



Universidad Autónoma del Estado De México

Facultad de Planeación Urbana y Regional



***“EL USO DE TAGETES ERECTA L. EN EL MEJORAMIENTO DE LA
FERMENTACIÓN RUMINAL IN VITRO, COMO REDUCTORA DE LAS
EMISIONES DE METANO”***

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
LICENCIADOS EN CIENCIAS AMBIENTALES**

PRESENTAN

YOSSADARA PACHECO ORTEGA

JANETH RIOS QUEZADA

DIRECTORA

DRA. JULIETA GERTRUDIS ESTRADA FLORES

CO –DIRECTOR

DR. OCTAVIO A. CASTELÁN ORTEGA

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN 6

ANTECEDENTES 9

JUSTIFICACIÓN..... 14

HIPÓTESIS 16

OBJETIVO GENERAL 17

OBJETIVOS PARTICULARES..... 17

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA..... 18

METODOLOGÍA 19

CAPITULO I. MARCO TEÓRICO CONCEPTUAL 20

1.1 *Tagetes erecta* L..... 20

1.2 Cambio Climático..... 20

 1.2.1 Configuración del clima 20

 1.2.2 Efectos y Consecuencias del cambio climático producido por el calentamiento de la tierra 22

1.3 Calentamiento global..... 22

1.4 Efecto invernadero 24

1.5 Gases de efecto invernadero 25

 1.5.1 Emisión de metano..... 26

 1.5.2 Dióxido de Carbono 26

1.6 Incremento en la concentración de gases de efecto invernadero... 27

 1.6.1 Actividades agropecuarias y su contribución al efecto invernadero 27

 1.6.2 Gases provenientes de la ganadería..... 28

 1.6.3 Emisiones de gases por el manejo del estiércol 29

1.7 Fuentes de emisión de gases de efecto invernadero 30

 1.7.1 Efecto invernadero provocado por la agricultura..... 31

1.7.2 Contribución de los rumiantes al calentamiento global	31
1.7.3 Alternativas para disminuir la emisión de gases en fermentación ruminal	33
1.8 Definición y clasificación de los taninos	34
1.8.1 Propiedades Químicas de los taninos	35
1.8.2 Papel de los rumiantes en el mundo	37
1.8.3 pH ruminal.....	37
1.8.4 Fermentación ruminal.....	38
1.8.5 Desarrollo ruminal	38
1.8.6 Efecto de la dieta sobre las poblaciones microbianas.....	39
1.9 Poblaciones ruminales.....	40
1.9.1 Bacterias	40
1.9.2 Inoculación y establecimiento de las bacterias	42
1.9.3 Protozoos	43
1.9.4 Hongos	44
1.9.4 Interrelaciones entre los microorganismos	45
CAPITULO II. MARCO JURÍDICO	46
2.2 Protocolo de Kioto.....	48
2.2.1 Disposiciones del Protocolo de Kioto y sus normas	49
2.3 Ley General De Cambio Climático.....	52
2.4 Ley General del Equilibrio Ecológico Y Protección al Ambiente	53
CAPITULO III. REFERENTES BASADOS EN LA FERMENTACION RUMINAL.....	54
3.1 Estimación de la emisión de gases de efecto invernadero en el municipio de montería (Córdoba, Colombia).	54
3.1.1 Inventario de emisiones.....	54
3.1.2 Factores de emisión	55

