y San Martín, donde el agua subterránea se caracterizó como hipersulfatada. Como se mencionó en el anterior apartado, Fresina (2001) analizó datos de la composición química del agua subterránea de la cuenca del río Carcarañá, originados en los años 1968 y 1969. Dicha autora caracterizó como sulfatada al agua subterránea de la gran parte de dicha cuenca, con una mediana de 168 mg/l de SO_4 , un promedio de 398, un máximo de 7250, y un mínimo de 4 mg/l de SO_4 para la cuenca completa (Tabla 2 muestra valores descriptivos por subregiones).

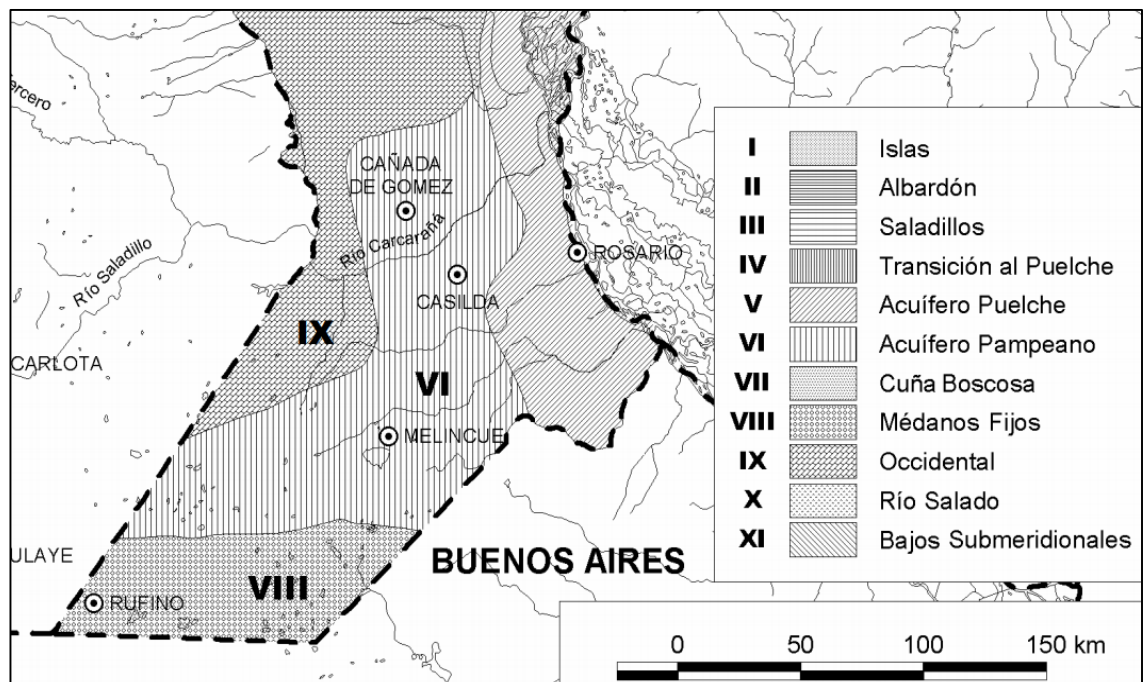
Tabla 2. Estadísticas descriptivas de las concentraciones de sulfatos (mg/l), reportadas en agua subterránea del sur de la provincia de Santa Fe

Región	Autor/es	Año	Promedio	Mediana	Mín.	Máx.
Occidente dptos. Caseros, Belgrano y San Martín	Bitesnik	1968	400 a 700	-----	39	2564
Occidente de dpto. Belgrano	Fresina	1969	726	274	57	4477
Cañada de Gómez (Dpto. Iriondo)	Pérez <i>et al.</i>	2000	443	420	67	1170
Occidente de deptos. Caseros y Gral. López	Fresina	1969	635	520	9	2330
Dptos Caseros, Iriondo, San Lorenzo, Constitución y Rosario	Fresina	1969	193	125	4	2799

Descripciones más generales, pero también más recientes, enuncian que esta región santafesina puede subdividirse hidrogeológicamente en tres subzonas: occidental, médanos fijos y acuífero pampeano (Figura 5). La descripción de la primera concuerda con las anteriores, catalogando las aguas subterráneas como limitantes, de mala calidad y/o de escaso caudal. La segunda corresponde al sur del departamento General López, caracterizada por suelos arenosos y permeables que permiten la

formación de lentes de agua dulce de escaso volumen, rodeados y subyacidos por aguas salobres a saladas, de manera que su frágil equilibrio hace necesario programar una explotación coordinada con la recarga, para evitar la salinización del agua dulce. La tercera zona, solamente se la ha descrito en términos generales respecto del contenido hídrico de ST, como aguas de buena calidad, de salinidad creciente en sentido este-oeste, en rangos de 700 a 2.500 mg/l del mencionado parámetro (Auge, 2004).

Figura 4. Subregiones hidrogeológicas del sur de la provincia de Santa Fe (reproducido de Auge 2004)



4. Contexto y marco teórico general de la tesis. Hipótesis y objetivos

En la región sudeste de Córdoba y sudoeste de Santa Fe, la información acerca del contenido de SO_4 en el agua de bebida, y de S en GD para consumo de bovinos, es escasa, desactualizada e/o imprecisa. También es escasa la información acerca de la respuesta animal, a los posibles niveles de S resultantes de la inclusión de dichos ingredientes, en las dietas de EC en Argentina. Adicionalmente, en la región sudeste de Córdoba y sudoeste de Santa Fe, se han comunicado problemáticas productivo-sanitarias en bovinos de EC, compatibles con las causadas por exceso de S dietético. Tales problemas, incluyeron brotes de PEM y evidencias de deficiente desempeño productivo, efectivamente asociados al consumo de GD y/o agua de bebida con altas concentraciones de SO_4 (Margineda, C., com. pers., 2016; Descarga, C., com. pers., 2018; Castro *et al.*, 2018). También se han manifestado brotes de enfermedades neurológicas compatibles con PEM, asociados al consumo de GD, pero carentes de diagnóstico definitivo (Morlacco, B., com. pers., 2016). Por otra parte, en algunos establecimientos de EC, se decidió no incluir GD en la dieta, debido al exceso de SO_4 en el agua de bebida, y en otros casos se requirió cambiar las perforaciones de suministro de agua, debido al inconveniente antes mencionado (Margineda, com., pers. 2016). Ante estas situaciones, el nivel de S dietético total es una herramienta diagnóstica importante, debido a su positiva asociación dosis-respuesta con la incidencia de PEM (Gould, 2000), como también a que los requerimientos y límites máximos de S sugeridos para bovinos, están enunciados en este término (NRC 2005).

En este contexto, se desarrolló un estudio descriptivo, con el objetivo de caracterizar preliminarmente el contenido de S en GD, la concentración de SO_4 en el agua de bebida, y del nivel estimado de S dietético total, suministrados a bovinos de EC en el sudeste de la provincia de Córdoba y sudoeste de la provincia de Santa Fe (Argentina).

Complementariamente se desarrolló un estudio experimental bajo las hipótesis de que un exceso de S dietético similar al que podría resultar de la inclusión de GD y agua de bebida con aportes de S promedio para la mencionada región del país, incrementa el riesgo de PEM y limita el desempeño productivo en bovinos de EC.

En este sentido, el objetivo general del ensayo fue evaluar preliminarmente parámetros clínicos, productivos y ruminales, en bovinos de EC sometidos a un exceso de S dietético, similar al resultante de la inclusión de GD y agua de bebida con

aportes de S promedio, según los antecedentes de la región geográfica estudiada. En consecuencia, los objetivos específicos fueron:

Cuantificar la concentración de H₂S ruminal, y evaluar parámetros clínicos (neurológicos y respiratorios), en bovinos de EC sometidos a dicho exceso de S dietético.

Evaluar el desempeño productivo de bovinos en EC, sometidos al mencionado exceso de S dietético.

Evaluar el ambiente ruminal, cuantificar la concentración de BRSD, y evaluar la asociación de la concentración de dichas bacterias con las de H₂S ruminal, en bovinos de EC bajo exceso de S dietético.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. ESTUDIO DESCRIPTIVO

1. 1. Agua de bebida

En el verano y el invierno del año 2017, se recolectaron muestras de agua de bebida de un bebedero abastecido por cada una de las 68 perforaciones utilizadas por 50 establecimientos de EC de bovinos, ubicados en el sudeste de la provincia de Córdoba (departamentos Presidente Roque Sáenz Peña, Marcos Juárez, General San Martín, Juárez Celman y Unión) y el sudoeste de la provincia de Santa Fe (departamentos Belgrano, Iriondo, Caseros, San Lorenzo y General López). Las muestras se recolectaron en recipientes de plástico, previamente enjuagados con la misma agua a muestrear, y se conservaron congeladas a -20°C hasta su procesamiento. Se realizaron las determinaciones de ST por gravimetría y de SO_4 mediante turbidimetría (Fernández y Brambilla 2017).

Dado que la concentración máxima sugerida de SO_4 en el agua de bebida para bovinos en EC, es de 500 (Radostitis *et al.*, 2006; Sager, 2008) a 600 mg/l (NRC, 2005), en el presente trabajo las perforaciones muestreadas se clasificaron como de contenido bajo, medio o alto de SO_4 , según sus correspondientes muestras de agua presentaran concentraciones <250 , entre 250 y 500, o >500 mg/l, respectivamente.

1. 2. Azufre total en granos de destilería

Se recolectaron muestras de GDHS producidos por las dos principales plantas industriales abastecedoras de la región en estudio. El muestreo se realizó sobre lotes de dicho subproducto, arribados a un establecimiento de EC de bovinos, ubicado en el sudeste de la provincia de Santa Fe (departamento Iriondo) durante los meses de agosto, septiembre y noviembre del año 2017, y desde enero a junio del año 2018. Las muestras se llevaron a estufa a 100°C durante 24 hs, para la obtención de la MS,

sobre la cual se determinó el porcentaje de S total mediante el método Dumas (LECO®).

1. 3. Nivel de azufre dietético total

Contemporáneamente a la visita de cada establecimiento para el muestreo de agua, se consultó al personal actuante si se suministraban o no GD. De esta forma, la estimación del nivel de S dietético total se realizó sumando el % aportado por el alimento sólido y el aportado por el agua de bebida. La estimación del primero se realizó considerando el aporte de S de dietas estándar de EC con o sin GD, y un contenido de S en GD equivalente al promedio a determinarse en el presente estudio descriptivo (Tabla 3).

Tabla 3. Composición (base seca) de las dietas estándar de engorde a corral, utilizadas para estimar el % de azufre (S) aportado por el alimento sólido

Ingrediente	S (%MS)	Dieta sin GD	Dieta con GD
Heno alfalfa	¹ 0.26	10%	10%
Maíz	¹ 0.11	72%	57%
Harina de soja	¹ 0.42	15%	-----
GD	² X	-----	³ 30%
Núcleo	¹ 1	3%	3%
Cálculo		$10\% \times 0.26\% = 0.026\%$ $72\% \times 0.1\% = 0.072\%$ $15\% \times 0.42\% = 0.063\%$ $3\% \times 1\% = 0.03\%$	$10\% \times 0.26\% = 0.026\%$ $57\% \times 0.1\% = 0.057\%$ $30\% \times X\% = X\%$ $3\% \times 1\% = 0.03\%$
% S alimento sólido		0.20	X

¹ promedios reportados por la bibliografía (NRC, 2001; Aello y Dimarco, 2013)

² % promedio de S en GD a determinarse en el presente estudio descriptivo

³ nivel de inclusión promedio de GD

GD: granos de destilería

El % de S aportado por el agua de bebida se estimó para cada una de las perforaciones muestreadas, considerando la concentración de SO_4 observada en su correspondiente muestra de agua, y el consumo estimado diario de agua de bebida (CEDA) por parte de los animales, mediante el siguiente cálculo:

$$\% S \text{ en agua} = \frac{CEDA \times [SO_4]^* \times 0.33^\#}{10}$$

Donde:

CEDA : litros / kg diario de MS consumida

*Concentración de SO_4 expresada en g/l

SO_4 aporta 33% de S

El CEDA se estimó en 4.04 y 3.31 litros/kg diario de MS consumida, en verano e invierno respectivamente. Estas estimaciones se obtuvieron mediante la siguiente formula (adaptada de NRC, 2000):

$$CEDA (l/kgMS) = \frac{-18.67 + (0.39 \times Tmax) + (2.43 \times CMS) - (3.87 \times P) - (4.44 \times NaCl)}{CMS}$$

Donde:

Tmax: temperatura máxima diaria (F°). Se asumieron los valores de 86.9 F° (30.5 C°) y 70.3 F° (21.3 C°) para la estimación estival e invernal respectivamente. Dichos valores corresponden a los promedios de las temperaturas máximas diarias para los meses de febrero y setiembre (Estación meteorológica INTA Marcos Juárez).

CMS: consumo diario de materia seca (Kg). Se asumió un CMS diario de 9 kg.

P: precipitaciones (ml/día). Se asumió un valor de 0, dado que no se registraron lluvias en las semanas de muestreo.

NaCl: cloruro de sodio dietético (%MS). Se consideró un aporte constante de 0.25% (base seca).

2. ESTUDIO EXPERIMENTAL

2. 1. Material experimental y tratamientos aplicados

El ensayo se llevó a cabo durante los meses de junio y julio del año 2017, en la Reserva Ganadera N° 7 de la EEA INTA Balcarce (37°47'37"S 58°16'28"O), provincia de Buenos Aires. Los procedimientos realizados fueron evaluados y avalados por el Comité Institucional para el cuidado y uso de animales de experimentación (CICUAE) del Centro Regional Buenos Aires Sur de INTA (protocolo 098/2016).

Se utilizaron 12 terneros machos castrados cruza Aberdeen Angus x Hereford, con peso inicial promedio de 268 ± 13 kg, a cada uno de los cuales se les asignó aleatoriamente uno de los dos tratamientos propuestos, resultando en 6 repeticiones para cada uno. Dichos tratamientos consistieron en dos niveles de S dietético total: bajo S (BS) con 0.19% S (dieta control, nivel de S similar al requerido por la especie bovina según NRC 2005) y alto S (AS) con 0.39%.

Los niveles de S dietético total evaluados, resultan de la comparación de dos dietas estándar de EC, diferentes en su composición, pero iso-energéticas e iso-proteicas. El nivel de S de la dieta AS, se definió en base a la diferencia estimada de aproximadamente el 0.2 % de S, entre una dieta sin GD, y con un consumo de 4 litros de agua de bebida de buena calidad (40 mg SO_4/l) por kg de MS consumida (Aello y Di Marco, 2013), respecto de otra dieta con 30 % de GD (con un aporte promedio de S según el único reporte nacional, realizado por Brunetti *et al.*, 2015), y consumiendo agua de bebida con 500 mg/l de SO_4 , valor máximo sugerido para bovinos de EC (Sager, 2000) y cercano a los valores medios reportados en la región sudeste de Córdoba y sudoeste de Santa Fe (Bitesnik, 1976; Fresina, 2001). Los valores de los restantes ingredientes hipotéticos se fijaron en base a promedios reportados en la bibliografía (NRC, 2001; Aello y Di Marco, 2013).

Con respecto a las dietas experimentales, se determinó el porcentaje de S total (% de MS) en cada uno de sus ingredientes, y la concentración de SO_4 en el agua de bebida. En consecuencia, el nivel de S definitivo de la dieta BS resultó del aporte de S de cada uno de sus ingredientes, y de sus participaciones porcentuales en base a MS. La dieta AS fue aproximadamente la misma que la BS, excepto por la inclusión de 0.86% de SO_4Na_2 (sulfato de sodio - Biopack ®, Argentina), equivalente al 0.2% de S de la diferencia antes mencionada. Las dietas fueron iso-energéticas e iso-proteicas.

Los cálculos y detalles de las dietas hipotéticas y experimentales se especifican en las siguientes tablas (Tablas 4 a 7).

Tabla 4. Dietas estándar de engorde a corral, utilizados para seleccionar los niveles de azufre (S) de las dietas BS (bajo azufre) y AS (alto azufre) aplicadas en el estudio experimental

Ingrediente	S (%MS o g/l)	Mcal EM/kg MS	%PB	Dieta sin GD	Dieta con GD y agua problema
Heno alfalfa	¹ 0.26	2.2	15	10%	10%
Maíz	¹ 0.10	3.2	9	72%	57%
Harina de soja	¹ 0.42	3.2	47	15%	-----
GD	² 0.65	3.2	28	-----	30%
Núcleo	¹ 1	----	----	3%	3%
Agua de bebida	³ 0.013 g/l (40 mg/l de SO ₄)			(⁴ 4 L × 0.013) / 10 = 0.0053%	-----
	³ 0.165 g/l (500 mg/l de SO ₄)			-----	(⁴ 4 L × 0.165) / 10 = 0.066%
% S Total				0.19	0.38
Mcal EM/kg MS				3	3
%PB				15	15

¹ Promedios reportados por la bibliografía (NRC, 2000; Aello y Di Marco, 2013)

² Concentración promedio de S en GD según el único reporte nacional³ El SO₄⁻ en el agua se encuentra en forma ionizada, por lo cual, se considera que aporta 33% de S (Gould, 2000).

⁴ Se asume un consumo de 4 litros de agua de bebida por kg de MS consumida (Aello y Di Marco, 2013).

Mcal EM: megacalorías de energía metabolizable

PB: proteína bruta

Tabla 5. Análisis nutricional de los ingredientes de las dietas experimentales

Parámetro nutricional	Metodología	Maíz	Expeller girasol	Silaje de maíz	Núcleo	Agua de bebida
%MS	En estufa a 65°C hasta peso constante	90	89	32.5	----	----
%DMS	Van Soest, 1994	86.3	66.7	76	----	----
Mcal EM/kg MS	DMS x 3.6	3.1	2.4	2.74	----	----
%PB	Horneck y Miller, 1998	8.7	34.7	7.3	----	----
%FDN	Komareck <i>et al.</i> , 1993	13.3	32.3	34.2	----	----
%FDA	Komareck <i>et al.</i> , 1993	3.5	23	19.2	----	----
%S	Dumas (LECO®)	0.11	0.4	0.11	0.96	----
SO ₄ (mg/l)	Turbidimetría	----	----	----	----	40

MS: materia seca

DMS: digestibilidad de la materia seca

Mcal EM: megacalorías de energía metabolizable

PB: proteína bruta

FDN: fibra detergente neutra

FDA: fibra insoluble en detergente ácido

S: azufre

Tabla 6. Composición de las dietas experimentales BS (bajo azufre) y AS (alto azufre) (% de MS)

	BS	AS
% Maíz quebrado	67	66.5
% Expeller de girasol	20	19.64
% Silaje de maíz	10	10
%Urea	0.5	0.5
%Núcleo	2.5	2.5
Agua (40mg/l de SO₄)	* 32 L	* 32 L
%SO₄Na₂	-----	0.86
Mcal EM/kg MS	2.83	2.81
%PB	14.90	14.76
%S	0.19	0.39
%FDN	23.40	23.30

SO₄Na₂: sulfato de sodio

Mcal EM: megacalorías de energía metabolizable

PB: proteína bruta

S: azufre

FDN: fibra detergente neutra

* Consumos diarios hipotéticos

Tabla 7. Composición del núcleo vitamínico-mineral utilizado en las dietas experimentales

Calcio (%)	15.7
Fosforo (%)	0.6
Magnesio (%)	1.8
Azufre (%)	1
Cloruro sódico (%)	9.8
Selenio (mg/kg)	7
Zinc (mg/kg)	1254
Manganeso (mg/kg)	1254
Cobre (mg/kg)	352
Cobalto (mg/kg)	3.6
Iodo (mg/kg)	12
Hierro (mg/kg)	800
Vitamina A (UI/kg)	104950
Vitamina D (UI/kg)	3600
Vitamina E (UI/kg)	130
Monensina (mg/kg)	1000

2. 2. Manejo y alimentación de los animales. Estimación de los parámetros productivos

De manera previa al inicio del período experimental, los animales fueron sometidos a un período de 60 días de amansamiento. Seguidamente, fueron dispuestos de forma individual en corrales con piso de tierra de 15 m × 8 m, y fueron adaptados a la dieta basada en concentrados durante un período de 20 días (Tabla 8), al cabo de los cuales se inició el suministro de las dietas experimentales.

Tabla 8. Cronograma de adaptación a las instalaciones y a la dieta basada en concentrados

Período	Días del estudio		Composición porcentual de la dieta (% MS)					
	Inicio	Final	Maíz	Exp. Girasol	Silaje	Núcleo	Urea	SO ₄ Na ₂
Adaptación a instalaciones	-40	-21	-----	30	67	3	-----	-----
Adaptación a la dieta basada en concentrados	-20	-16	20	28.5	48.5	3	-----	-----
	-15	-11	35	27	35	3	-----	-----
	-10	-6	50	25	21.8	3	0.25	-----
	-5	0	67	20	10	2.5	0.5	-----
Período experimental	1	38	66.5	19.6	10	2.5	0.5	¹ 0.86

¹ Solamente en la dieta AS

Durante el período experimental, los animales continuaron dispuestos individualmente recibiendo agua y alimento *ad libitum*, con una entrega tal que resultara en aproximadamente el 10% de rechazo diario. El suministro de alimento se realizó una vez al día, a las 8:00 am, determinándose diariamente la oferta y rechazo del mismo, como así también el porcentaje de MS de los rechazos, y semanalmente de cada ingrediente dietético. El CMS diario se obtuvo mediante la diferencia entre la MS ofrecida y la rechazada. Los animales se pesaron los días 1 y 39, con un desbaste de 17 hs, de manera que se obtuvo el ADP dividiendo la diferencia de PV final e inicial, por los días de duración del período experimental. La CA se obtuvo dividiendo el CMS diario promedio de cada animal, por su respectivo ADP promedio.

Los días -1, 18 y 36 del estudio, se recolectaron muestras de los rechazos de alimento de cada animal, para determinar el % de MS y de S total (LECO®) de los mismos, a fin de verificar el consumo de S mediante la diferencia entre la cantidad de S total ofrecida y la rechazada.

2. 3. Parámetros clínicos

Bisemanalmente, 6 horas post-suministro del alimento, cada animal fue revisado clínicamente. La sujeción de los animales para tal procedimiento, se realizó mecánicamente, mediante bozales y arneses de soga. Se evaluó la función visual mediante el reflejo de amenaza sobre cada ojo, el comportamiento, la postura y el sensorio mediante inspección, y se determinó la frecuencia respiratoria (FR) mediante el conteo de los movimientos respiratorios durante un minuto.

2. 4. Parámetros ruminales

2. 4. 1. Cuantificación de H₂S ruminal

Los días 0, 22 y 38, a las 6 horas post-suministro del alimento, se realizó el muestreo de gas ruminal de cada animal, a fin de cuantificar la concentración de H₂S. Para tal procedimiento, los animales fueron sujetados mecánicamente mediante un cepo. Se aplicó la técnica de punción ruminal paralumbar (Gould, 1997), que a continuación se describe brevemente. Se realizó tricotomía de un área de aproximadamente 10 cm x 10 cm de la fosa paralumbar izquierda, y seguidamente la desinfección con Iodopovidona. Para la obtención de gas ruminal, se utilizó una aguja 18G de 5 cm de largo, acoplada a un sistema de fluidoterapia endovenosa adaptado. La aguja se introdujo a través de la pared del flanco, hasta llegar a la región dorsal del saco ruminal dorsal. Mediante una jeringa, se realizó el purgado del sistema tubular, extrayéndose el volumen de aire presente en el mismo, y seguidamente se acopló un tubo colorimétrico comercial para la cuantificación de H₂S gaseoso (Kitagawa®, Japón), utilizándose el modelo 120SF para concentraciones de hasta 1000 ppm, y en caso de superarse este valor, la medición se repitió utilizando tubos modelo 120SH. La extracción de gas ruminal y su introducción a través del tubo colorimétrico, se realizó mediante una bomba volumétrica de muestreo (Sensidyne® modelo AP-20S, USA) según las instrucciones de sus fabricantes.

2. 4. 2. Evaluación del ambiente ruminal

Los mismos días y simultáneamente al muestreo de gas ruminal, se obtuvo líquido ruminal de cada animal, mediante sondaje oro-esofágico asistido por una bomba de vacío eléctrica. Inmediatamente a la extracción del líquido, se lo filtró a través de dos capas de gasa y se realizó la medición del pH con un pH-metro portátil (Cole Parmer Instrument Company, Digi-sense ®, modelo 5985-80, USA). El filtrado resultante se fraccionó, acondicionó y conservó según los requerimientos de las determinaciones que a continuación se describen.

2. 4. 2. 1. Cuantificación de la concentración de nitrógeno amoniacal ruminal

Para cuantificar la concentración de amoníaco (NH_3) del líquido ruminal, se utilizó el sobrenadante obtenido del centrifugado de la mezcla de 4 ml de líquido ruminal y 4 ml de ácido clorhídrico 0.2 N, a 6300 x g durante 15 minutos, y posteriormente conservado a -20°C hasta su procesamiento.

Utilizando nitroprusiato sódico como catalizador, el NH_3 en medio alcalino reacciona con hipoclorito y fenol, generando azul de indofenol. Por lo tanto, la concentración de NH_3 se determinó mediante la lectura espectrofotométrica (625 nm) de la absorbancia del indofenol, dado que el primer parámetro es directamente proporcional al segundo (Chaney y Marbach, 1962). Multiplicando la concentración de NH_3 por 0.8235, se obtuvo la de nitrógeno amoniacal (N-NH_3).

2. 4. 2. 2. Cuantificación de protozoos

Para cuantificar la concentración de protozoos, se utilizó la mezcla de 5 ml de filtrado de líquido ruminal y 5 ml de solución de formol al 18%, siendo conservada a 4°C hasta su procesamiento. La concentración de protozoos se cuantificó mediante el conteo en el microscopio óptico con el objetivo 40x. A 1 ml de la muestra coloreada con verde de metilo, se le adicionó 9 ml de una solución de glicerol al 30% (para evitar la rápida sedimentación de los protozoos). Posteriormente 1 ml de la mezcla anterior fue llevado a la cámara de *Sedgewick – Rafter*. La concentración de protozoos en líquido ruminal fue calculada mediante la siguiente fórmula:

$$Nro\ de\ protozoos/ml = \frac{nro.\ de\ protozoos\ en\ 50\ campos \times 1000}{12.5 \times factor\ de\ dilución}$$

Donde:

Volumen de la celda: 20 mm × 50 mm × 1mm = 1000 mm³

Volumen de 50 campos= 0.5mm × 0.5 mm × 1 mm × 50 = 12.5 mm³

2. 4. 2. 3. Cuantificación de las concentraciones absolutas y relativas de ácidos grasos volátiles

Para determinar las concentraciones de ácidos grasos volátiles (AGV) en las muestras, se utilizó el sobrenadante obtenido de centrifugar a 6300 x g durante 15 minutos la mezcla de 10 ml del filtrado de líquido ruminal y 0.1ml de ácido sulfúrico 0.5M, posteriormente conservado a -20°C hasta su procesamiento.

Las concentraciones absolutas de AGV totales, acetato, propionato y butirato se cuantificaron mediante cromatografía gaseosa (Equipo Konik 5000B con un automuestreador Robokrom GC, y una columna capilar Nukol de 30m y 0,32mm). La purificación de los AGVs se realizó con ácido ortofosfórico 25% en ácido sulfúrico 0.5M a razón de 0,5mL cada 2mL de muestra, y luego centrifugadas por 10 minutos a 5.000 x g (Friggens *et al.*, 1998). Las concentraciones relativas de acetato, propionato y butirato se expresaron como porcentajes de la concentración total de AGVs en cada

muestra. La relación acetato/propionato se obtuvo del cociente de las concentraciones absolutas de dichos AGV en cada muestra.

2. 4. 2. 4. Cuantificación de bacterias ruminales

Para cuantificación bacteriana se utilizó el filtrado del líquido ruminal, conservado a -80°C hasta continuar con su procesamiento. Seguidamente se lo centrifugó a 3900 x g durante 15 minutos, de manera que el sedimento obtenido, se liofilizó y conservó a -80°C.

A partir de 0.1g de cada muestra de líquido ruminal liofilizado, se extrajo el ADN microbiano mediante el kit comercial QIAamp DNA Stool Mini (Qiagen GMBH, Alemania) según instrucciones del fabricante. El ADN fue analizado cualitativamente y cuantitativamente mediante corridas electroforéticas en geles de agarosa al 0.8% y mediante espectrofotometría a 260 nm (Nanodrop ND-1000, Thermo Fisher Scientific, USA).

La identificación de Bacterias Totales (BT) se realizó mediante el gen codificante de la subunidad ribosomal 16S (Harms *et al.*, 2003). Para la identificación de BSRD se seleccionaron tres subgrupos específicos, usando cebadores desarrollados para coincidir con la secuencia del gen codificante de la enzima sulfito-reductasa (GSR), altamente conservada entre las BSRD (Spence *et al.* 2008). Los cebadores del Grupo 1 (G1) se generaron para identificar los organismos relacionados con *Desulfobulbus* sp., más estrechamente correspondidos con *Desulfobulbus propionicus*. Los cebadores del Grupo 2 (G2) se dirigieron a BSR similares a *Desulfovibrio* sp, sin embargo, se conoce muy poco sobre las poblaciones bacterianas específicas que se esperan identificar con este par de cebadores. Finalmente, los iniciadores del Grupo 3 (G3) identifican a *Desulfovibrio desulfuricans*, una especie que ya ha sido aislada repetidas veces a partir del contenido ruminal de ovinos y bovinos (Howard y Hungate, 1976; Cumming *et al.*, 1995b). Las temperaturas de hibridación utilizadas, fueron diferentes a las reportadas por Spence *et al.* (2008), ya que se pusieron a punto según condiciones de laboratorio (Tabla 9).

Las mezclas de la reacción se realizaron en un volumen final de 25µl, conteniendo: 1× del buffer de la polimerasa, 0,4 µM de cada cebador, 10 mM de cada dNTP

(Promega) y 1,25 U de polimerasa Go-Taq (Promega). Se utilizó un termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf), con los ciclos generales: 1 ciclo de 5 minutos a 95°C, 30 ciclos de 40 segundos a 95°C, 1 ciclo de 40 segundos (se utilizaron cinco temperaturas en gradiente para cada grupo bacteriano) y 1 ciclo de 40 segundos a 72°C, con una extensión final de 10 minutos a 72°C.

Posteriormente los productos de amplificación se revelaron por electroforesis en gel de agarosa (1,5% p/v) y se tiñeron con una solución de bromuro de etidio (10ug/ml).

Tabla 9. Secuencias nucleotídicas, tamaños (pb) y temperaturas de hibridación de los cebadores utilizados para la identificación de BT (bacterias totales) y BRSD (bacterias ruminales sulfo-reductoras desasimilatorias)

Grupo bacteriano	Cebador	Secuencia (5'-3')	Pb	Temp. (°C)
Bacterias totales	1055F	ATGGCTGTCGTCAGCT	337	58
	1392R	ACGGGCGGTGTGTAC		
Desulfobulbus propionicus	Grp1F	GYGAGTGGKCCTGCTAYGA	172	54
	Grp1R	CCAGGTGCCGATAACRGC		
Desulfovibrio sp.	Grp2F	CGACACCCARGACATGTGC	121	62
	Grp2R	GCWGCTACGCAACCGTTGGG		
Desulfovibrio desulfuricans	Grp3F	CTGCGAATATGCCTGCTACA	119	59
	Grp3R	GGGGCARCCGTCGAACTTG		

Adaptada de Spence et al., 2008

2. 4. 2. 4. 1. Reacción en cadena de polimerasa cuantitativa

2. 4. 2. 4. 1. 1. Generación del ADN estándar

Para cada uno de los grupos de BSRD, el ADN estándar consistió en un plásmido con la secuencia clonada del correspondiente GSR. A continuación se desarrollan brevemente los pasos realizados para la obtención de dichos estándares.

a. Transformación de *Escherichia coli* competentes: los productos de amplificación mencionados en el apartado anterior, se purificaron siguiendo las instrucciones de un *kit* comercial (Wizard SV Gel and PCR Clean – Up System,

Promega), se clonaron en el vector pGEM-T Easy (Promega) por ligación con la enzima T4 ligasa (Promega) y se transformaron células de *E. coli* DH5 α competentes químicas (Thermo Fisher). Los clones seleccionados se secuenciaron a partir de cebadores del vector (SP6 y T7) en un Secuenciador Capilar ABI 3130xl (Applied Biosystems, USA) en la Unidad de Genómica de CICVyA-INTA.

b. Extracción de ADN plasmídico: la extracción y purificación del ADN fue realizada con un *kit* comercial de extracción de ADN plasmídico (Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System, Promega), según las indicaciones del fabricante.

c. Secuenciación: los clones fueron seleccionados al azar y amplificados por PCR. Los clones de las genotecas fueron secuenciados utilizando los iniciadores específicos descritos en la Tabla. Los productos fueron secuenciados en la Unidad de Genómica del Instituto de Biotecnología (INTA Castelar) utilizando la tecnología ABI 3500XL Genetic Analyser (Applied Biosystems) que utilizó Big Dye Terminator 3.

d. Análisis de las secuencias: las secuencias obtenidas fueron analizadas mediante el programa Decipher, en búsqueda de quimeras, las que fueron removidas para futuros análisis. Dichas secuencias fueron comparadas con secuencias disponibles en la base de datos GenBank del National Center for Biotechnology Information, (NCBI BLASTN) (Altschul et al., 1990) y clasificadas mediante RDP (Ribosomal Database Project) (Cole *et al.* 2014). Las secuencias de los clones de los grupos G1, G2 y G3 tuvieron similitud con las secuencias de las correspondientes BSRD que están depositadas en el GenBank. Por lo que se continuó trabajando con estas tres secuencias obtenidas para poner a punto la PCR cuantitativa.

2. 4. 2. 4. 1. 2. Determinación de las condiciones óptimas de la reacción de PCR cuantitativa

La cuantificación absoluta fue realizada mediante el uso del equipo Step One Plus y con el respaldo del *software* ABI 7500 v2.3 (Applied Biosystem-ABI®, USA) y la reacción fue conducida en un volumen final de 20 μ L compuesto por: 4 μ L 5 \times HOT FIREPol EvaGreen qPCR Mix Plus (Solis BioDyne, Estonia), 0.2 μ L de cada cebador (50 pmol), 2 μ L de ADN genómico y 13.8 μ L de agua grado PCR.

La amplificación involucró un ciclo de 95°C por 15 minutos para la activación de la enzima, seguida de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos de desnaturalización, la

temperatura de hibridación (Tabla 9) por 20 segundos, y 72°C por 45 segundos de extensión. Por otra parte, la especificidad del amplicón fue verificado de acuerdo con la curva de disociación del producto final de la PCR, mediante el incremento de la temperatura de 1°C cada 30 segundos desde los 60 a 95°C.

El número de copias de cada estándar fue estimado según Singh *et al.* (2014) con la siguiente ecuación:

$$N^{\circ} \text{ copias}/\mu\text{l} = \frac{\text{concentración del plásmido (g}/\mu\text{l}) \times 6.022 \times 10^{23}}{\text{largo del plásmido recombinante (pb)} \times 660}$$

Por otra parte, se prepararon diluciones de 10^8 a 10^1 para construir la curva estándar para cada grupo de BRS, y se amplificaron junto con las muestras por duplicado. El número de copias de los genes 16S ADNr de cada muestra fue estimada a partir de la siguiente ecuación:

$$N^{\circ} \text{ copias} / g \text{ de filtrado ruminal} = \frac{Q \times C}{V}$$

Donde Q es la media cuantitativa del número de copias, C es la concentración total de ADN en cada muestra (ng/g), y V es la concentración de ADN utilizado en la reacción (ng). En cada reacción, los valores de la regresión lineal de la curva estándar estuvieron dentro de los límites normales ($R^2 = 0.99$; la pendiente = -3.2 a -3.6; eficiencia = 100-110%).

Las concentraciones absolutas de BT, G1, G2, G3 y BRSDT (BRSD Totales, resultante de la suma de G1, G2 y G3) se expresaron como número de copias de los correspondientes genes marcadores, por gramo del contenido ruminal liofilizado. En el caso de las BRSD, también se expresaron en términos relativos a la concentración de BT, como porcentajes de esta última (G1P, G2P, G3P y BRSDTP).

2. 5. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó mediante la versión i386 3.4.2 del programa R (The R Project for Statistical Computing). El diseño experimental utilizado fue completamente aleatorizado, considerando al animal como unidad experimental. Los parámetros ruminales, el consumo de S y la FR se analizaron como medidas repetidas en el tiempo mediante modelos mixtos, utilizando el paquete *nlme* (Pinheiro y Bates, 2000) del mencionado programa estadístico. En dichos modelos se consideró al animal como efecto aleatorio, y al nivel de S dietético, el momento de muestreo (el día

de muestreo en el caso de los parámetros ruminales, y la fecha de revisión clínica en el caso de la FR) y sus interacciones como efectos fijos. Las correlaciones entre observaciones provenientes del mismo animal, se modelaron mediante el procedimiento *correlation*, y en casos de heterocedasticidad, la misma se modeló mediante el procedimiento *weights*. Las interacciones con p-valores superiores a 0.05 se eliminaron de los modelos. La superioridad de la concentración media de H₂S ruminal del tratamiento AS en el día 38, con respecto a 2000 ppm, se comprobó mediante una prueba t de Student. Los parámetros productivos se analizaron con respecto al nivel de S dietético, mediante pruebas t de Student para muestras independientes.

Los modelos aplicados para el análisis de la FR, el consumo de S y los parámetros ruminales fueron de la forma:

$$Y_{ija} = \mu + S_i + M_j + SM_{ij} + \varepsilon_a + \varepsilon_{ija}$$

Donde:

Y_{ija}: observación de la variable respuesta correspondiente al i-ésimo nivel de S dietético, en el j-ésimo momento de muestreo, en el a-ésimo animal.

μ : media general de la variable respuesta.

S_i: efecto de i-ésimo nivel de S dietético.

M_j: efecto del j-ésimo momento de muestreo.

SM_{ij}: efecto de la interacción entre el i-ésimo nivel de S dietético y el j-ésimo momento de muestreo.

ε_a : efecto aleatorio de a-ésimo animal.

ε_{ija} : error aleatorio asociado a la observación de la variable respuesta correspondiente al i-ésimo nivel de S dietético, en el j-ésimo momento de muestreo, en el a-ésimo animal.

Los modelos aplicados para el análisis de los parámetros productivos fueron de la forma:

$$Y_{ia} = \mu + S_i + \varepsilon_{ia}$$

Donde:

Y_{ia}: observación de la variable respuesta correspondiente al i-ésimo nivel de S dietético con el a-ésimo animal.

μ : media general de la variable respuesta.

S_i: efecto de i-ésimo nivel de S dietético.

ϵ_{ia} : error aleatorio asociado a la observación de la variable respuesta correspondiente al i -ésimo nivel de S dietético, con el a -ésimo animal.

Adicionalmente, se evaluaron las asociaciones entre las concentraciones de H_2S ruminal, con las concentraciones absolutas y relativas de BSRD, mediante el coeficiente de correlación de Pearson, según tratamientos y días de muestreo.

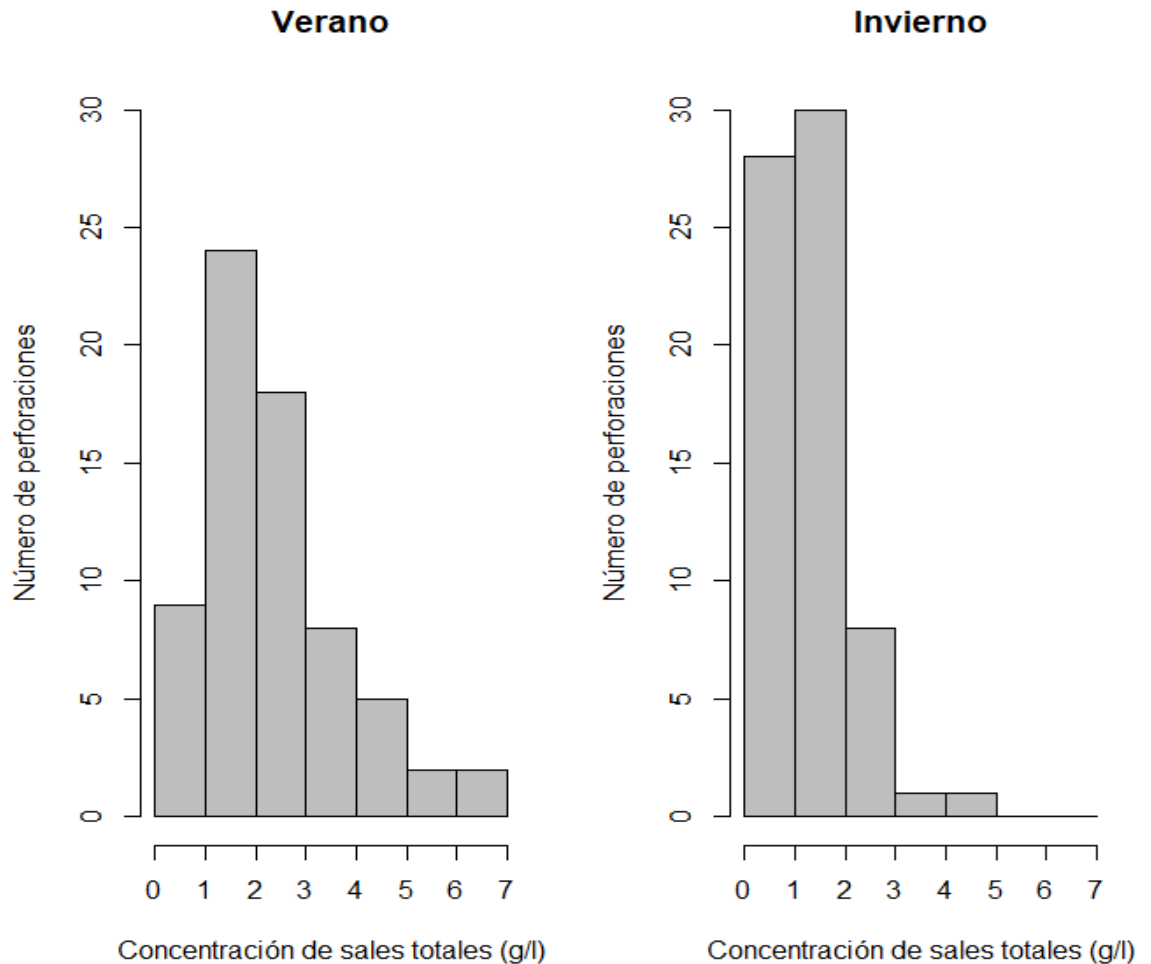
RESULTADOS

1. ESTUDIO DESCRIPTIVO

1. 1. Agua de bebida: sales totales y sulfatos

En el presente estudio, la mayoría de las perforaciones abastecedoras de agua de bebida para bovinos de EC de la región en estudio, presentaron concentraciones inferiores a 4 g/l de ST (límite máximo sugerido para dicho sistema productivo), tanto en el muestreo estival como en el invernal (Figura 5). Adicionalmente, el porcentaje de ST correspondiente a SO_4 , fue inferior al 15% en la mayoría de las perforaciones, y en ambas estaciones (Figura 6).

Figura 5. Distribución de frecuencia de las perforaciones utilizadas en establecimientos de engorde a corral de la región en estudio, según la concentración de sales totales en sus correspondientes muestras de agua de bebida (n=68)



Las perforaciones muestreadas se clasificaron como de contenido bajo, medio o alto de SO_4 , según sus correspondientes muestras de agua presentaran concentraciones < 250, entre 250 y 500, o > 500 mg/l, respectivamente. En ambas estaciones, la mayoría de las perforaciones se clasificaron como de contenido medio o bajo de SO_4 . La proporción estival de perforaciones con contenido medio, fue superior a la invernal, en virtud de la menor proporción de perforaciones con contenido bajo de SO_4 en verano (Figura 7). En este sentido, la concentración promedio de SO_4 fue superior en el verano, y las correspondientes observaciones, más variables que en el invierno (Tabla 10).

Figura 6. Distribución de frecuencia de las perforaciones utilizadas en establecimientos de engorde a corral de la región en estudio, según el porcentaje de sulfatos (referido a sales totales) en sus correspondientes muestras de agua de bebida (n=68)

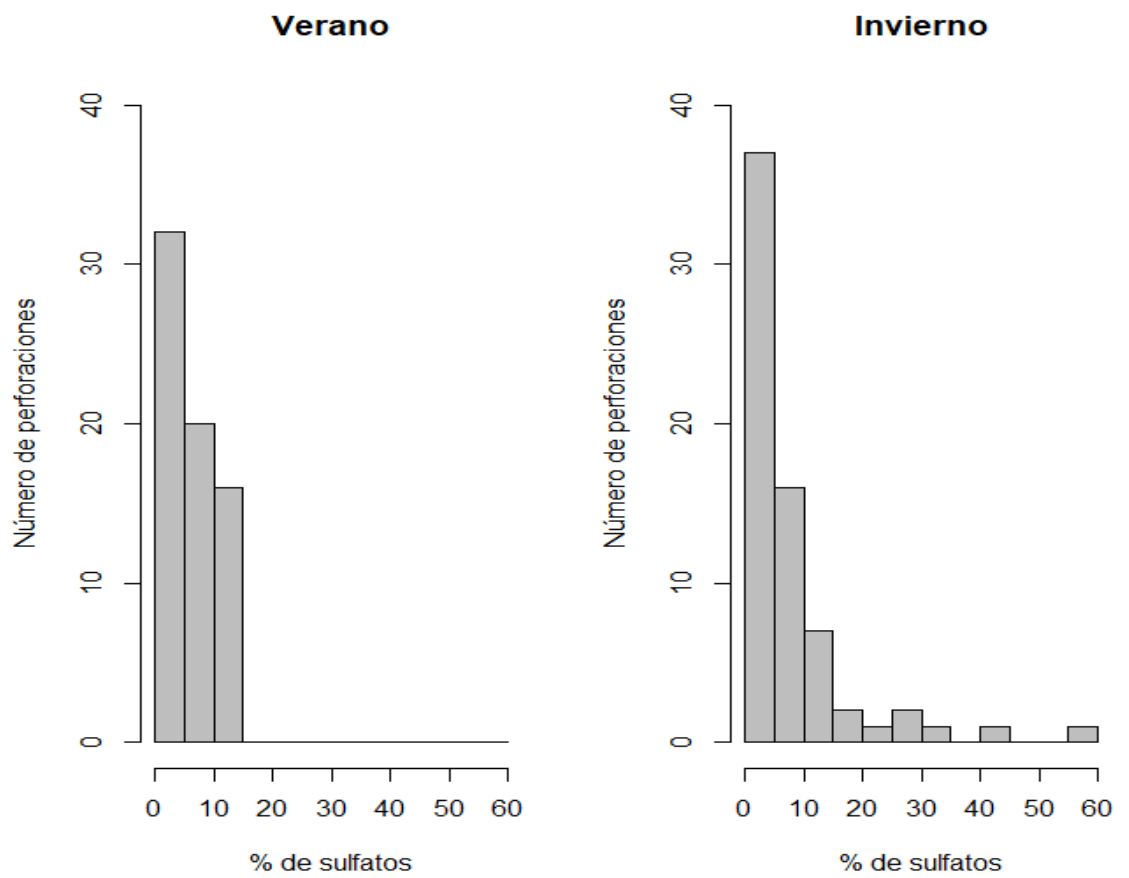


Figura 7. Distribución porcentual de las perforaciones utilizadas en establecimientos de engorde a corral, según la concentración de sulfatos en sus correspondientes muestras de agua de bebida (n=68)

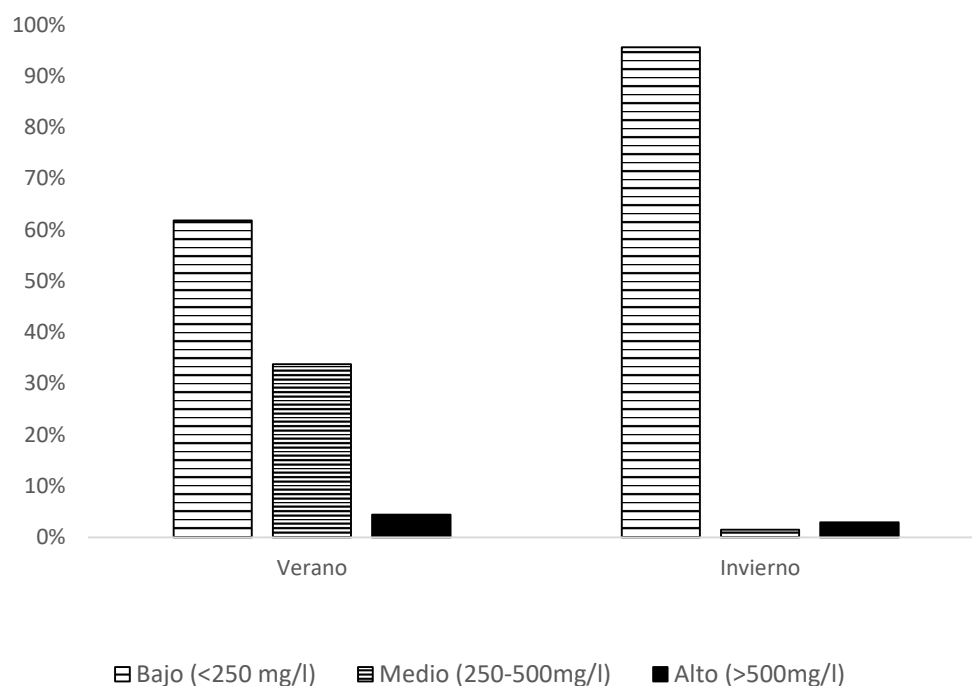


Tabla 10. Valores descriptivos de la concentración de sulfatos (mg/l) en el agua de bebida suministrada a bovinos de engorde a corral de la región en estudio

Estación	Media	Desvío estándar	Mediana	Mínimo	Máximo	n (perforaciones)
Verano	184.5	160	104	22	677	68
Invierno	90	78	67	5	602	68

1. 2. Azufre total en granos de destilería

Las concentraciones medias de S en lotes de GD provenientes de las dos plantas industriales abastecedoras de la región en estudio, fueron similares entre sí, pero las observaciones correspondientes a la planta 1 fueron más variables que las provenientes de la planta 2 (Tabla 11).

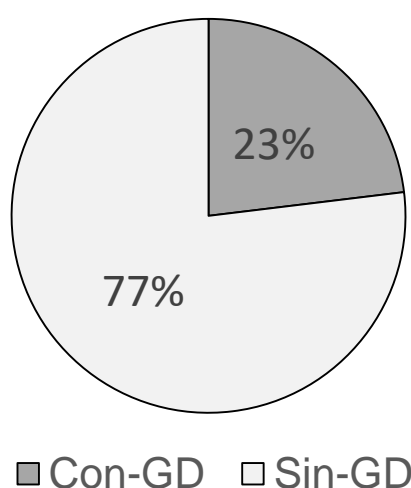
Tabla 11. Valores descriptivos del contenido de azufre en granos de destilería (% de MS) provenientes de las dos plantas industriales proveedoras de la región en estudio

Origen	Promedio	Desvío estándar	Coefficiente de Variación (%)	Mínimo	Máximo	n (lotes)
Planta 1	0.665	0.07	10.5	0.52	0.74	12
Planta 2	0.687	0.03	4.4	0.64	0.72	6

1. 3. Azufre dietético total

El resultado de la encuesta sobre el suministro de GD en los 50 establecimientos muestreados durante el estudio descriptivo, se explicita en la Figura 8.

Figura 8. Proporción de perforaciones muestreadas durante el año 2017 en la región en estudio, que suministraban agua de bebida a bovinos de engorde a corral consumiendo o no, granos de destilería (GD)



El contenido de S en las dietas con GD fue superior al de las dietas sin GD, de manera que fueron las únicas que superaron el 0.3% de S total, máximo sugerido para bovinos de EC (Figura 9). Debido al mayor promedio y variabilidad de las concentraciones de SO_4 en agua de bebida y al mayor CEDA, las concentraciones medias estivales de S dietético total fueron ligeramente superiores y más variables que las invernales (Tabla 12).

Figura 9. Niveles medios y desvíos estándar de las concentraciones estimadas de azufre (S) total, en dietas suministradas a bovinos de engorde a corral de la región en estudio, en verano e invierno del año 2017, según incluyeran o no granos de destilería (GD)

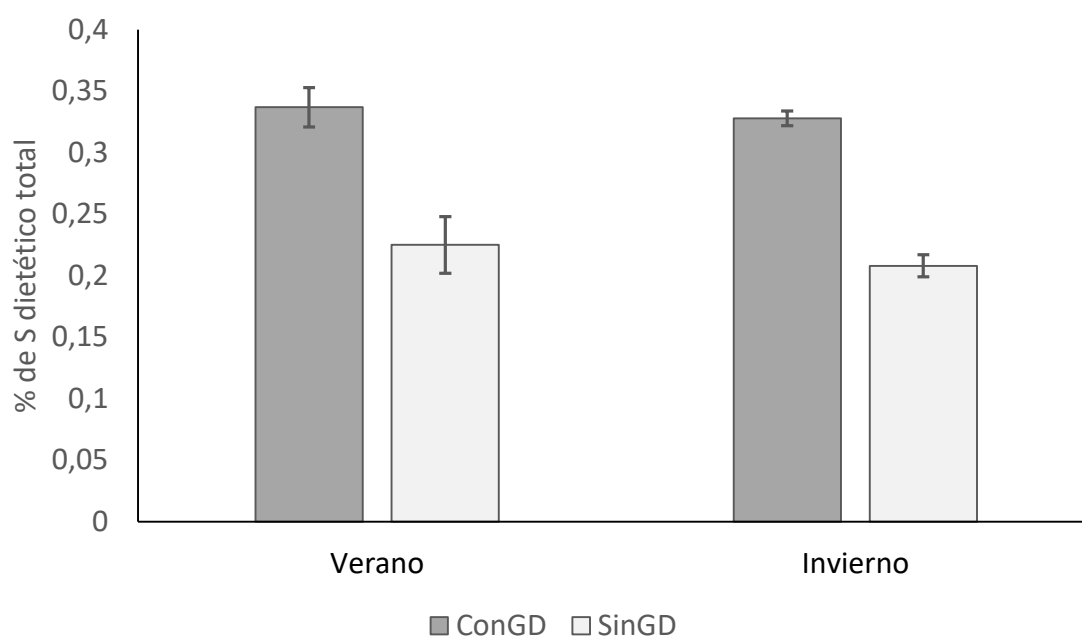


Tabla 12. Estadística descriptiva del % estimado de azufre total, en dietas suministradas a bovinos de engorde a corral de la región en estudio, según incluyeran o no granos de destilería (GD)

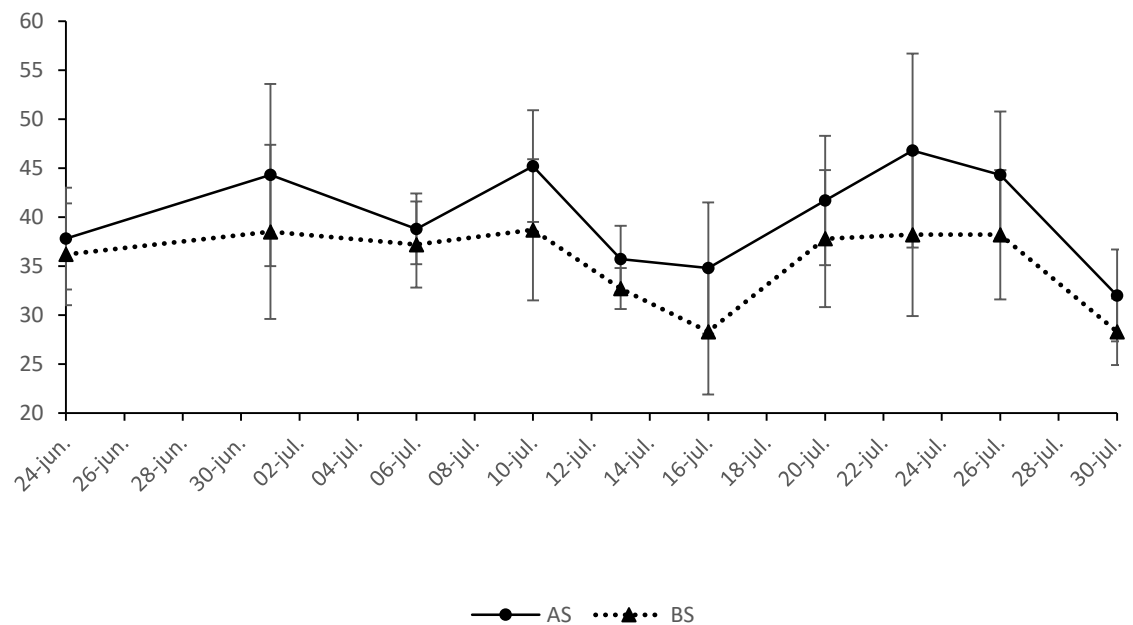
Estación	GD	Promedio	Desvío estándar	Máximo	Mínimo
Verano	Con GD	0.337	0.016	0.374	0.324
	Sin GD	0.225	0.023	0.290	0.201
Invierno	Con GD	0.328	0.006	0.343	0.321
	Sin GD	0.208	0.009	0.247	0.198

2. ESTUDIO EXPERIMENTAL

2. 1. Parámetros clínicos

Si bien no se observaron alteraciones en el comportamiento, postura, sensorio ni en el reflejo de amenaza, se encontró una tendencia al incremento de la FR en los animales del tratamiento AS ($p=0.054$), y un efecto significativo de la fecha en la cual se efectuó la exploración clínica ($p<0.001$, Figura 10).

Figura 10. Frecuencias respiratorias medias y desvíos estándar, según la fecha de exploración clínica, en bovinos de engorde a corral consumiendo las dietas AS (alto azufre) y BS (bajo azufre)



2. 2. Concentración de H₂S ruminal

Se encontró una interacción significativa ($p < 0.001$) entre el nivel de S dietético y el día de muestreo, sobre la concentración de H₂S ruminal, siendo más elevada con el tratamiento AS en el día 38 (Figura 11), y significativamente superior a 2000 ppm ($p = 0.01$), umbral propuesto respecto del riesgo de generación de PEM. También se observó mayor variabilidad en la concentración de H₂S con el tratamiento AS, en los días 22 ($p = 0.017$) y 38 ($p < 0.008$) del estudio (Tabla 13).

Figura 11. Concentraciones medias y desvíos estándar de H₂S ruminal (ppm) según días de muestreo en bovinos de engorde a corral consumiendo las dietas AS (alto azufre) y BS (bajo azufre)

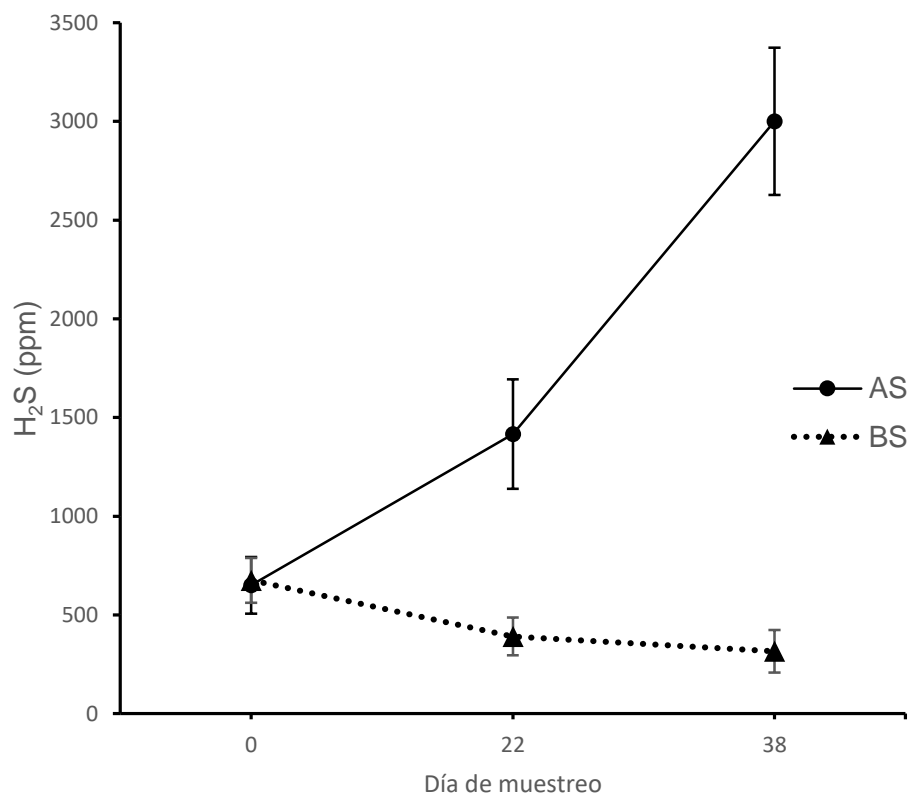


Tabla 13. Concentraciones medias y desvíos estándar de H₂S ruminal (ppm) según días de muestreo en bovinos de engorde a corral consumiendo las dietas BS (bajo azufre) y AS (alto azufre)

Tratamiento	Día 0 (ppm)	Día 22 (ppm)	Día 38 (ppm)
BS	675 ± 227 a	391 ± 191 a	316 ± 216 a
AS	650 ± 288 a	1416 ± 556 b	3000 ± 746 b

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas entre tratamientos (Tukey, $p < 0.05$)

2. 3. Parámetros productivos

El nivel de S dietético no tuvo efectos significativos sobre el CMS, el ADP ni la CA, en bovinos de EC al cabo de 38 días de consumir las dietas BS y AS (Tabla 14).

Tabla 14. Promedios y desvíos estándar de parámetros productivos en bovinos de engorde a corral consumiendo las dietas BS (bajo azufre) y AS (alto azufre) durante 38 días

Tratamiento	PV inicial (kg)	PV final (kg)	CMS (kg)	ADP (kg)	CA
BS	268 ± 15.3 a	324 ± 16.5 a	8.06 ± 1.0 a	1.5 ± 0.2 a	5.4 ± 0.7 a
AS	268 ± 13.2 a	329 ± 23.0 a	8.10 ± 1.3 a	1.6 ± 0.3 a	5.2 ± 0.7 a

Letras iguales en la misma columna indican ausencia de diferencias significativas ($p > 0.05$)

PV: peso vivo

CMS: consumo de materia seca

ADP: aumento diario de peso

CA: conversión alimenticia

El nivel de S dietético tuvo efecto significativo sobre el consumo de S ($p < 0.001$, Tabla 15), corroborándose las concentraciones propuestas para ambos tratamientos, en el alimento consumido por los animales de los correspondientes grupos ($p < 0.001$, Tabla 16).

Tabla 15. Promedios y desvíos estándar del consumo de azufre total (g/animal/día) en bovinos de engorde a corral consumiendo las dietas BS (bajo azufre) y AS (alto azufre), según días de muestreo

Tratamiento	Día -1 (g/animal)	Día 18 (g/animal)	Día 36 (g/animal)
BS	14.60 ± 2.71 a	17.86 ± 2.06 b	18.35 ± 2.85 b
AS	16.57 ± 1.80 a	37.63 ± 4.19 a	34.66 ± 5.43 a

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas (Tukey, $p < 0.05$)

Tabla 16. Promedios y desvíos estándar de la concentración de azufre (% de MS) en el alimento consumido por bovinos de engorde a corral consumiendo las dietas BS (bajo azufre) y AS (alto azufre) según los días de muestreo

Tratamiento	Día -1 (%MS)	Día 18 (%MS)	Día 36 (%MS)
BS	0.193 ± 0.007 a	0.187 ± 0.010 b	0.190 ± 0.002 b
AS	0.190 ± 0.002 a	0.392 ± 0.003 a	0.392 ± 0.002 a

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas (Tukey, $p < 0.05$)

2. 4. Ambiente ruminal

El pH, la concentración de N-NH₃, el recuento de protozoos totales, y proporciones de AGV, no fueron afectadas por el nivel de S dietético. La interacción entre el nivel de S dietético y el día de muestreo se eliminó de los correspondientes modelos, dado que no fue significativa para ninguno de los mencionados parámetros. Por lo anterior, en la presente sección solamente se muestran las medias marginales de los tratamientos

(Tabla 17), mientras que en el “Apéndice de tablas” se explicita la información completa.

Tabla 17. Medias marginales de tratamientos y desvíos estándar, correspondientes a parámetros ruminales de bovinos en engorde a corral consumiendo las dietas BS (bajo azufre) y AS (alto azufre)

Parámetro	Tratamiento		p-valor
	BS	AS	
pH	6.7 ± 0.3 a	6.7 ± 0.3 a	0.92
N-NH ₃ (mg/dl)	10.9 ± 4.7 a	13.2 ± 6.1 a	0.44
Protozoos (células/ml)	2.1E+05 ± 2.8E+05 a	1.5E+05 ± 2.4E+05 a	0.17
Acetato (%)	60.2 ± 5.1 a	57.7 ± 10.0 a	0.44
Propionato (%)	30.5 ± 6.0 a	34.1 ± 9.5 a	0.29
Butirato (%)	9.3 ± 3.3 a	8.3 ± 3.7 a	0.43
Acetato/Propionato	2.1 ± 0.6 a	1.9 ± 1.1 a	0.72

Letras iguales en la misma fila indican ausencia de diferencias significativas ($p > 0.05$)

N-NH₃: nitrógeno amoniacal

E: exponencial ($\times 10^x$)

2. 4. 1. Concentración de bacterias totales y bacterias ruminales sulfo-reductoras desasimilatorias

El efecto del nivel S dietético sobre la concentración de BT y de BRSD, no fue significativo. La interacción entre el nivel de S dietético y el día de muestreo se eliminó de los modelos, dado que no fue significativa para ninguno de los mencionados parámetros. Por lo anterior, en la presente sección solamente se muestran las medias marginales de los tratamientos (Tablas 16 y 17), pero en el “Apéndice de tablas” se explicita la información completa. Tampoco se observaron correlaciones significativas entre los porcentajes de BRSD con las concentraciones de H₂S, según tratamiento y día de muestreo (Tablas 18 y 19). En el “Apéndice de diagramas”, se encuentran los correspondientes diagramas de dispersión.

Tabla 18. Concentraciones medias absolutas (copias / g de contenido ruminal) y desvíos estándar, de bacterias totales (BT) y de bacterias ruminales sulfo-reductoras desasimilatorias (BRSD) en contenido ruminal de bovinos consumiendo las dietas BS (bajo azufre) y AS (alto azufre)

Grupo de BRSD (copias/g de contenido ruminal)	Tratamiento		p valor
	BS	AS	
BT	1.7E+11 ± 1.0E+11 a	1.7E+11 ± 7.9E+10 a	0.85
G1	5.7E+08 ± 5.9E+08 a	8.0E+08 ± 1.0E+09 a	0.43
G2	6.9E+06 ± 6.8E+06 a	7.1E+06 ± 9.5E+06 a	0.14
G3	1.6E+07 ± 3.8E+07 a	2.0E+07 ± 2.6E+07 a	0.75
BRSDT	5.9E+08 ± 5.9E+08 a	8.3E+08 ± 1.0E+09 a	0.46

Letras iguales en la misma fila indican ausencia de diferencias significativas ($p > 0.05$).

E: exponencial ($\times 10^x$)

BT: bacterias totales

BRSD: bacterias ruminales sulfo-reductoras desasimilatorias

G1: BRSD del grupo 1

G2: BRSD del grupo 2

G3: BRSD del grupo 3

BRSDT: BRSD totales

Tabla 17. Concentraciones medias relativas (% de bacterias totales) y desvíos estándar, de BRSD (bacterias ruminales sulfo-reductoras desasimilatorias) en contenido ruminal de bovinos consumiendo las dietas BS (bajo azufre) y AS (alto azufre)

Grupo de BRSD (%)	Tratamiento		p valor
	BS	AS	
G1P	0.410 ± 0.54 a	0.560 ± 0.85 a	0.55
G2P	0.005 ± 0.01 a	0.004 ± 0.01 a	0.97
G3P	0.006 ± 0.01 a	0.012 ± 0.02 a	0.29
BRSDTP	0.420 ± 0.54 a	0.57 ± 0.87 a	0.54

Letras iguales en la misma fila indican ausencia de diferencias significativas ($p > 0.05$).

BRSD: bacterias ruminales sulfo-reductoras desasimilatorias

G1P: porcentaje de BRSD del grupo 1

G2P: porcentaje de BRSD del grupo 2

G3P: porcentaje de BRSD del grupo 3

BRSDTP: porcentaje de BRSD totales

Tabla 20. Coeficientes de correlación lineal (Pearson) entre la concentración de H₂S ruminal y las concentraciones absolutas de BRSD (bacterias ruminales sulfo-reductoras desasimilatorias) según tratamientos y días de muestreo

BRSD	Día de muestreo	Tratamiento	R	P valor
G1	0	-----	-0.16	0.62
	22	AS	-0.18	0.74
		BS	-0.23	0.67
	38	AS	0.19	0.71
BS		-0.21	0.69	
G2	0	-----	-0.15	0.65
	22	AS	-0.19	0.72
		BS	-0.05	0.92
	38	AS	0.71	0.10
BS		0.24	0.65	
G3	0	-----	0.3	0.34
	22	AS	-0.26	0.60
		BS	-0.75	0.08
	38	AS	0.5	0.31
BS		0.47	0.35	
BRSDT	0	-----	-0.16	0.62
	22	AS	-0.18	0.73
		BS	-0.3	0.56
	38	AS	0.21	0.69
BS		-0.19	0.72	

BRSD: bacterias ruminales sulfo-reductoras desasimilatorias

G1: BRSD del grupo 1

G2: BRSD del grupo 2

G3: BRSD del grupo 3

BRSDT: BRSD totales

Tabla 21. Coeficientes de correlación lineal (Pearson) entre la concentración de H₂S ruminal (ppm) y las concentraciones relativas de BRSD (% de bacterias totales) según tratamientos y días de muestreo

% de BRSD	Día de muestreo	Tratamiento	R	P valor
G1P	0	-----	-0.23	0.48
	22	AS	0.31	0.54
		BS	-0.04	0.90
	38	AS	0.05	0.92
		BS	-0.33	0.50
	G2P	0	-----	0.01
22		AS	0.011	0.98
		BS	0.03	0.96
38		AS	0.67	0.14
		BS	0.06	0.92
G3P		0	-----	0.51
	22	AS	-0.19	0.70
		BS	-0.70	0.08
	38	AS	0.52	0.29
		BS	0.38	0.46
	BRSDP	0	-----	-0.22
22		AS	0.31	0.55
		BS	-0.07	0.90
38		AS	0.06	0.90
		BS	-0.31	0.55

BRSD: bacterias ruminales sulfo-reductoras desasimilatorias

G1P: porcentaje de BRSD del grupo 1

G2P: porcentaje de BRSD del grupo 2

G3P: porcentaje de BRSD del grupo 3

BRSDTP: porcentaje de BRSD totales

DISCUSIÓN

1. ESTUDIO DESCRIPTIVO

1. 1. Sulfatos en el agua de bebida

El presente estudio descriptivo tuvo por objetivo caracterizar preliminarmente, la concentración de SO_4 en el agua de bebida suministrada a bovinos de EC de la región en estudio. En términos generales, las concentraciones de SO_4 observadas en el agua de bebida, fueron muy inferiores a los antecedentes regionales, referidos al agua subterránea. Esto pudo deberse al efecto diluyente de los excesos hídricos de los últimos años en la región estudiada, principalmente debido a la tendencia de incremento del volumen de agua precipitada (Fili *et al.*, 2000; Giacosa y Paoli, 2001; Blarasin, Cabrera, Matteoda, Aguirre, Frontera *et al.*, 2014). A su vez, este fenómeno explica parcialmente el constante ascenso del nivel freático regional. Paralelamente, dicho cambio freático trae aparejado la disminución del espesor de la zona no saturada, reduciéndose el lapso de pasaje hídrico desde la superficie del suelo hasta la región saturada. Esto puede provocar la reducción del tiempo de captación hídrica de solutos del terreno, y por ende, una tendencia a la disminución de su concentración en el agua subterránea (Bavera, 2011; Blarasin, Cabrera, Matteoda, Aguirre, Frontera *et al.*, 2014).

Adicionalmente, las bajas concentraciones de solutos observadas en el muestreo estival podrían explicarse, al menos parcialmente, por los altos regímenes pluviométricos registrados semanas antes a la realización del correspondiente muestreo (enero-febrero de 2017, Informe Estación Meteorológica de la EEA INTA Marcos Juárez). En este sentido, se ha comprobado que hasta un 20% de la recarga anual del acuífero libre del sur de la provincia de Córdoba, podía provenir del agua de lluvia directamente precipitada sobre la región (Cabrera, 2009; Blarasin, Cabrera, Matteoda, Aguirre, Frontera *et al.*, 2014).

Por otro lado, las bajas concentraciones observadas en el muestreo invernal, cuyo promedio muestral fue inferior al estival, pudieron deberse al balance hídrico positivo en los acuíferos, ya que coincide con el período de su recarga en esta región (Blarasin, Cabrera, Matteoda, Aguirre, Frontera *et al.*, 2014). Dicha tendencia en el balance hídrico, se fundamenta principalmente en una menor evapotranspiración

durante el período otoño-invernal, debido a que las temperaturas medias son inferiores a las del período primavero-estival (Fresina, 2001). Otro factor que puede contribuir al incremento de las concentraciones de solutos en el agua de bebida durante épocas cálidas, es la evaporación de agua en los bebederos, con la consecuente concentración de sales (Cunha *et al.*, 2008). En coincidencia con estos conceptos, Giménez (2011) observó que las menores concentraciones de solutos en agua de bebida de la región Pampeana, fueron las invernales.

En términos generales, las evidencias expuestas sustentan la idea de que todo factor que incremente la carga hídrica subterránea, puede provocar un efecto de dilución sobre sus solutos. De acuerdo con este concepto, pero en el extremo opuesto, se han observado incrementos en la concentración de solutos en el agua de bebida, e incidencia de problemas sanitarios consecuentes, durante períodos de severa sequía (Cseh *et al.*, 2006; Cantón *et al.*, 2006).

El agua de bebida proveniente de la mayoría de las perforaciones utilizadas en los EC de la región en estudio, presentó concentraciones de SO_4 inferiores a 500 mg/l, haciéndolas aptas en este aspecto, para dicho tipo de sistema productivo. Sin embargo, en el verano se incrementó la proporción de perforaciones con las cuales el suministro de GD podría ser desaconsejado, o recomendarse su restricción, en virtud de reducir el riesgo de perjuicios productivo-sanitarios por exceso de S. Adicionalmente, el mencionado riesgo podría acentuarse aún más en la época estival, dado que el consumo de agua de bebida se incrementa respecto del invierno (Gould, 2000).

Considerando la influencia de las condiciones climático-meteorológicas sobre la composición del agua subterránea, se debería prolongar la evaluación de la concentración de SO_4 y ST en el agua de bebida, a fin de caracterizar de manera más confiable a dichos parámetros.

1. 2. Azufre en granos de destilería

El contenido promedio de S total en 12 y 6 lotes de GD, elaborados por las plantas 1 y 2 respectivamente, fue similar al encontrado en el único reporte nacional (Brunetti *et al.*, 2015), pero con menor dispersión. El reporte de Brunetti *et al.* (2015) se refirió a GD provenientes de una sola planta industrial, diferente a las que originaron los GD

analizados en el presente trabajo. Por lo tanto, la mencionada diferencia en la variabilidad del contenido de S, puede deberse principalmente a diferencias entre los protocolos de elaboración aplicados por las plantas industriales en cuestión.

La reducida variabilidad observada en este trabajo, respecto del contenido de S entre los lotes de GD, es muy ventajosa, dado que permite una adaptación ruminal armoniosa de los animales desde su ingreso al EC, y la determinación de niveles de inclusión seguros y constantes en el tiempo (Crawford, 2007; Drewnosky *et al.*, 2014). No obstante, considerando el potencial de variación del contenido de S en estos subproductos, se requieren estudios más prolongados para caracterizar de manera más consistente a dicho parámetro.

1. 3. Nivel estimado de azufre dietético total

El S es un mineral necesario para la vida y el óptimo desempeño de los bovinos. Su requerimiento es del 0.15% de S total (% MS) para bovinos productores de carne (NRC, 2005). En el caso de bovinos consumiendo dietas con menos del 15% de forraje, tal como la mayoría de los que se encuentran en terminación a corral, el límite máximo sugerido respecto del riesgo de PEM, es de 0.3% (NRC, 2005). En el presente estudio solamente el 23% de las observaciones superaron dicho umbral, tanto en verano como en invierno, dado que la totalidad de dicha fracción de observaciones, coincidió con las dietas que incluyeron GD. A su vez, dentro de las dietas que incluyeron GD, el mayor contenido de S dietético se observó en el verano, debido a las mayores concentraciones de SO_4 en el agua de bebida, y al mayor consumo estimado de la misma en dicha estación del año.

A pesar de que la totalidad de las dietas que incluyeron GD superaron levemente el 0.3% de S total, no se comunicaron perjuicios productivo-sanitarios en los animales que las consumieron, al menos en los momentos de la realización de los muestreos. Esto coincide con los reportes de que con dietas compuestas de hasta 50% de GD, con al menos 6 a 7.5% de forraje, y con escaso S inorgánico adicional proveniente del agua de bebida, la incidencia esperable de PEM por exceso de S, es de alrededor del 0.14% o menor (Vaness *et al.*, 2009). Esto podría deberse a que una parte del S presente en GD, es aportado por PND, por lo que no es ruminalmente disponible para la producción de H_2S , el potencial mediador de los perjuicios (Drewnosky *et al.*, 2014).

No obstante, el estudio descriptivo incluyó algunos establecimientos con antecedentes de problemas tales como brotes de PEM, brotes de enfermedades neurológicas compatibles con PEM pero sin confirmación diagnóstica, o deficiente desempeño productivo, principalmente al inicio del período de engorde. En estos establecimientos, el suministro de GD no fue un factor común, pero en casi la totalidad de los mismos, se registraron más de 500 mg/l de SO_4 en el agua de bebida (Margineda, 2016 com. pers.; Castro *et al.*, 2018).

2. ESTUDIO EXPERIMENTAL

El presente trabajo tuvo por objetivo evaluar preliminarmente parámetros clínicos, productivos y ruminales en bovinos de EC bajo exceso de S dietético. Dicho exceso fue inducido mediante el suministro de la dieta AS, la cual presentó un nivel de S total, similar el que podría evidenciarse con la inclusión de GD, y el suministro de agua de bebida con aportes de S promedio según antecedentes de la región sudeste de Córdoba y sudoeste de Santa Fe. El estudio tuvo 38 días de duración, dado que aproximadamente los primeros 30 días de iniciado el consumo de la dieta de terminación con exceso de S, es el período donde se han evidenciado las máximas concentraciones de H_2S ruminal, frecuencias de ocurrencia de casos de PEM y evidencias de pérdidas productivas subclínicas (Loneragan *et al.*, 2001; Ritcher *et al.*, 2011; Drewnosky *et al.*, 2012; Drewnosky *et al.*, 2013). Vale destacar que la evaluación se realizó con una dieta de terminación, compuesta de 86% de concentrados, dado que con este tipo de dietas es donde se maximiza el riesgo de problemáticas productivo-sanitarias por exceso de S (Ritcher *et al.*, 2011).

2. 1. Parámetros clínicos y concentración de H₂S ruminal

En el presente estudio se observaron FR medias de 35 y 40 para los tratamientos BS y AS, respectivamente. La FR media de los animales del tratamiento BS excedió ligeramente al rango de referencia para bovinos (Radostits *et al.*, 2006), probablemente debido a que los animales utilizados fueron bovinos jóvenes (8 a 9 meses de edad en promedio). Si bien no se detectó un efecto significativo del nivel de S sobre el parámetro en cuestión, la tendencia de incremento de la FR con el tratamiento AS es compatible con la taquipnea reportada por algunos autores en bovinos consumiendo dietas con exceso S (Sager *et al.*, 1990; Gould *et al.*, 1997; Cunha *et al.*, 2008). Adicionalmente, se ha comprobado de manera consistente, que altas concentraciones sanguíneas de H₂S provocan hiperpnea en distintas especies animales, mediante la estimulación de quimiorreceptores ubicados en los cuerpos carotídeos (Beauchamp *et al.*, 1984).

Las cinéticas de concentración de H₂S ruminal observadas en el presente estudio, fueron similares a las reportadas por otros autores: mayor variabilidad en los animales consumiendo exceso de S, e interacción entre el día de muestreo y el nivel de S dietético (Cunha *et al.*, 2008; Ritcher *et al.*, 2011). Esta mayor variabilidad en la producción de H₂S ruminal en bovinos consumiendo exceso de S, es un fenómeno bien conocido, pero de causa desconocida.

Dado que aproximadamente los primeros 30 días de iniciado el consumo de la dieta de terminación con exceso de S, es el período donde se han evidenciado consistentemente las máximas concentraciones de H₂S ruminal (Loneragan *et al.*, 2001; Ritcher *et al.*, 2011; Drewnosky *et al.*, 2012; Drewnosky *et al.*, 2013), sería esperable que de haberse extendido el período experimental del presente estudio, la concentración máxima de H₂S se correspondiera o aproximara a la observada en el día 38.

Tal como se describió previamente, el exceso dietético de S es transformado en H₂S ruminal, que si supera concentraciones de 2000 ppm, puede incrementar el riesgo de PEM (Gould, 1998). Al día 38 del presente trabajo, los animales consumiendo la dieta AS presentaron una concentración promedio de 3000 ppm de H₂S ruminal, significativamente superior a 2000 ppm. Sin embargo, no se observaron alteraciones clínicas compatibles con PEM, tales como retardo o ausencia del reflejo de amenaza, alteraciones en la postura, el comportamiento y/o el sensorio. Esto podría deberse por un lado, a que la concentración media de H₂S excedió levemente a la mencionada

concentración umbral para el riesgo de PEM, conjuntamente a que en muchas situaciones se han observado concentraciones de hasta 6000 ppm, en animales que no presentaban signología clínica de dicha patología (Neville *et al.*, 2010; Felix *et al.*, 2011; Morine *et al.*, 2012). Adicionalmente, el reducido número de animales utilizados en el presente estudio, pudo implicar una potencia estadística relativamente reducida para detectar PEM, suceso que generalmente se presenta con baja prevalencia (Vaness *et al.*, 2009). Sin embargo, aun utilizando similares tamaños muestrales, se ha reproducido exitosamente dicha patología (Sager *et al.*, 1990; Gould *et al.*, 1991; Cumming *et al.*, 1995a; Gould *et al.*, 1997; Niles *et al.*, 2000; Cunha *et al.*, 2008), lo cual podría deberse a múltiples factores que a continuación se discuten.

En primer lugar vale destacar que en las reproducciones experimentales, el exceso de S dietético aplicado ha sido generalmente superior al del presente estudio (Cumming *et al.*, 1995a; Gould *et al.*, 1997; Niles *et al.*, 2000; Cunha *et al.*, 2008). En este sentido, el objetivo del presente trabajo no fue reproducir PEM, sino evaluar los efectos clínicos, productivos y ruminales de un exceso de S dietético total, que podría evidenciarse en la región geográfica que se estudió, en condiciones similares a las de campo.

Otro factor a considerar, es que la transición a las dietas concentradas es mucho más rápida en las reproducciones experimentales, con respecto a la transición más paulatina efectuada en el presente estudio. Así, se ha reproducido clínicamente la PEM utilizando niveles de S total levemente inferiores (Sager *et al.*, 1990) o similares (Gould *et al.*, 1991) al de la dieta AS del presente estudio, pero aplicando un protocolo de alimentación consistente en el pasaje de una dieta basada en forraje, a otra totalmente concentrada en tan solo 7 días. Esto podría tener efectos potenciadores de la producción de H₂S ruminal (Gould *et al.*, 1991) y/o privar al animal de una adaptación a la exposición a elevadas concentraciones de dicha sustancia. En este sentido, se ha observado que con adaptaciones más paulatinas, como las realizadas en condiciones de campo, las prevalencias de PEM han sido inferiores a las observadas en las reproducciones experimentales, aun con inferiores concentraciones máximas de H₂S ruminal en estas últimas. Así, en ensayos con idénticas condiciones a las de campo, Ritcher *et al.* (2011) y Drewnosky *et al.* (2012) reportaron promedios máximos de H₂S de alrededor de 4800 ppm, con una incidencia de PEM del 8.3 y 0 % respectivamente, mientras que Cunha *et al.* (2011) reportaron un promedio máximo de 3900 ppm de H₂S, con una incidencia de PEM del 17%, pero aplicando una acelerada

adaptación a la dieta basada en concentrados, correspondiente al protocolo de reproducción experimental descrito por Sager *et al.* (1990) y Gould *et al.* (1991).

Por otra parte, en el presente estudio se utilizó una dieta similar a las suministradas en condiciones de campo, mientras que en las reproducciones experimentales se han utilizado dietas carentes de fibra efectiva, con menor contenido de FDN y compuestas predominantemente por carbohidratos de mayor velocidad de degradación ruminal, tales como almidón y dextrosa (Sager *et al.*, 1990; Gould *et al.*, 1991; Cumming *et al.*, 1995a; Cunha *et al.*, 2008). Si bien no han reportado indicios de acidosis ruminal aguda, estas dietas destinadas a la reproducción experimental de PEM, podrían favorecer la caída del pH ruminal y/o las condiciones microbiológicamente más propicias para una mayor producción de H₂S (Gould *et al.*, 1991).

Finalmente, en el presente trabajo solo se evaluaron clínicamente los animales, y no fue posible detectar signología compatible con PEM. No se realizaron estudios patológicos en SNC, para evaluar la presencia de lesiones compatibles con dicha patología. Aunque no se pueda confirmar en este estudio, se han descrito hallazgos histopatológicos compatibles con PEM en animales consumiendo experimentalmente exceso de S, pero clínicamente normales (Olkowski *et al.*, 1992; Niles *et al.*, 2000; Cunha *et al.*, 2008).

Considerando todo lo anterior, y que los límites máximos de S respecto de riesgo de PEM (NRC, 2005) fueron establecidos con influencia de los resultados obtenidos en reproducciones experimentales, probablemente sea necesario el replanteo de dicho nivel, pero en condiciones de campo y considerando la forma química en la cual se suministra el S dietético.

Una de las hipótesis de este estudio fue que el exceso de S de la dieta AS, es riesgoso de inducir PEM en bovinos de EC. Esta hipótesis no pudo ser corroborada, a pesar de que se detectaron elevadas concentraciones de H₂S ruminal, compatibles con las previamente descritas como riesgosas de inducir PEM.

2. 2. Parámetros productivos

A pesar del nivel de H₂S ruminal significativamente mayor alcanzado con el tratamiento AS, no se observaron efectos del nivel de S dietético sobre el desempeño productivo. Estos hallazgos contrastan con lo propuesto por Loneragan *et al.* (2001) y Drewnosky *et al.* (2014), quienes concluyeron que la adición de S inorgánico, por encima de 0.2% de S dietético total, reduce el ADP y el CMS. Al menos parcialmente, esta diferencia de resultados podría estar influenciada por el reducido tamaño muestral utilizado en el presente trabajo. Sin embargo, también se dispone de información nacional respecto de la utilización de GD en dietas de EC, alcanzándose un máximo de 45% de inclusión, sin reportes de casos de PEM ni diferencias en el desempeño productivo respecto de grupos control sin GD (Bagues, 2016; Latimori *et al.*, 2017), a pesar de que la dieta con el 45% de GD resultó en alrededor del 0.4% de S dietético total (Latimori 2017, com. pers). Esta ausencia de efectos patológicos y productivos en bovinos consumiendo dietas con alto nivel de inclusión de GD, y por lo tanto con exceso de S total, podría deberse a que una parte del S presente en los GD no es inorgánico, sino que corresponde a PND (Klopfenstein *et al.*, 2008), inaccesible para su reducción a H₂S. Aun así, se ha reportado una interacción sinérgica entre la suplementación con GD y el consumo de agua de bebida con exceso de SO₄, sobre la producción de H₂S ruminal en bovinos de recría (López *et al.*, 2016). Lamentablemente, hasta el momento no se han realizado evaluaciones similares en condiciones de EC.

Es interesante analizar separadamente el contraste entre los resultados del presente estudio y las conclusiones emitidas por Loneragan *et al.* (2001), que también suministraron el S en forma de SO₄, pero diluido en el agua de bebida. Estos autores concluyeron que niveles de S dietético superiores a 0.2% produjeron un detrimento significativo de la CA, reducción en el consumo de agua, y una diferencia media de 480 g en el ADP durante el primer mes de encierre, entre tratamientos consistentes en 0.19 y 0.4% de S dietético total, equivalentes a los aplicados en el presente estudio. Si bien el tamaño muestral utilizado por dichos autores fue muy superior al utilizado en este ensayo, sus resultados también fueron muy diferentes. Este mayor perjuicio observado con el suministro del SO₄ en el agua de bebida, podría deberse a la reducción de su consumo por aversión (Sager, 2006), lo cual resultaría en una reducción del CMS adicional a la que podría evidenciarse únicamente por las altas

concentraciones de H₂S ruminal. Por otra parte, el menor ADP observado por Loneragan *et al.* (2001) podría explicarse por una deshidratación relativa, consecuente a la reducción del consumo de agua. Por todo lo anterior, y los resultados obtenidos en el presente trabajo, es probable que el efecto perjudicial del SO₄ en el agua sea primariamente mediado por el rechazo de la misma cuando los contiene en grandes cantidades, y secundariamente por el incremento del H₂S ruminal.

Con este contexto, probablemente sea necesario el replanteo del nivel de S umbral para la evidencia de efectos productivos subclínicos, y/o complementarlo con la explícita aclaración de la forma química y física en la cual se lo suministra, es decir, en el alimento sólido o en el agua de bebida.

La hipótesis del presente estudio fue que el nivel de S de la dieta AS es perjudicial para el desempeño productivo de los bovinos en EC. Si bien dicho nivel de S no tuvo efectos significativos sobre los parámetros productivos y clínicos evaluados, produjo elevadas concentraciones de H₂S ruminal. Por lo tanto, para responder consistentemente a dicha hipótesis, posiblemente se requiera realizar estudios a mayor escala, sobre el período completo de engorde, y replicando las condiciones de campo mediante el suministro GD y agua de bebida con exceso de SO₄.

2. 3. Ambiente ruminal, y concentración de bacterias totales y bacterias ruminales sulfo-reductoras desasimilatorias

A pesar de que el pH del líquido ruminal no fue afectado por el nivel de S dietético, los promedios observados en ambos tratamientos fueron superiores a lo esperable en bovinos consumiendo dietas de terminación en EC (Aello y Di Marco, 2013). Lo anterior se explica por la utilización del sondaje oro-esofágico para el muestreo de líquido ruminal. Esta metodología, induce diversos grados de contaminación con saliva del animal durante su ejecución, lo cual resulta en incrementos del pH del líquido ruminal así obtenido. Del mismo modo, las concentraciones de N-NH₃ ruminal no fueron afectadas por el nivel de S dietético, y los promedios observados en ambos tratamientos, fueron similares a los esperables para bovinos consumiendo dietas basadas en granos (Aello y Di Marco, 2013). El nivel de S dietético tampoco afectó las

concentraciones de protozoos, y los promedios observados en ambos tratamientos, estuvieron incluidos dentro del intervalo reportado en bovinos (Leng *et al.*, 1986; Mishima *et al.*, 2009; Hook *et al.*, 2011).

El H₂S ruminal es generado a partir del S²⁻ producido por BRS, que a su vez lo generan a partir de diversas fuentes de S dietético. Metabólicamente, dichas bacterias se dividen en dos subclases: las asimilatorias, que producen S²⁻ para la posterior síntesis de aminoácidos azufrados, y las desasimilatorias que lo producen como un desecho terminal de su respiración anaeróbica (Cumming *et al.*, 1995 a). Luego de alrededor de 15 a 35 días de comenzar la ingesta de exceso de S dietético, se producen las máximas concentraciones de H₂S. Las causas de esta mayor producción de H₂S no han sido completamente dilucidadas, pero se cree que asientan en alteraciones en las poblaciones de BRS (Drewnosky *et al.*, 2014).

En el presente trabajo se observó un efecto significativo del nivel S dietético sobre las concentraciones de H₂S ruminal, pero no sobre las concentraciones de BRSD. Estos resultados contrastan parcialmente con los emitidos por Ritcher *et al.* (2011), que hasta el momento han sido los únicos autores en estudiar *in vivo* este tipo de bacterias en bovinos. Dichos autores, usando qPCR e idénticos cebadores a los utilizados en el presente estudio, encontraron efectos significativos del nivel de S dietético sobre la concentración absoluta del G3 y BRSDT. Este contraste podría deberse a que la diferencia entre los niveles de S control y elevado utilizados por estos autores, fue de 0.3%, algo mayor a la diferencia del 0.2% utilizada en el presente estudio. Dicho contraste, también podría explicarse por diferencias en la dieta general, dado que dichos autores utilizaron GD. A pesar de estas diferencias, el presente estudio tiene mayor potencia estadística dado que, a idénticos tamaños muestrales (6 repeticiones en ambos estudios), en el trabajo de Ritcher *et al.* (2011) utilizaron un solo día de muestreo, mientras que en el presente se utilizaron los efectos de 3 días diferentes.

En el presente estudio tampoco se detectaron correlaciones significativas entre las concentraciones de H₂S y las de BRSD. Nuevamente esto contrasta parcialmente con los resultados de Ritcher *et al.* (2011) quienes encontraron una correlación significativa entre los mencionados parámetros. Estas diferencias podrían deberse, a que dichos autores evaluaron la asociación entre las concentraciones de BRSD y las de H₂S, considerando conjuntamente tanto a los animales del grupo control como a los del tratado. Por el contrario, en el presente trabajo se optó por evaluar la asociación entre dichos parámetros, discriminando según el nivel de S dietético y el día de muestreo,

dado que cada uno de estos grupos de observaciones, representan poblaciones diferentes. Los diagramas de dispersión expuestos en el presente estudio (“Apéndice de diagramas de dispersión”) respaldan la anterior aseveración estadística, y por lo tanto, al criterio utilizado.

Por todo lo anteriormente expuesto, los resultados del presente estudio sugieren que las concentraciones de BRSD no están asociadas a las de H₂S ruminal. Por lo tanto, es posible que las alteraciones ruminales responsables de los incrementos de H₂S, no sean basadas en cambios en las concentraciones de BRSD sino cambios metabólicos de las mismas. En este sentido, utilizando la “técnica del número más probable” para la cuantificación bacteriana por cultivo, Cumming *et al.* (1995a) no encontraron cambios en las concentraciones de BRS en líquido ruminal de bovinos con PEM experimentalmente inducida por exceso de S, respecto de animales control. Sin embargo, a partir de dichos aislamientos, estos autores observaron mayor capacidad de producción de H₂S *in vitro*. Teniendo en cuenta estos hallazgos, concluyeron que el incremento en la concentración ruminal de H₂S ante el exceso de S dietético, es producido por el incremento en la capacidad metabólica de las BSR, más que en el aumento de su concentración. Dicho aumento de la capacidad metabólica de las BRSD, podría deberse a la existencia de subtipos de enzimas sulfo-reductoras inducibles ante excesos de S ambiental, dotando a sus bacterias portadoras, de mayor capacidad de reducción de S sin cambios en la densidad de sus poblaciones (Cumming *et al.*, 1995a).

A pesar de la mención del estudio de Cumming *et al.* (1995a), vale destacar que las técnicas de cuantificación bacteriana por cultivo, no son las más adecuadas para la evaluación de poblaciones de bacterias en medios tan complejos como el ruminal. Esto se debe a que las condiciones de crecimiento *in vitro* suelen ser muy diferentes de las *in vivo*, sesgando los resultados de dichas técnicas, y limitando sus conclusiones (Spence *et al.*, 2008). Adicionalmente, las BRSD son organismos que requieren condiciones muy específicas de cultivo, lo que dificulta o imposibilita su aislamiento, introduciendo un sesgo adicional a los resultados de la cuantificación bacteriana por cultivo (Ritcher *et al.*, 2011). En este sentido, las modernas técnicas de biología molecular son capaces de superar dichos obstáculos, haciéndolas de elección para el estudio de la microbiota ruminal (Whitford, 1998). A pesar de lo anterior, estas herramientas se han explotado pobremente para la evaluación de las BSR.

Hasta el momento, los géneros de BRSD evaluados en el presente estudio son los más comúnmente aislados en rumen, y se los ha considerado como los principales

responsables de la producción de S^{2-} ruminal (Coleman, 1960; Howard y Hungate, 1976; Cumming *et al.*, 1995b). Sin embargo, podrían existir otros géneros y/o especies de BRSD que aún no han logrado ser identificadas (Cumming *et al.*, 1995b), y/o que probablemente no sean identificados por los cebadores utilizados en el presente trabajo.

Otra posible explicación, es que las BRSD no sean las únicas responsables del incremento de la concentración de H_2S ante el exceso de S dietético, sino que las BRS asimilatorias también desempeñen algún rol. Dado que estas bacterias producen S^{2-} para su posterior incorporación a la síntesis de aminoácidos, es posible que cambios transitorios en sus poblaciones y/o actividades metabólicas, contribuyan al menos parcialmente, a las variaciones de las concentraciones de H_2S ruminal (Gould, 2000).

2. 4. Consideraciones integradoras de los resultados y discusiones de los estudios descriptivo y experimental

El exceso de S dietético evaluado en el estudio experimental fue suministrado mediante la dieta AS. El nivel de S de esta dieta, sería el observado en el caso de una dieta estándar de EC, con un 30% de GD y el consumo de agua de bebida con 500 mg/l de SO_4 . Los contenidos asumidos de S en GD, y de SO_4 en el agua de bebida, para el cálculo del aporte de S total de la dieta AS, fueron definidos en base a los antecedentes de la región geográfica analizada en el estudio descriptivo. En este último, las concentraciones medias de S observadas en GD, fueron similares a la asumida para la elaboración del exceso de S de la dieta AS. Sin embargo, la mayoría de las concentraciones de SO_4 observadas en el agua de bebida, fueron inferiores a la asumida en la dieta AS (500 mg/l), y el 77% de las perforaciones muestreadas aportaba agua a bovinos que no consumían GD. En consecuencia, el nivel de S de la dieta AS sobreestimó al observado en la totalidad de los establecimientos de EC muestreados. Adicionalmente, el S agregado en la dieta AS fue totalmente aportado en forma inorgánica (SO_4Na_2), el cual se esperaba que fuera más perjudicial que las fuentes proteicas de S, tales como los GD (Drewnosky *et al.*, 2014). Aun así, en el estudio experimental, el exceso de S evaluado no produjo efectos significativos sobre ninguno de los parámetros estudiados, a excepción del incremento de la concentración H_2S ruminal. Si bien se requieren estudios adicionales, de manera preliminar puede

decirse que es poco probable que se observen casos clínicos de PEM, o deficiente desempeño productivo atribuibles a exceso de S dietético, en la mayoría de los EC de la región en estudio. Esto concuerda con lo observado a campo, dado que la mayoría de las situaciones problemáticas, se manifestaron con niveles de inclusión de GD superiores al 45% y/o con concentraciones de SO_4 en agua de bebida superiores a 500 mg/l (Margineda, C., com. pers., 2016; Descarga, C., com. pers., 2018; Castro *et al.*, 2018).

CONCLUSIONES

A excepción de elevar la concentración de H_2S ruminal, el exceso de S dietético evaluado en el estudio experimental no tiene efectos clínicos, productivos ni ruminales en bovinos de EC. En consecuencia, es poco probable que los niveles de S dietético estimados en la mayoría de los EC de la región estudiada, sean perjudiciales para la salud y desempeño animal. Sin embargo, dada la potencial variabilidad temporal del contenido de S en GD, y de SO_4 en el agua de bebida, es necesario continuar su evaluación, a fin de obtener una caracterización más confiable de dichos parámetros.

BIBLIOGRAFÍA

- AELLO, M.S.; DI MARCO, O. N. 2013. Curso de Nutrición Animal. Cátedra de Nutrición Animal. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Mar del Plata. pp 187-219.
- ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215(3). pp. 403-410.
- AMAT, S.; MCKINNON, J.J.; OLKOWSKI, A. A.; PENNER, G.B.; SIMKO, E.; SHAND, P.J.; HENDRICK, S. Understanding the role of sulfur-thiamine interaction in the pathogenesis of sulfur-induced polioencephalomalacia in beef cattle. *Res Vet Sci.* 95: 1081–1087.
- ARROQUY, J.; BERRUHET, F.; MARTINEZ FERRER, J.; PASINATO, A.; BRUNETTI, M. 2014. Uso de subproductos del destilado de granos en bovinos para carne. [en línea] <https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-inta_5_jornada_nacional_de_forrajes_conservados_-_u.pdf> [consulta: 10 diciembre 2018].
- AUGE, M. 2004. Regiones hidrogeológicas de la República Argentina. Provincias de Buenos Aires, Santa Fe y Mendoza. UBA, Buenos Aires, Argentina. pp. 97-105
- BAGUES, S. 2016. Utilización de granos de destilería húmedos con solutos en dietas de novillos a corral. Tesis de grado de para optar al título de Ingeniero Agrónomo. Universidad Nacional de Villa María Instituto A. P. Ciencias Básicas y Aplicadas. pp 1-13
- BAVERA, G. 2011. Aguas y aguadas para el ganado. En: El agua subterránea. Imberti-Bavera: Río Cuarto. Argentina, pp. 43-54.
- BEAUCHAMP, R. O. (Jr.); BUS, J.S.; POPP, J. A.; BOREIKO, C. J.; GJELKOVICH, D. A. 1984. A critical review of the literature on hydrogen sulfide. *Crit. Rev. Toxicol.* 13:25-97.
- BITESNIK, H. O. 1968. Descripción hidrogeológica de la región de Marcos Juárez (Provincias de Córdoba y Santa Fe). Instituto Nacional de Geología y Minería. Buenos Aires. Argentina. Boletín Nro. 115. pp. 17-18.
- BRADLEY, A. S.; LEAVITT, W. D.; JOHNSTON, D. T. 2011. Revisiting the dissimilatory sulfate reduction pathway. *Geobiology* 9:446-457.
- BRASCHE, C. J.; DREWNOSKI, M. E.; HANSEN, S. L. 2012. Effects of dietary sulfur source on ruminal pH and hydrogen sulfide of feedlot steers. *J. Anim. Sci.* 90 (E-Suppl. 2):132.
- BLARASIN, M.; CABRERA, A.; MATTEODA, E.; AGUIRRE, M.; FRONTERA, H.; MALDONADO, L.; BECHER QUINODOZ, F.; GIULIANO ALBO, J.; FELIZZIA, J.; PALACIO, D. 2014. Aspectos litológicos, hidráulicos, cambios de régimen y reservas de los principales acuíferos. En: Blarasin, M.; Cabrera A.; Matteoda,

E. Aguas subterráneas de la Provincia de Córdoba. 1a ed. – UniRio, Río Cuarto, Córdoba. pp. 11-80.

- BLARASIN, M.; CABRERA, A.; MATTEODA, E.; AGUIRRE, M.; GIULIANO ALBO, J.; BECHER QUINODOZ, F.; MALDONADO, L.; FELIZZIA, J.; PALACIO, D.; ECHEVARRÍA, K.; FRONTERA, H. 2014. Aspectos geoquímicos, isotópicos, contaminación y aptitudes de uso. En: Blarasin, M.; Cabrera A.; Matteoda, E. Aguas subterráneas de la Provincia de Córdoba. 1a ed. – UniRio, Río Cuarto, Córdoba. pp. 83-148.
- BRAGACHINI, M.; UZTARROZ, F.; BRAGACHINI, M.; MATHIER, D.; MENDEZ, J. 2014. Hacia sistemas ganaderos de precisión con valor agregado en origen Reflexiones y propuestas de cambios hacia un desarrollo sustentable de los territorios mediante el agregado de valor en origen. [en línea] INTA.EEA Manfredi. <https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-inta_hacia_sistemas_ganaderos_de_precisin_con_valor_a.pdf> [consulta: 12 diciembre 2018].
- BRUNETTI, M.A.; FROSSASCO, G.; MARTINEZ FERRER, J.; GAGGIOTTI, M.C. 2015. Caracterización de co-productos de la industria del etanol. Comunicación. Rev. Arg. de Prod. An. 1:259-322.
- BUCKNER, C. D.; MADER, T. L.; ERICKSON, G. E.; COLGAN, S. L.; MARK, D. R.; BREMNER, V. R.; KARGES, K. K.; GIBSON, M. L. 2008. Evaluation of dry distillers grains plus solubles 37 inclusion on performance and economics of finishing beef steers. Prof. Anim. Scient. 24:404-410.
- BUCKNER, C. D.; WILKEN, M. F.; BENTON, J. R.; VANNESS, S. J.; BREMER, V. R.; KLOPFENSTEIN, T. J.; KONONOFF, P. J.; ERICKSON, G. E. 2011. Nutrient variability for distillers grains plus soluble and dry matter determination of ethanol by-products. Prof. Anim. Scient. 27:57-64.
- BURGESS B.A. Polioencephalomalacia. 2008. Large Anim. Vet. 8(8): 1-6.
- CABRERA, A. 2009. Evolución hidrogeoquímica e isótopos ambientales del sistema acuífero asociado a los ambientes morfotectónicos de la falla regional Tigre Muerto. Córdoba. Argentina. Tesis Doctoral, Universidad Nacional de Río Cuarto (inédita), 372 p.
- CALLAWAY, T. R.; DOWD, S. E.; EDRINGTON, T. S.; ANDERSON, R. C.; KRUEGER, N.; BAUER, N.; KONONOFF, P. J.; NISBET, D. J. 2010. Evaluation of bacterial diversity in the rumen and feces of cattle fed different levels of dried distillers grains plus solubles using bacterial tagencoded FLX amplicon pyrosequencing. J. Anim. Sci. 88: 3977-3983.
- CANTÓN, G.J.; CSEH, S. B.; AMEIJERAS, J. R. 2006. Intoxicación de bovinos de engorde a corral por el consumo de agua de mala calidad en la provincia de Buenos Aires. 16ª Reunión Científico Técnica de la AAVLD, Mar del Plata. Libro Resúmenes. 141p.
- CASTRO, D. J.; MARGINEDA, C; CANTÓN, G. 2018. Polioencefalomalacia asociada a exceso de azufre dietético en bovinos de engorde a corral en provincia de Santa Fe. Reporte de un brote. Rev. Arg. Prod. Anim. 38 (Supl. 1): 9-31.

- CHANEY, A.L.; MARBACH, A.P. 1962. Modified reagents for determination of urea and ammonia. *Clin.Chem.* 8(2): 130-32.
- COLE, J.R.; WANG, Q.; FISH, J.A.; CHAI, B.; MCGARRELL, D.M.; SUN, Y.; BROWN, C.T.; PORRAS-ALFARO, A.; KUSKE, C.R.; TIEDJE, J.M. 2014. Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Research.* 42, D633-642.
- COLEMAN, G. S. 1960. A sulphate-reducing bacterium from the sheep rumen. *J. Gen. Microbiol.* 22:423-436.
- CRAWFORD, G. I. 2007. Managing sulfur concentrations in feed and water. 68th Minnesota Nutrition Conference. September 18-19. pp. 10-13.
- CUMMINGS, B. A.; CALDWELL, D. R.; GOULD, D. H.; HAMAR, D. W. 1995a. Identity and interactions of rumen microbes associated with dietary sulfate-induced polioencephalomalacia in cattle. *Am. J. Vet. Res.* 56:1384-1389.
- CUMMINGS, B. A.; CALDWELL, D. R.; GOULD, D. H.; HAMAR, D. W. 1995b. Ruminal microbial alterations associated with sulfide generation in steers with dietary sulfate-induced polioencephalomalacia. *Am. J. Vet. Res.* 56:1390-1395.
- CSEH, S. B.; CANTÓN, G. J.; NUÑEZ, M. M. 2006. Intoxicación natural de bovinos de cría por el consumo de agua de mala calidad en la provincia de Buenos Aires. 29º Congreso Argentino de Producción Animal. Mar del Plata. Argentina. pp. 16.
- DEMARCO, D. 2010. La producción de carne vacuna y el stock bovino: una relación de creciente deterioro. [en línea] <http://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/origenes_evolucion_y_estadisticas_de_la_q_anaderia/100-LaProducciondeCarneyelStock%20bovino.pdf> [consulta: 12 diciembre 2018].
- DI LORENZO N.; RUSSI, J. P. 2012. Subproductos en dietas de rumiantes. [en línea]. Márgenes Agropecuarios. <<http://www.roagro.com.ar/upload/infoprod/SubproductosendietasderumiantesPRussimayo2012.pdf>> [consulta: diciembre del 2016].
- DOUGHERTY, R. W.; COOK, H. M. 1962. Routes of eructated gas expulsion in cattle A quantitative study. *Am. J. Vet. Res.* 23:997-1000.
- DREWNOSKI, M. E.; RICHTER, E. L.; HANSEN, S. L. 2012. Dietary sulfur concentration affects rumen hydrogen sulfide concentrations in feedlot steers during transition and finishing. *J. Anim. Sci.* 90:4478-4486.
- DREWNOSKI, M. E.; HANSEN, S. L. 2013. Effect 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.E.; POGGE D.J.; HANSEN S.L. 2014. High-sulfur in beef cattle diets: a review. *J. Anim. Sci.* 92:3763-80
- ENSLEY, S. 2011. Biofuels coproducts tolerance and toxicology for ruminants. *Vet. Clin. Food. Anim.* 27:297-303.
- FERNÁNDEZ E.; BRAMBILLA, E. 2017. Manual del curso teórico práctico: Entrenamiento en técnicas de diagnóstico e interpretación de resultados. Laboratorio de Bioquímica Clínica Veterinaria. EEA INTA Balcarce. pp. 35-37.
- FILI, M.; TUJCHNEIDER, O.; D'ELIA, M.; PARIS, M.; PÉREZ, M. 2000. La influencia de las aguas subterráneas en el anegamiento de un sector de la llanura pampeana Argentina. 1º Congreso mundial integrado de aguas subterráneas. Fortaleza. Brasil. Vol 1. pp. 1-14.
- FRESINA, M. E. 2001. Comportamiento hidrogeológico-hidroquímico del acuífero pampeano en la Cuenca inferior del Río Carcaraña, Provincia de Santa Fe. Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. pp. 154-196.
- GALYEAN, M. L.; COLE, N. A.; BROWN, M. S.; MACDONALD, J. C.; PONCE, C. H.; SCHUTZ, J. S. 2012. Utilization of wet distillers grains in high-energy beef cattle diets based on processed grain. In: Makkar, Harinder P. S. Biofuel co-products as livestock feed Opportunities and challenges, Food and Agriculture Organization of the United Nations: Rome, Italy. pp. 61-76
- GIACOSA, R. H.; PAOLI, C. 2001. Balance hídrico y su relación con la evolución de niveles freáticos en un área de llanura de la República Argentina. En: Medina Sierra, A.; Carrera Ramierz, J.; Vives, L. (eds.). Las caras del agua subterránea. Instituto Geológico y Minero de España. pp. 233-240.
- GILGUN-SHERKI, Y.; MELAMED, E.; OFFEN, D. 2001. Oxidative stress induced-neurodegenerative diseases: the need for antioxidants that penetrate the blood brain barrier. *Neuropharmacology.* 40: 959–975.
- GIMENEZ, L. M. 2011. Calidad físico-química y toxicológica de agua para consumo de bovinos de cría en distintas regiones de Argentina. Tesis Licenciado en Producción animal. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Mar del Plata. Balcarce. Argentina. p. 96.
- GOONERATNE, S. R.; OLKOWSKI, A. A.; KLEMMER, R. G.; KESSLER, G. A.; CHRISTENSEN, D. A. 1989. High sulfur related thiamine deficiency in cattle: a field study. *Can. Vet. J.* 30:139-146.
- GOULD, D. H. 1998. Polioencephalomalacia. *J. Anim. Sci.* 76:309-314.
- GOULD, D. H.; CUMMINGS, B. A.; HAMAR, D. W. 1997. In vivo indicators of pathologic ruminal sulfide production in steers with diet-induced polioencephalomalacia. *J. Vet. Diagn. Invest.* 9:72–76

- GOULD, D. H.; MCALLISTER, M. M.; SAVAGE, J. C.; HAMAR, D. W. 1991. High sulfide concentrations in rumen fluid associated with nutritionally induced polioencephalomalacia in calves. *Am. J. Vet. Res.* 52:1164-1169.
- GOULD, D. H.; DARGATZ, D. A.; GARRY, F. B.; HAMER, D. W.; ROSS, P. F. 2002. Potentially hazardous sulfur conditions on beef cattle ranches in the United States. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 221:673-677.
- HANDELSMAN, J. 2004. Metagenomics: application of genomics to uncultured organisms. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68:669-685.
- HARMS, G.; LAYTON, A.C.; DIONISI, H.M.; GREGORY, I.R.; GARRETT, V.M.; HAWKINS, S.A.; ROBINSON, K.G.; SAYLER, G.S. 2003. Real-time PCR quantification of nitrifying bacteria in a municipal wastewater treatment plant. *Environ Sci Technol* 37, 343-351.
- HERRERO M. A.; MALDONADO MAY V. 2000. Calidad de aguas subterráneas. *Revista industria y química.* Vol.339:18-23.
- HOOK, S.E.; STEELE, M.A.; NORTHWOOD, K.S.; WRIGHT, A.D.; MCBRIDE, B.W. 2011. Impact of high-concentrate feeding and low ruminal pH on methanogens and protozoa in the rumen of dairy cows. *Microb Ecol.* 62(1):94-105
- HORNECK, D.A.; MILLER, R.O. 1998. Determination of total nitrogen in plant tissue. In: Kalra, Y.P. (ed.) *Handbook of reference methods for plant analysis.* CRC Press, pp 75-83.
- HOWARD, B. H.; HUNGATE, R. E. 1976. *Desulfovibrio* of the sheep rumen. *Appl. Environ. Microb.* 32:598-602.
- IRIONDO, M.H. 2012. Aguas subterráneas y superficiales de la provincia de Santa Fe (2ª. ed.). Museo Provincial de Ciencias Naturales "Fiorentino Ameghino". Santa Fe. Argentina. pp. 53-55.
- IVANCIC, J.; W. P. WEISS. 2001. Effect of dietary sulfur and selenium concentrations on selenium balance of lactating Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 84:225-232.
- KANDYLIS, K. 1984. Toxicology of sulfur in ruminants: review. *J. Dairy Sci.* 67: 2179-2187.
- JEFFREY M.; DUFF J.P.; HIGGINS R.J.; SIMPSON V.R.; JACKMAN R.; JONES T.O.; MECHIE S.C.; LIVERSEY C.T. 1994. Polioencephalomalacia associated with the ingestion of ammonium sulphate by sheep and cattle. *Vet. Rec.* 134:343-348.
- KOMARECK, A.R.; ROBERTSON, J.B.; VAN SOEST, P.J. 1993. A comparison of methods for determining ADF using the filter bag technique versus conventional filtration, *J Dairy Sci.* 77 (Supl. 1): 24-26
- KLOPFENSTEIN, T. J.; ERICKSON, G. E.; BREMER, V. R. 2008. Board invited review: Use of distillers by-products in the beef cattle feeding industry. *J. Anim. Sci.* 86:1223-1231.

- KNIGHT, C. W.; OLSON, K. C.; WRIGHT, C. L.; AUSTIN, K. J.; CAMMACK, K. M.; COCKRUM, R. 2008. Sulfur-induced polioencephalomalacia in roughage-fed feedlot steers administered high sulfur water. Proc. Western Section, American Society of Animal Science. 59:364-366.
- LATIMORI, N.; CARDUZA, F.; MERAYO, M.; SOTERAS, T.; GRIGIONI, G.; GARIS, M. 2017. Efectos de la incorporación de burlanda de maíz en la dieta de bovinos para carne. Ediciones. INTA Información para Extensión N° 19. [en línea] <<https://inta.gob.ar/documentos/efectos-de-la-incorporacion-de-burlanda-de-maiz-en-la-dieta-de-bovinos-para-carne>> [consulta: 12 diciembre 2018].
- LENG, R.A. 1986. Dynamics of large ciliate protozoa in the rumen of cattle fed on diets of freshly cut grass. Brit. J. Nut. 56:455-462
- LOERCH, S. C.; FLUHARTY, F. L.; MORROW, L. A.; METZGER, S. A.; FELIX, T. L. 2012. Effects of dietary sulfur on ruminal hydrogen sulfide concentrations over time. J. Anim. Sci. 90 (E. suppl):44-45.
- LONERAGAN, G. H.; WAGNER, J. J.; GOULD, D. H.; GARY, F. B.; THOREN, M. A. 2001. Effects of water sulfate on performance, water intake, and carcass characteristics of feedlot steers. J. Anim. Sci. 79:2941-2948.
- LONERAGAN, G. H.; GOULD, D. H.; CALLAN, R. J.; SIGURDSON, C. J.; HAMAR, D. W. 1998. Association of excess sulfur intake and an increase in hydrogen sulfide concentrations in the ruminal gas cap of recently weaned beef calves with polioencephalomalacia. J Am Vet Med Assoc. 213(11):1599-604, 1571
- LÓPEZ, A. 2012. Respiratory system, mediastinum and pleurae. In: Zachary, J.F.; McGavin, M. D. Pathologic basis of veterinary disease (5th. ed.). Elsevier. USA, pp.458-538.
- LONERAGAN, G.; GOULD, D.; WAGNER, J.; GARRY, F.; THOREN, M. 2005. The magnitude and patterns of ruminal hydrogen sulfide production, blood thiamin concentration, and mean pulmonary arterial pressure in feedlot steers consuming water of different sulfate concentrations. Bovine Pr. 39:16-22.
- LÓPEZ, A.; JUÁREZ SEQUEIRA, A.V.; FISSOLO, H.M.; CORONEL, F.A.; DILORENZO, N.; ARROQUY, J.I. 2016. Concentración de sulfuro de hidrógeno ruminal en terneras de recría bebiendo agua salada. Rev. Arg. Prod. Anim. 1 36 (Supl. 1): 189-293.
- LOW, J.C.; SCOTT, P.R.; HOWIE, F.; LEWIS, M.; FITZSIMONS, J.; SPENCE, J.A. 1996. Sulphur-induced polioencephalomalacia in lambs. Vet. Rec. 138:327-329.
- MENDES, L.C.N.; BORGES, A.S.; PEIRÓ, J.R.; FEITOSA, F.L.F.; ANHESINI, C.R. 2007. Estudo retrospectivo de 19 casos de polioencefalomalacia, em bovinos, responsivos ao tratamento com tiamina. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 59(1):239-241.

- MAGISTRETTI, P.J. 2008. Brain energy metabolism. In: Squire, L.R.; Berg, D.; Bloom, F.E.; du Lac, S.; Ghosh, A.; Spitzer, N.C. (eds.). *Fundamental neuroscience*. Academic Press, San Diego, CA. pp. 271–293.
- MCALLISTER, M. M.; GOULD, D. H.; RAISBECK, M. F.; CUMINGS, B. A.; LONERAGAN, G. S. 1997. Evaluation of ruminal sulfide concentrations and seasonal outbreaks of polioencephalomalacia in beef cattle in a feedlot. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 211:1275- 1729
- MINATEL, L.; BUFFARINI, M.A.; SCARLATA, E.F.; DALLORSO, M.E.; CARFAGNINI, J.C. 2004. Niveles de cobre, hierro, zinc y selenio de bovinos del noroeste de la Provincia de Buenos Aires. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 24: 225-235.
- MISHIMA, T.; KATAMOTO, H.; HORII, Y.; KAKENGI, V.A.M.; ITO, A. 2009. Rumen ciliates from Tanzanian short horn zebu cattle, *Bos taurus indicus*, and the infraciliature of *Entodinium palmare* and *Enoploplastron stokyi*. *Eur. J. Protistol.* 45: 77-86
- MORINE, S. J.; DREWNOSKI, M. E.; HANSEN, S. L. 2014. Determining the influence of dietary roughage concentration and source on ruminal parameters related to sulfur toxicity. *J. Anim. Sci.* 92(9):4068-76
- NEVILLE, B. W.; LARDY, G. P.; KARGES, K. K.; ECKERMAN, S. R.; BERG, P. T.; SCHAUER, C. S. 2012. Interaction of corn processing and distillers dried grains with solubles on health and performance of steers. *J. Anim. Sci.* 90:560-567.
- NICHOLS, C. A.; BREMER, V. R.; WATSON, A. K.; BUCKNER, C. D.; HARDING, J. L.; ERICKSON, G. E.; KLOPFENSTEIN, T. J.; SMITH, D. R. 2013. The effect of sulfur and use of ruminal available sulfur as a model to predict incidence of polioencephalomalacia in feedlot cattle. *Bovine Pr.* 47:47-53.
- NICHOLS, C. A.; BREMER, V. R.; WATSON, A. K.; BUCKNER, C. D.; HARDING, J. L.; SMITH, D. R.; ERICKSON, G. E.; KLOPFENSTEIN, T. J. 2012. Meta-analysis of the effect of dietary sulfur on feedlot health. University of Nebraska-Lincoln Beef Report. Paper 680. pp. 82-84.
- NILES, G. A. 2000. Sulfur induced polioencephalomalacia in weaned beef heifers eating corn gluten feed. Tesis Magister of science. Oklahoma State University. USA. pp. 48-50.
- NILES, G. 2002. The relationship between sulfur, thiamine and polioencephalomalacia a review. *Bovine Pr.* 36:93–99.
- NRC. 2000. Nutrient requirements of beef cattle, (7th. ed .rev.) National Academic Press, Washington, D.C. pp. 81-82.
- NRC. 2005. Mineral tolerance of animals. (2nd.ed rev). National. Academic. Press, Washington, D.C. pp. 372-379.
- OLKOWSKI, A. A.; GOONERATNE, S. R.; ROUSSEAU, C. G.; CHRISTENSEN, D. A. 1992. Role of thiamine status in sulphur induced polioencephalomalacia in sheep. *Res. Vet. Sci.* 52:78-85.

- PEREZ, M.; FILI, M.; TUJCHNEIDER, O.; D'ELIA, M.; PARIS, M. 2000. Planificación de la explotación de las aguas subterráneas en áreas urbanas de llanura. 1st Joint World Congress on Groundwater. Fortaleza. Brasil. [en línea] < <https://docplayer.es/97565822-Planificacion-de-la-explotacion-de-las-aguas-subterranas-en-areas-urbanas-de-llanura.html> > [consulta: 12 diciembre 2018].
- PINHEIRO, J.C.; BATES, D.M. 2000. Mixed-Effects Models in S and S-PLUS. Springer. New York. USA. pp. 133-187.
- POGGE, D. J.; DREWNOSKI, M. E.; HANSEN, S. L. 2014a. High dietary S decreases the retention of copper, manganese, and zinc in steers. *J. Anim. Sci.*; 92(5):2182-91.
- POSTMA G. C.; MINATEL L.; CARFAGNINI, J.C. 2010. Deficiencia de Cobre en bovinos en pastoreo de la Argentina. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 30(2):189-198.
- QI, K.; OWENS, F. N.; LU, C. D. 1994. Effects of sulfur deficiency on performance of fiber producing sheep and goats: a review. *Small Rum. Res.* 14:115-126.
- RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C.; HINCHCLIFF, K.W.; CONSTABLE, P.D. 2006. *Veterinary medicine: a textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs, and goats.* 10th ed. Saunders Elsevier, Edinburgh, pp.2006-2012.
- RAMMELL, C. G.; HILL, J. H. 1986. A review of thiamine deficiency and its diagnosis, especially in ruminants. *N. Z. Vet. J.* 34: 202-204.
- RICHTER, E. L.; DREWNOSKI, M. E.; HANSEN, S. L. 2011. The effect of dietary sulfur on performance, mineral status, rumen hydrogen sulfide, and rumen microbial populations in yearling beef steers. *J. Anim. Sci.* 90:3945–3953
- RICHTER, E. L.; DREWNOSKI, M. E.; HANSEN, S. L. 2012. The effect of dietary sulfur on beef steer mineral status, performance, and meat fatty acid composition. *J. Anim. Sci.* 90:3945–3953.
- RIET-CORREA, F.; RIVERO, R.; DUTRA, F.; LEMOS, R.A.A.; EASTON, C. 2007. Polioencephalomalacia. 35^a Jornadas Uruguayas de Buiatría. pp. 191-198.
- ROUSSEAU, C.G.; OLKOWSKI, A.A.; CHAUVET, A. 1991: Ovine polioencephalomalacia associated with dietary sulphur intake. *J Vet Med A* 38:229-239.
- ROSSANIGO, C.; ARANO, A.; RODRÍGUEZ VÁZQUEZ, G. 2010. Stock 2010 del ganado bovino. Mapas de Existencias e indicadores ganaderos. INTA-SENASA-RIAN Ganadera.16p.
- SAGER, R. L.; HAMAR, D. W.; GOULD, D. H. 1990. Clinical and biochemical alterations in calves with nutritionally induced polioencephalomalacia. *Am. J. Vet. Res.* 51:1969–1974.
- SAGER, R. L. 2000. Agua para bebida de bovinos. INTA E.E.A San Luis. Serie Técnica N° 126. 4p.

- SAGER, R. L. 2006. El agua de bebida para bovinos en San Luis. [en línea] EEA INTA San Luis. Argentina. Informativo Rural. 2 (7) http://www.produccion-animal.com.ar/agua_bebida/85-agua_san_luis.pdf [consulta: 11 diciembre 2018]
- SAGER, R. L. 2008. Calidad de agua de bebida. Conferencia en el “Simposio sobre gestión y utilización del agua” en el 31º Congreso Argentino de Producción Animal. Potrero de los Funes. San Luis. [en línea] <<https://www.researchgate.net/publication/265011992>> [consulta: 11 diciembre 2018]
- SARTURI, J. O.; ERICKSON, G. E.; KLOPFENSTEIN, T. J.; ROLFE, K. M.; BUCKNER, C. D.; LUEBBE, M. K. 2013. 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.
- SCHOONMAKER, J.P.; BEITZ, D. C. 2012. Hydrogen sulphide: synthesis, physiological roles and pathology associated with feeding cattle maize co-products of the ethanol industry. In: *Biofuel co-products as livestock feed: opportunities and challenges*, FAO: Rome, Italy. pp. 101-114
- SENASA 2016. Establecimientos de engorde a corral: informe de la faena de bovinos 2008-2016. Informe de la faena de bovinos procedentes de establecimientos de engorde a corral. Dirección de Programación Sanitaria Dirección Nacional de Sanidad Animal. [en línea] <<https://www.senasa.gob.ar/sites/default/files/feedlots-faena2015b.pdf>> [consulta: 11 diciembre 2018].
- SHURSON, G. C. 2018. Yeast and yeast derivatives in feed additives and ingredients: Sources, characteristics, animal responses, and quantification methods. *Anim. Feed Sci. Technol.* 235: 60–76.
- SINGH, K. M.; PANDYA, P. R.; TRIPATHI, A. K.; PATEL, G. R.; PARNERKAR, S.; KOTHARI, R. K.; JOSHI, C. G. 2014. Study of rumen metagenome community using qPCR under different diets. *Meta Gene*; 2:191-199.
- SPEARS, J. W.; BURNS, J. C.; HATCH, P. A. 1985. Sulfur fertilization of cool season grasses and effect on utilization of minerals, nitrogen, and fiber in steers. *J. Dairy Sci.* 68:347-355.
- SPEARS, J. W. 2003. Trace mineral bioavailability in ruminants. *J. Nutr.* 133:1506S–1509S
- SPEARS J. W.; LLOYD, K. E.; FRY, R. S. 2011. Tolerance of cattle to increased dietary sulfur and effect of dietary cation-anion balance. *J. Anim. Sci.* 89:2502-2509.
- SPENCE, C.; WHITEHEAD, T. R.; COTTA, M. A. 2008. Development and comparison of SYBR Green quantitative real-time PCR assays for detection and enumeration of sulfatereducing bacteria in stored swine manure. *J. Appl. Microbiol.* 105: 2143-2152.
- SUTTLE, N. F. 1975. The role of organic sulphur in the copper-molybdenum-S interrelationship in ruminant nutrition. *Br. J. Nutr.* 34:411-420.

- SUTTLE, N. F. 1991. The interactions between copper, molybdenum, and sulphur in ruminant nutrition. *Annu. Rev. Nutr.* 11:121-140.
- THOMPSON, L. H.; WISE, M. B.; HARVEY, R. W.; BARRICK, E. R. 1972. Starch, urea and sulfur in beef cattle rations. *J. Anim. Sci.* 35: 474-480.
- TOWNE, G.; NAGARAJA, T. G.; BRANDT, R. T.; KEMP, K. E. 1990. Dynamics of ruminal ciliated protozoa in feedlot cattle. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 3174-3178.
- TRUONG, D. H.; EGHBAL, M. A.; HINDMARSH, W.; ROTH, S. H.; O'BRIEN, P. J. 2006. Molecular mechanisms of hydrogen sulfide toxicity. *Drug Metab. Rev.* 38:733-774.
- UWITUZE, S.; PARSON, G. L.; SCHNEIDER, C. J.; KARGES, K. K.; GIBSON, M. L.; HOLLIS, L. C.; HIGGINS, J. J.; DROUILLARD, J. S. 2011. Evaluation of sulfur content of dried distillers grains with solubles in finishing diets based on steam-flaked corn or dry-rolled corn. *J. Anim. Sci.* 89:2582-2591.
- VAN SOEST, P.J. 1994. *Nutritional ecology of the ruminant.* Cornell University Press. Ithaca, Nueva York. pp. 476.
- ZINN, R. A.; ALVAREZ, E.; MENDEZ, M.; MONTAÑO, M.; RAMIREZ, E.; SHEN, Y. 1997. Influence of dietary sulfur concentration on growth performance and digestive function in feedlot cattle. *J. Anim. Sci.* 75:1723-1728.
- ZINN, R. A.; ALVAREZ, E.; M.; MONTAÑO, M.; RAMIREZ, E. 1999. Toxic effects of high dietary sulfur on growth performance of feedlot calves during the early growing phase. *J. Anim. Sci.* 77 (Suppl. 1): 115. (Abstr.)

APÉNDICE DE TABLAS

Tabla I. Promedios y desvíos estándar de pH en líquido ruminal de bovinos de engorde a corral consumiendo las dietas AS (alto azufre) y BS (bajo azufre) según días de muestreo

pH Tratamiento	Días de muestreo			Total
	0	22	38	
AS	6.8 ± 0.47	6.8 ± 0.17	6.6 ± 0.26	6.74 ± 0.30 a
BS	6.6 ± 0.34	6.8 ± 0.18	6.9 ± 0.15	6.75 ± 0.30 a
Total	6.7 ± 0.40 a	6.8 ± 0.20 a	6.8 ± 0.20 a	

Letras iguales en la misma fila o columna, indican ausencia de diferencias significativas entre las medias ($p > 0,05$).

Tabla II. Promedios y desvíos estándar de concentraciones de N-NH₃ (nitrógeno amoniacal) en líquido ruminal de bovinos de engorde a corral consumiendo las dietas AS (alto azufre) y BS (bajo azufre) según días de muestreo

N-NH ₃ Tratamiento	Días de muestreo			Total
	0	22	38	
AS	10.9 ± 5.6	12.6 ± 7.4	16.1 ± 4.9	13.2 ± 6.1 a
BS	10.1 ± 3.0	9.6 ± 3.4	13.1 ± 6.8	10.9 ± 4.7 a
Total	10.5 ± 4.3 a	11.1 ± 5.7 ab	14.6 ± 5.9 b	

Letras iguales en la misma fila o columna, indican ausencia de diferencias significativas entre medias ($p > 0.05$).

Tabla III. Promedios y desvíos estándar de concentraciones de protozoos (células/ml) en líquido ruminal de bovinos de engorde a corral consumiendo las dietas AS (alto azufre) y BS (bajo azufre) según días de muestreo

Protozoos Tratamiento	Días de muestreo			Total
	0	22	38	
AS	2.9E+05 ± 3.6E+05	1.6E+05 ± 2.4E+05	1.6E+05 ± 2.4E+05	2.1E+05 ± 2.8E+05 a
BS	2.8E+05 ± 3.7E+05	5.6E+04 ± 7.0E+04	1.2E+05 ± 1.4E+05	1.5E+05 ± 2.4E+05 a
Total	2.8E+05 ± 3.5E+05 a	1.1E+05 ± 1.8E+05 a	1.4E+05 ± 1.9E+05 a	

Letras iguales en la misma fila o columna, indican ausencia de diferencias significativas entre medias ($p>0.05$).

Tabla IV. Promedios y desvíos estándar de concentraciones de BT (copias / g de contenido ruminal de bacterias totales,) en líquido ruminal de bovinos de engorde a corral consumiendo las dietas AS (alto azufre) y BS (bajo azufre) según días de muestreo

BT Tratamiento	Días de muestreo			Total
	0	22	38	
AS	1.6E+11 ± 1.0E+11	2.1E+11 ± 7.8E+10	1.5E+11 ± 4.3E+10	1.7E+11 ± 7.9E+10 a
BS	7.2E+10 ± 2.3E+10	2.5E+11 ± 1.2E+11	1.8E+11 ± 2.6E+10	1.7E+11 ± 1.0E+11 a
Total	1.1E+11 ± 8.3E+10 a	2.3E+11 ± 1.0E+11 b	1.6E+11 ± 3.8E+10 ab	

Letras iguales en la misma fila o columna, indican ausencia de diferencias significativas entre medias ($p>0.05$).

Tabla V. Promedios y desvíos estándar de concentraciones de G1 (copias / g de contenido ruminal de bacterias del grupo 1) en líquido ruminal de bovinos de engorde a corral consumiendo las dietas AS (alto azufre) y BS (bajo azufre) según días de muestreo

G1 Tratamiento	Días de muestreo			Total
	0	22	38	
AS	4.8E+08 ± 5.0E+08	5.6E+08 ± 5.3E+08	1.4E+09 ± 1.5E+09	8.0E+08 ± 1.0E+09 a
BS	5.1E+08 ± 7.5E+08	7.9E+08 ± 6.6E+08	4.0E+08 ± 3.1E+08	5.7E+08 ± 5.9E+08 a
Total	4.9E+08 ± 6.1E+08 a	6.7E+08 ± 5.8E+08 a	8.9E+08 ± 1.2E+09 a	

Letras iguales en la misma fila o columna, indican ausencia de diferencias significativas entre medias ($p > 0.05$).

Tabla VI. Promedios y desvíos estándar de las concentraciones de G2 (copias / g de contenido ruminal, de bacterias del grupo 2) en líquido ruminal de bovinos de engorde a corral consumiendo las dietas AS (alto azufre) y BS (bajo azufre) según días de muestreo

G2 Tratamiento	Días de muestreo			Total
	0	22	38	
AS	1.1E+06 ± 8.1E+05	8.1E+06 ± 6.5E+06	1.2E+07 ± 1.4E+07	7.1E+06 ± 9.5E+06 a
BS	1.8E+06 ± 1.0E+06	9.5E+06 ± 8.1E+06	9.6E+06 ± 6.3E+06	6.9E+06 ± 6.8E+06 a
Total	1.4E+06 ± 9.4E+05 a	8.8E+06 ± 7.0E+06 b	1.1E+07 ± 1.0E+07 b	

Letras iguales en la misma columna, indican ausencia de diferencias significativas entre tratamientos ($p > 0.05$). Letras diferentes en la misma fila, indican diferencias significativas entre días de muestreo ($p < 0.05$).

Tabla VII. Promedios y desvíos estándar de las concentraciones de G3 (copias / g de contenido ruminal, de bacterias del grupo 3) en líquido ruminal de bovinos de engorde a corral consumiendo las dietas AS (alto azufre) y BS (bajo azufre) según días de muestreo

G3 Tratamiento	Días de muestreo			Total
	0	22	38	
AS	2.9E+06 ± 3.0E+06	2.1E+07 ± 2.1E+07	3.7E+07 ± 3.5E+07	2.0E+07 ± 2.6E+07 a
BS	1.4E+06 ± 1.1E+06	3.2E+07 ± 6.6E+07	1.5E+07 ± 9.2E+06	1.6E+07 ± 3.8E+07 a
Total	2.1E+06 ± 2.3E+06 a	2.6E+07 ± 4.7E+07 ab	2.6E+07 ± 2.7E+07 b	

Letras iguales en la misma columna, indican ausencia de diferencias significativas entre tratamientos ($p > 0.05$). Letras diferentes en la misma fila, indican diferencias significativas entre días de muestreo ($p < 0.05$).

Tabla VIII. Promedios y desvíos estándar de las concentraciones de BRSDT (copias / g de contenido ruminal, de bacterias ruminales sulfo-reductoras desasimilatorias totales) en líquido ruminal de bovinos de engorde a corral consumiendo las dietas AS (alto azufre) y BS (bajo azufre) según días de muestreo

BRSDT Tratamiento	Días de muestreo			Total
	0	22	38	
AS	4.8E+08 ± 5.0E+08	5.9E+08 ± 5.4E+08	1.4E+09 ± 1.6E+09	8.3E+08 ± 1.0E+09 a
BS	5.1E+08 ± 7.5E+08	8.3E+08 ± 6.6E+08	4.2E+08 ± 3.1E+08	5.9E+08 ± 6.0E+08 a
Total	5.0E+08 ± 6.1E+08 a	7.1E+08 ± 5.9E+08 a	9.2E+08 ± 1.2E+09 a	

Letras iguales en la misma fila o columna, indican ausencia de diferencias significativas entre las medias ($p > 0.05$).

Tabla IX. Promedios y desvíos estándar de G1P (% de bacterias del grupo 1 respecto de bacterias totales) en líquido ruminal de bovinos de engorde a corral consumiendo las dietas AS (alto azufre) y BS (bajo azufre) según días de muestreo

G1P Tratamiento	Días de muestreo			Total
	0	22	38	
AS	0.27 ± 0.20	0.28 ± 0.22	1.11 ± 1.35	0.56 ± 0.85 a
BS	0.59 ± 0.82	0.41 ± 0.47	0.21 ± 0.15	0.41 ± 0.54 a
Total	0.43 ± 0.59 a	0.35 ± 0.36 a	0.66 ± 1.03 a	

Letras iguales en la misma fila o columna, indican ausencia de diferencias significativas entre las medias ($p > 0.05$).

Tabla X. Promedios y desvíos estándar de G2P (% de bacterias del grupo 2 respecto de bacterias totales) en líquido ruminal de bovinos de engorde a corral consumiendo las dietas AS (alto azufre) y BS (bajo azufre) según días de muestreo

G2P Tratamiento	Días de muestreo			Total
	0	22	38	
AS	0.001 ± 0.000	0.004 ± 0.003	0.009 ± 0.001	0.004 ± 0.007 a
BS	0.002 ± 0.001	0.006 ± 0.007	0.005 ± 0.004	0.005 ± 0.005 a
Total	0.002 ± 0.001 a	0.005 ± 0.006 a	0.007 ± 0.007 a	

Letras iguales en la misma fila o columna, indican ausencia de diferencias significativas entre las medias ($p > 0.05$).

Tabla XI. Promedios y desvíos estándar de G3P (% de bacterias del grupo 3 respecto de bacterias totales) en líquido ruminal de bovinos de engorde a corral consumiendo las dietas AS (alto azufre) y BS (bajo azufre) según días de muestreo

G3P Tratamiento	Días de muestreo			Total
	0	22	38	
AS	0.0018 (0.001)	0.0080 (0.007)	0.0251 (0.024)	0.0116(0.017) a
BS	0.0022 (0.002)	0.0091 (0.016)	0.0079 (0.004)	0.0064 (0.01) a
Total	0.0020 (0.002) a	0.0086 (0.012) ab	0.0165 (0.019) b	

Letras iguales en la misma columna, indican ausencia de diferencias significativas entre tratamientos ($p>0.05$). Letras diferentes en la misma fila, indican diferencias significativas entre días de muestreo ($p<0.05$).

Tabla XII. Promedios y desvíos estándar de BRSDTP (% de bacterias ruminales sulfuro-reductoras desasimilatorias totales respecto de bacterias totales) en líquido ruminal de bovinos de engorde a corral consumiendo las dietas AS (alto azufre) y BS (bajo azufre) según días de muestreo

BRSDTP Tratamiento	Días de muestreo			Total
	0	22	38	
AS	0.28 ± 0.20	0.29 ± 0.22	1.15 ± 1.36	0.57 ± 0.86 a
BS	0.60 ± 0.82	0.43 ± 0.47	0.23 ± 0.15	0.42 ± 0.54 a
Total	0.44 ± 0.60 a	0.36 ± 0.36 a	0.69 ± 1.04 a	

Letras iguales en la misma fila o columna, indican ausencia de diferencias significativas entre las medias ($p>0.05$).

Tabla XVIII. Promedios y desvíos estándar de % de acetato (referido a la concentración de AGVs totales) en líquido ruminal de bovinos de engorde a corral consumiendo las dietas AS (alto azufre) y BS (bajo azufre) según días de muestreo

% acetato Tratamiento	Días de muestreo			Total
	0	22	38	
AS	56.1 ± 12.6	59.5 ± 10.3	57.0 ± 8.3	57.6 ± 10.0 a
BS	59.1 ± 4.0	62.5 ± 4.8	58.9 ± 6.4	60.2 ± 5.1 a
Total	57.6 ± 9.1 a	61.0 ± 7.8 a	58.0 ± 7.1 a	

Letras iguales en la misma fila o columna, indican ausencia de diferencias significativas entre las medias ($p>0.05$).

Tabla XIX. Promedios y desvíos estándar de % de propionato (referido a concentración de AGVs totales) en líquido ruminal de bovinos de engorde a corral consumiendo las dietas AS (alto azufre) y BS (bajo azufre) según días de muestreo

% propionato Tratamiento	Días de muestreo			Total
	0	22	38	
AS	34.4 ± 13.1	33.5 ± 9.3	34.3 ± 6.9	34.1 ± 9.5 a
BS	33.7 ± 5.6	27.6 ± 2.6	30.3 ± 7.8	30.5 ± 6.0 a
Total	34.0 ± 9.6 a	30.5 ± 7.2 a	32.3 ± 7.3 a	

Letras iguales en la misma fila o columna, indican ausencia de diferencias significativas entre las medias ($p > 0.05$).

Tabla XV. Promedios y desvíos estándar del % de butirato (referido a concentración de AGVs totales) en líquido ruminal de bovinos de engorde a corral consumiendo las dietas AS (alto azufre) y BS (bajo azufre) según días de muestreo

% butirato Tratamiento	Días de muestreo			Total
	0	22	38	
AS	9.5 ± 4.8	7.0 ± 3.7	8.6 ± 2.8	8.4 ± 3.7 a
BS	7.2 ± 2.8	10.0 ± 4.2	10.8 ± 2.0	9.3 ± 3.3 a
Total	8.4 ± 3.9 a	8.5 ± 4.1 a	9.7 ± 2.5 a	

Letras iguales en la misma fila o columna, indican ausencia de diferencias significativas entre las medias ($p > 0.05$).

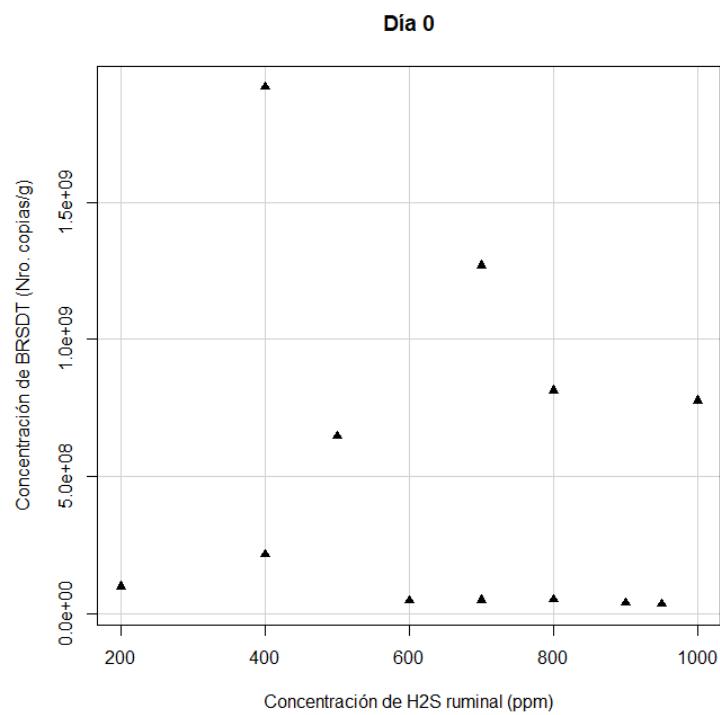
Tabla XVI. Promedios y desvíos estándar del cociente acetato/propionato en líquido ruminal de bovinos de engorde a corral consumiendo las dietas AS (alto azufre) y BS (bajo azufre) según días de muestreo

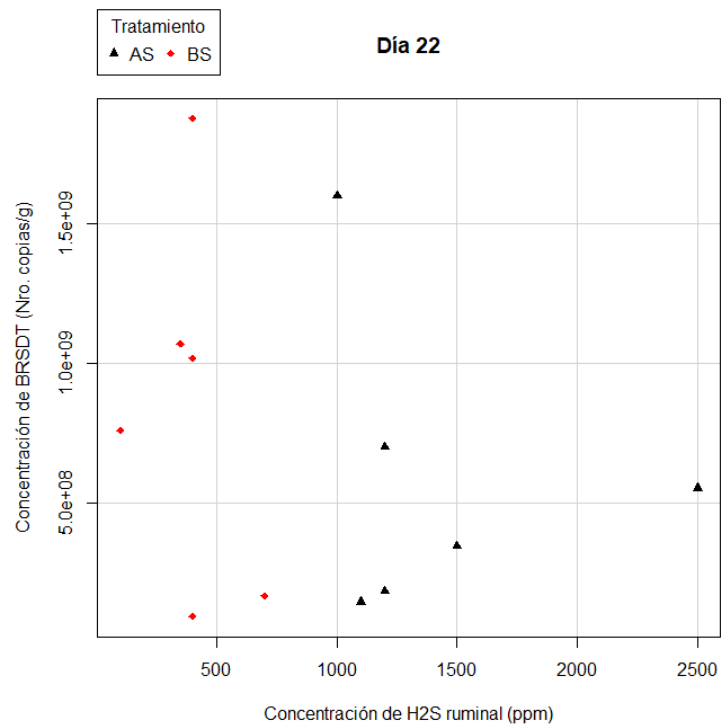
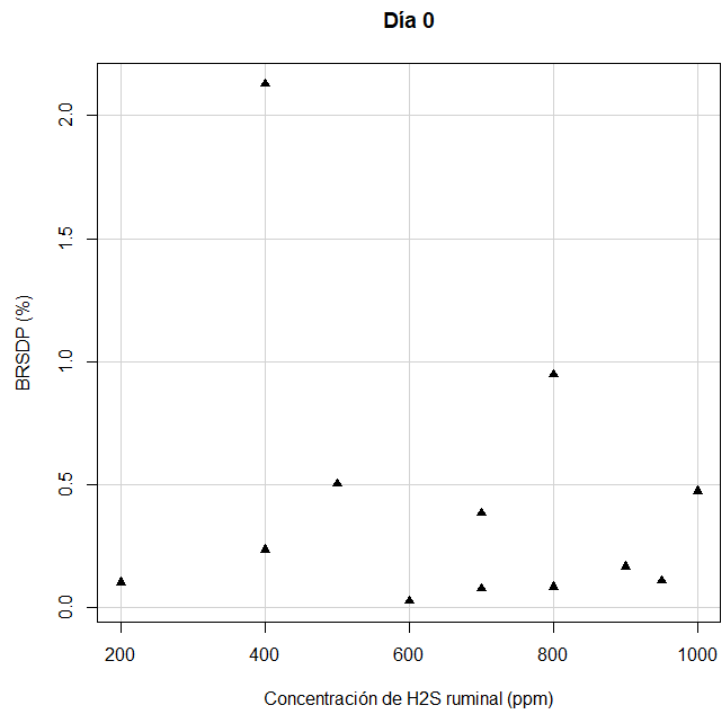
A/P Tratamiento	Días de muestreo			Total
	0	22	38	
AS	1.97 ± 1.20	2.08 ± 1.44	1.77 ± 0.57	1.94 ± 1.07 a
BS	1.82 ± 0.44	2.27 ± 0.37	2.10 ± 0.76	2.06 ± 0.55 a
Total	1.89 ± 0.86 a	2.18 ± 1.01 a	1.93 ± 0.66 a	

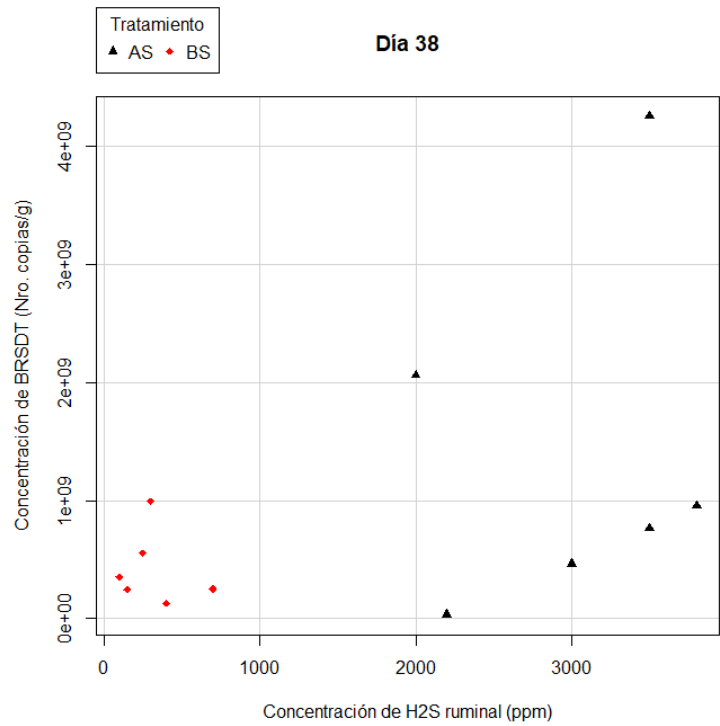
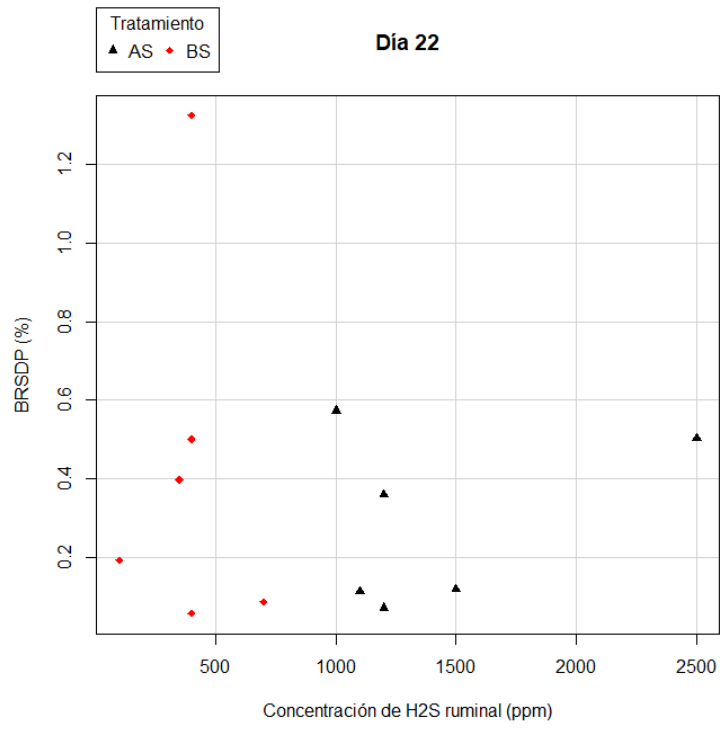
Letras iguales en la misma fila o columna, indican ausencia de diferencias significativas entre las medias ($p > 0.05$).

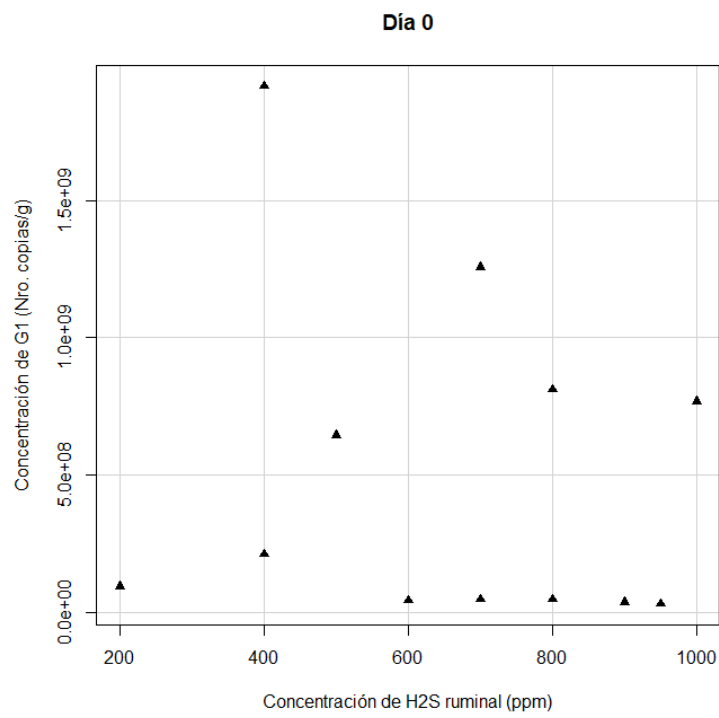
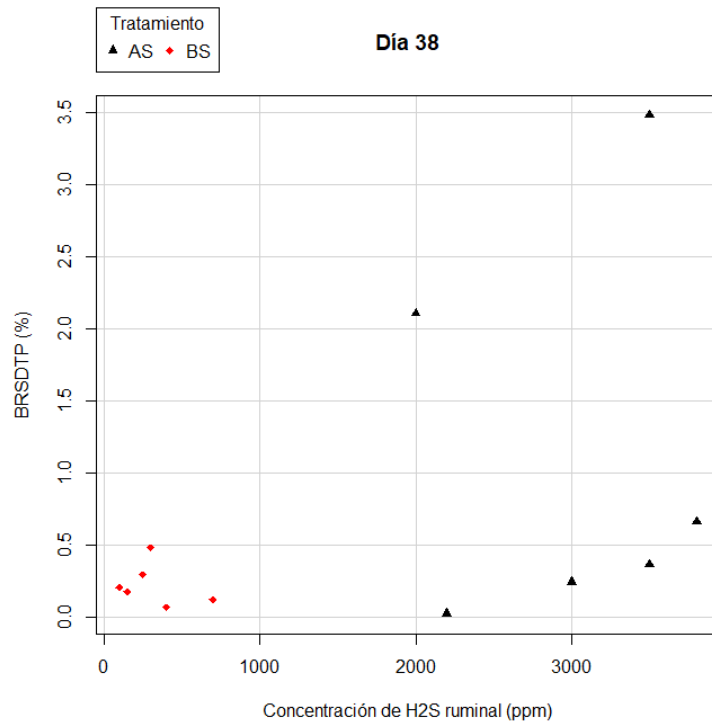
APÉNDICE DE GRÁFICOS

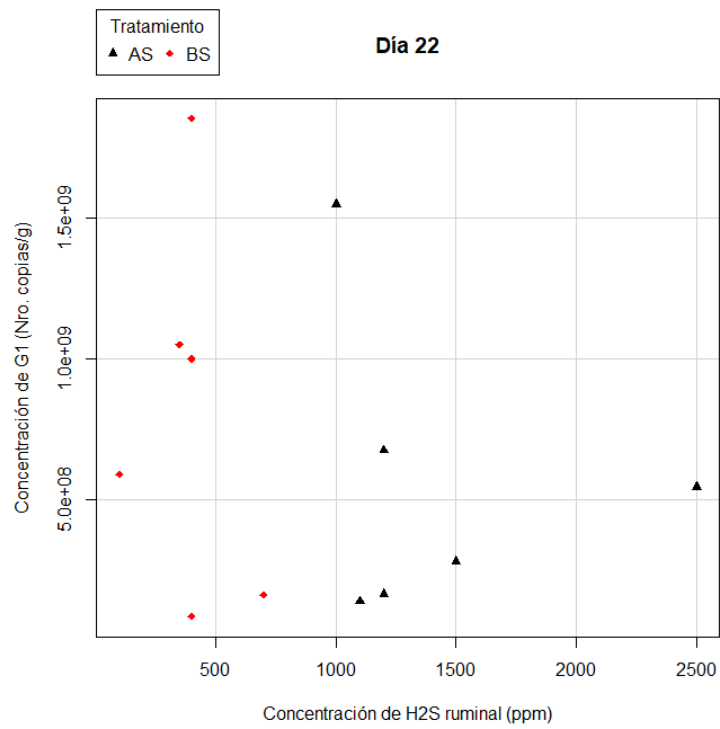
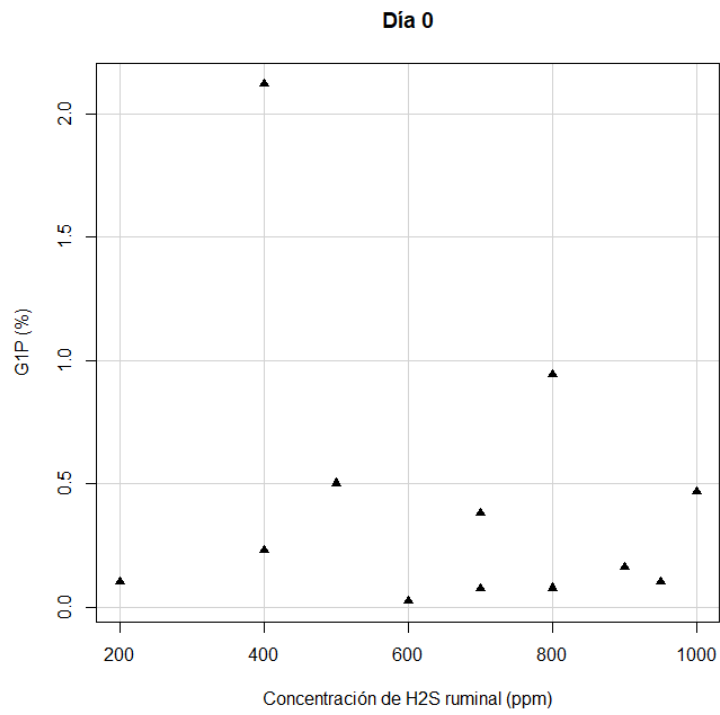
Diagramas de dispersión de concentraciones absolutas (Nro. de copias/g de MS de líquido ruminal) y relativas (% de bacterias totales) de BRSD (bacterias ruminales sulfo-reductoras desasimilatorias), en función de la concentración ruminal de H₂S (ppm) según días de muestreo.

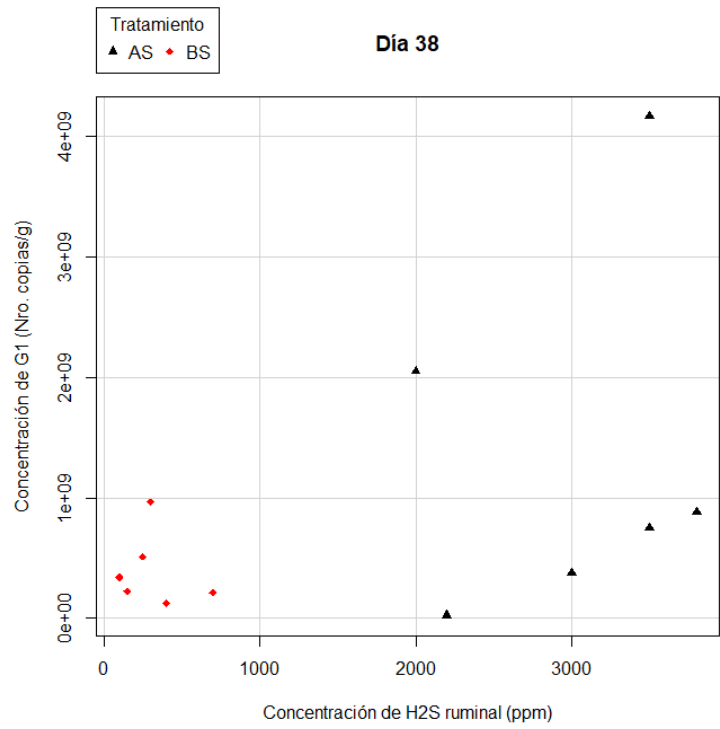
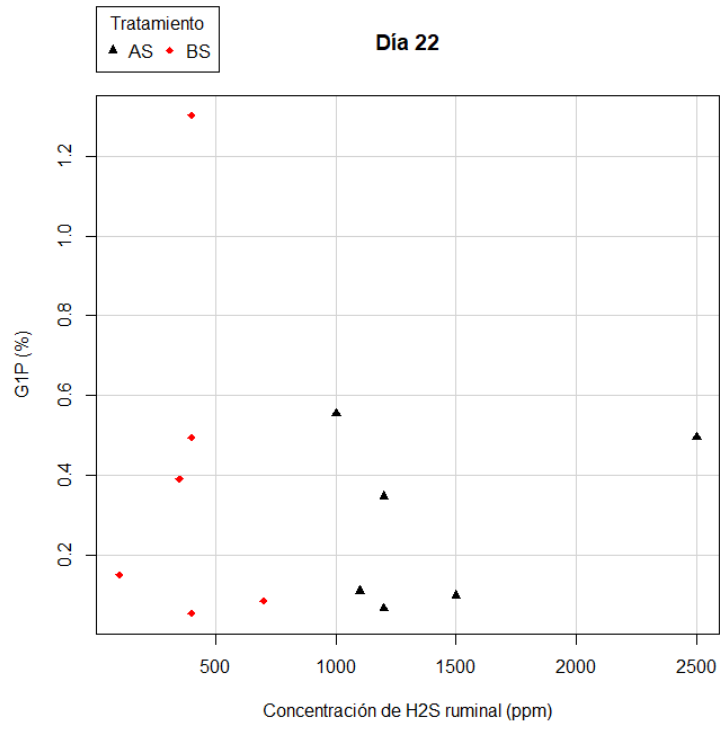


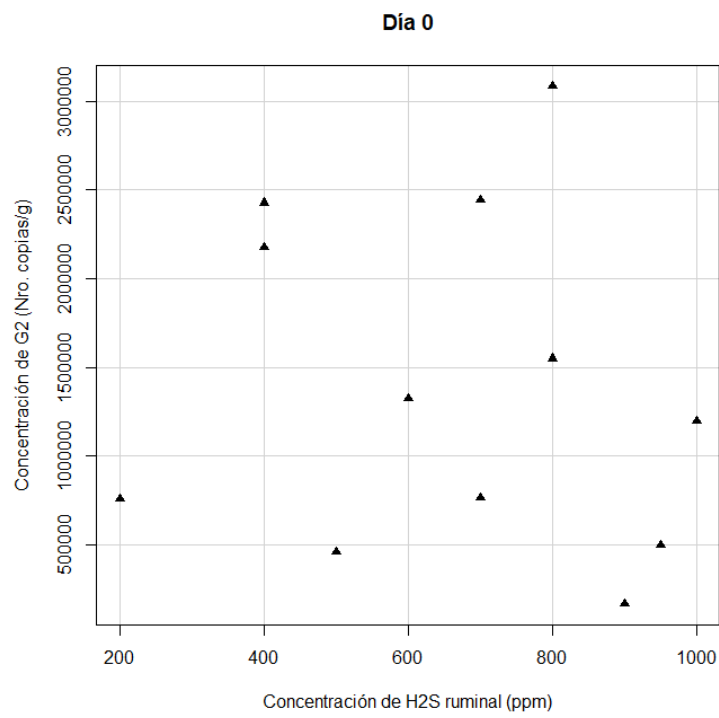
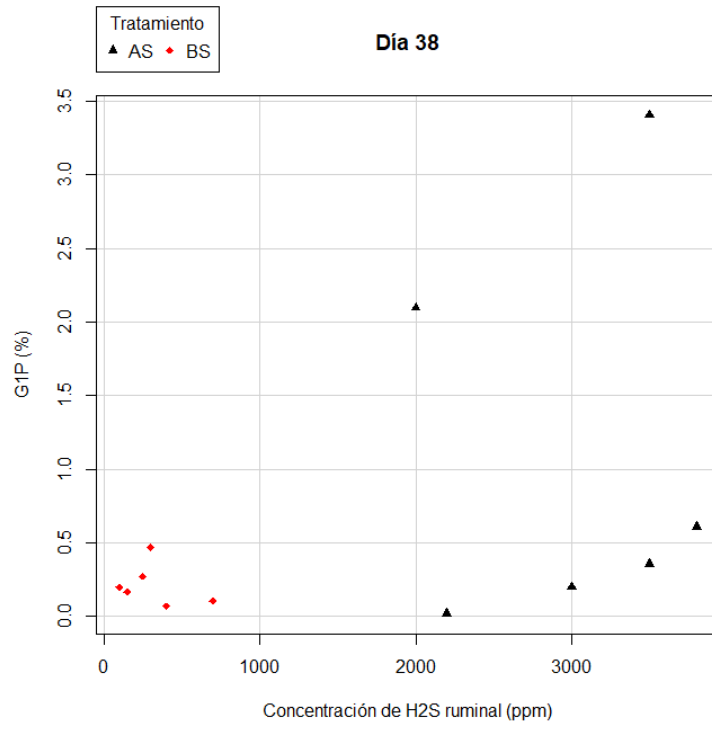


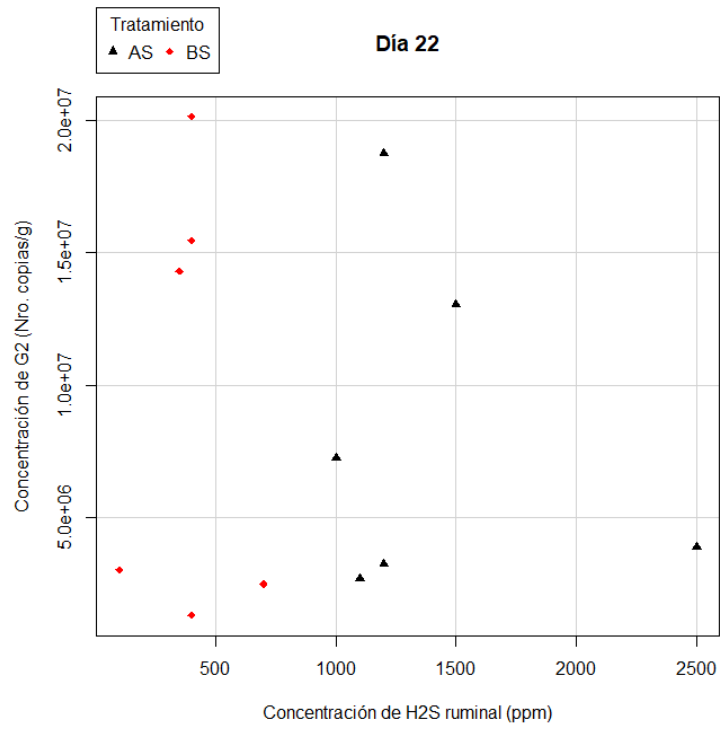
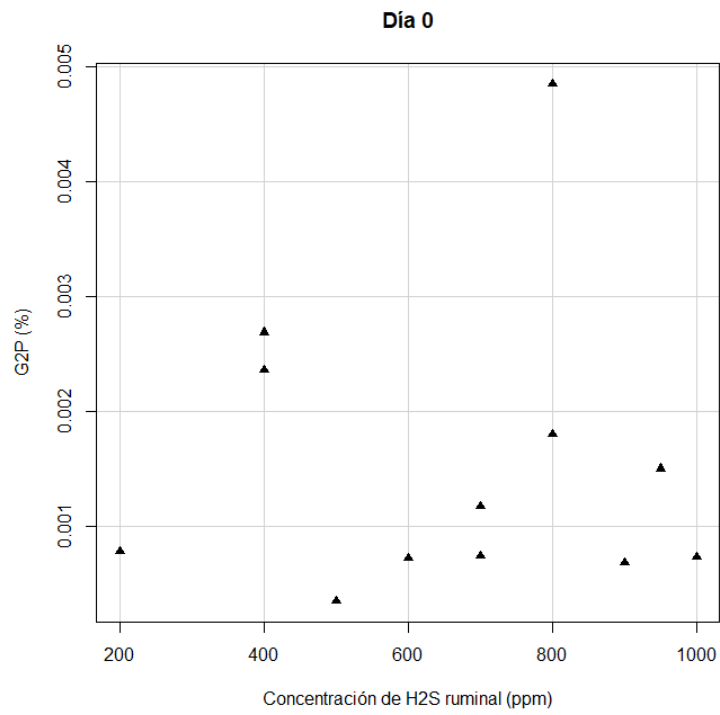


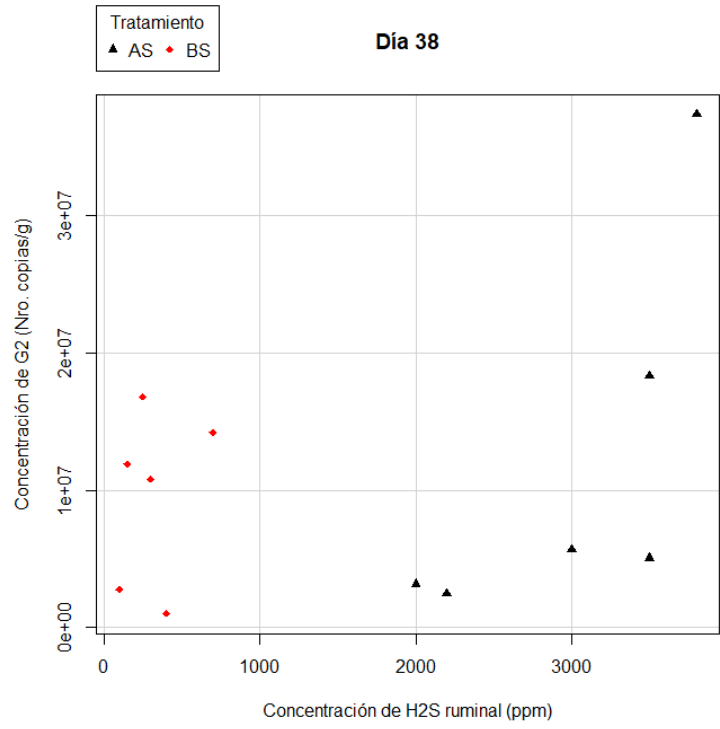
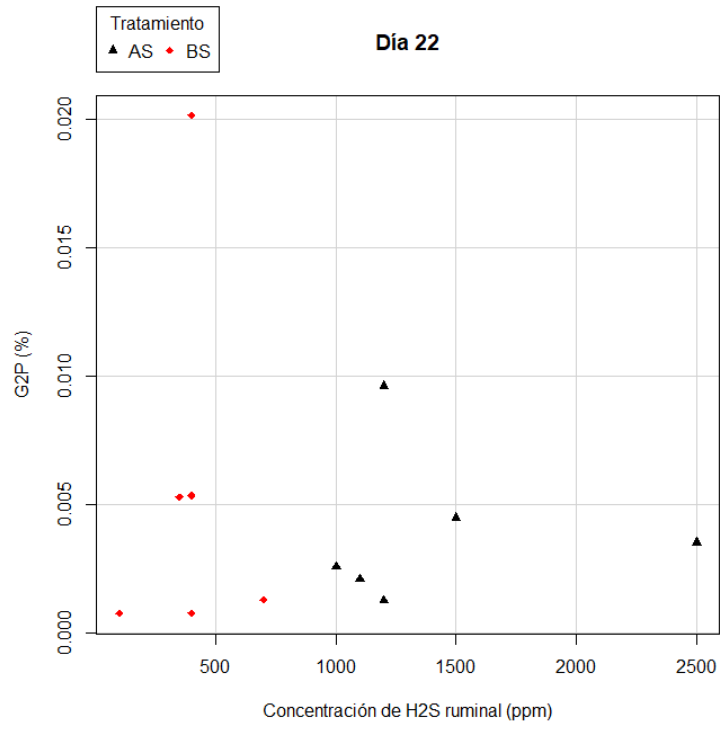


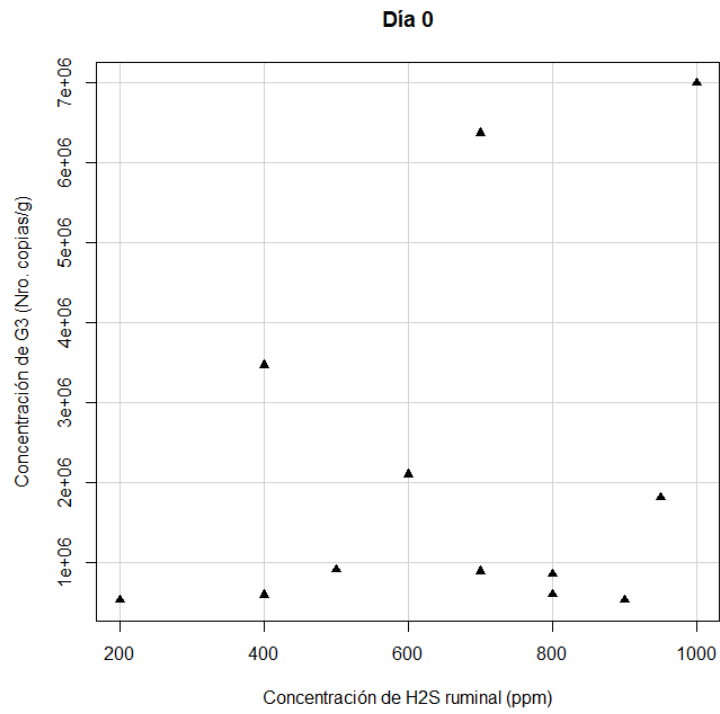
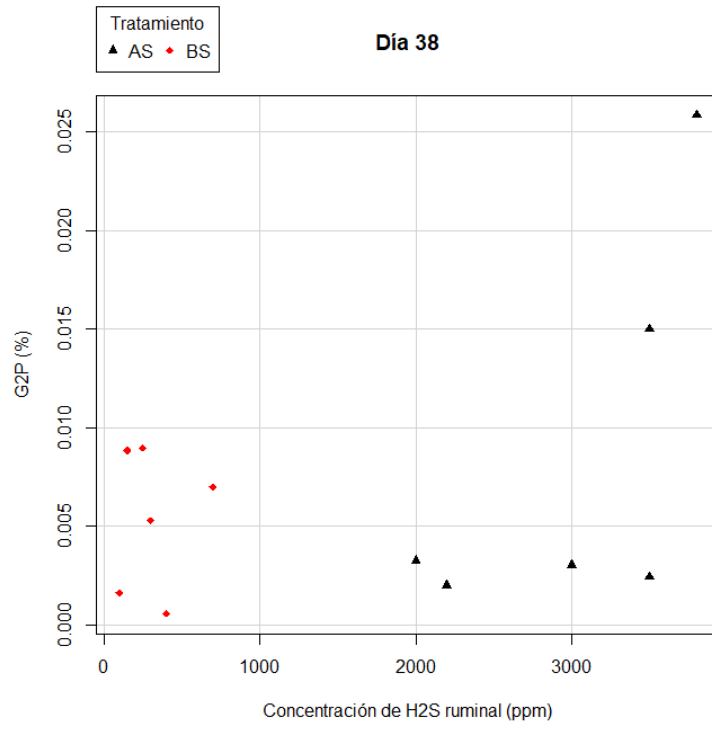




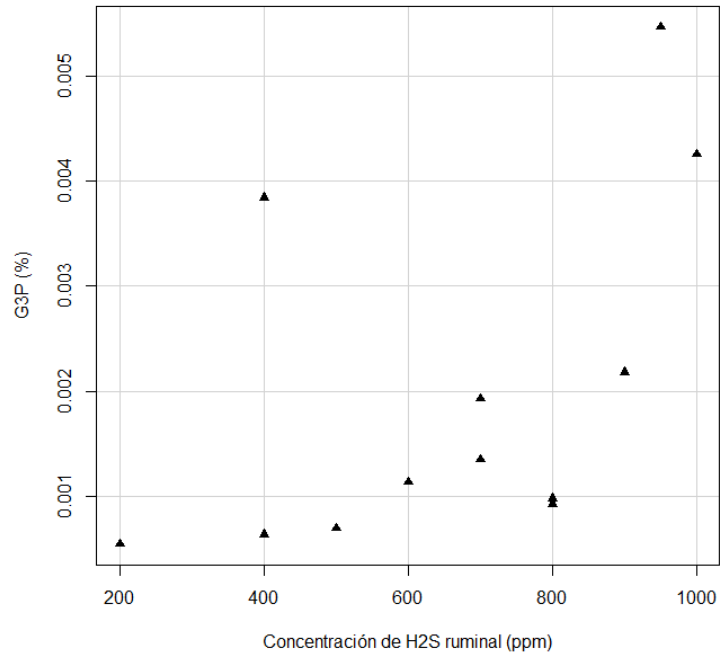








Día 0



Día 22