3.2 Efectos de extractos de plantas sobre las características de fermentación microbiana ruminal en sistemas in vitro	56
3.2.1 La agricultura y la ganadería como origen de gases con efecto invernadero	57
CAPITULO IV. METODOLOGÍA	59
4.1 Fase 1 : Recolecta de muestras.....	59
4.1.1 Selección de las especie nativa tanífera	59
4.1.2 Toma de muestras	59
4.2 Fase 2: Secado de las muestras.....	59
4.2.1 Molienda del sustrato	60
4.3 Fase 3: Extracción y cuantificación de taninos	60
4.3.1 Medición de fenoles totales y taninos usando el método de Folinciocalteu	61
4.3.2 Reactivos.....	61
4.3.3 Análisis de fenoles totales.....	61
4.3.4 Determinación de taninos totales	62
4.4 Fase 4 Evaluación de una dieta base en fermentación in Vitro	62
4.4.1 Técnica de producción de gas <i>in vitro</i>	63
4.4.2 Preparación del medio	63
4.4.3 Preparación de los frascos de incubación.....	64
4.4.4 Preparación del inóculo e inoculación	64
4.4.5 Blancos.....	64
4.4.6 Lecturas de producción de gas.....	64
4.4.7 Cuantificación de metano en la fermentación ruminal.....	65
4.4.8 Diseño Experimental.	66
CAPITULO V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	67
CONCLUSIONES	74
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75

BIBLIOGRAFÍA MESOGRÁFICA 79

ÍNDICE DE IMÁGENES Y CUADROS

Figura 1.1 Emisiones de gases por el manejo del estiércol 30

Figura 1.2 El rumen y sus diferentes funciones..... 36

Cuadro 1.1 Clasificación de las principales especies bacterianas del rumen según el tipo de substrato que fermentan 41

Cuadro 1.2. Clasificación de los principales protozoos ruminales con los substratos de fermentación.....44

Cuadro 3.1 Factores de emisión para actividades agropecuarias (ganadería)..... 55

Cuadro 3.2 Emisión de gases de efecto invernadero por tipo de fuente .. 56

Cuadro 5.1 Contenido de taninos en *Tagetes erecta* L..... 67

Cuadro 5.2 Composición química, dMO, dFDN (g/kg MS) y EM (MJ/kg MS) de la dieta más el nivel de inclusión 69

Cuadro 5.3 Parámetros de fermentación en producción de gas *in vitro* en la dieta más el nivel de inclusión..... 71

Cuadro 5.4 Efecto del nivel de inclusión en la producción de metano (ml/g MS) en fermentación *in vitro*.....73

INTRODUCCIÓN

La historia ambiental se ha desarrollado en medio de una búsqueda de los instrumentos de adaptación cultural y tecnológica, que le han permitido a la humanidad sortear los desafíos de cada época, en el que se ha ido incrementado el uso irracional de los recursos naturales por parte del ser humano. El consumismo, al ser apoyado por la humanidad, genera la producción de gases de efecto invernadero (GEI), los cuales afectan a la atmósfera en gran medida, pues la tierra recibe energía del sol en forma de radiaciones solares.

La tierra absorbe radiación solar (radiación de onda corta, principalmente en la superficie y la redistribuye por recirculaciones atmosféricas y oceánicas. La energía es re-emitida al espacio (radiación de onda larga) para mantener en el plazo un balance entre energía recibida y re-emitida (Martínez *et al.*, 2004). Todos los cuerpos emiten radiación; estos rayos o fotones son ondas electromagnéticas que no necesitan ningún medio para propagarse, más bien la materia dificulta su avance. Las electromagnéticas se caracterizan por su longitud de onda o por su frecuencia siendo ambas inmensamente proporcionales: una onda larga es de baja frecuencia y una de onda corta es de alta frecuencia.

Sin embargo, el ser humano no es el único contribuyente de esta creciente contaminación, los rumiantes también son portadores directos, al producir GEI, tales como el gas Metano, que se produce durante la fermentación de los alimentos en el rumen o panza de los rumiantes. El Metano es un gas de efecto invernadero muy potente. La ganadería representa un 18% de las emisiones mundiales de gas de efecto invernadero según datos de la FAO en 2006. (INRA, 2008).

En la atmósfera terrestre existe un fenómeno natural conocido como efecto invernadero, gracias al cual la temperatura promedio en la superficie terrestre es de 15°C y no de -18°C, como se esperaría que ocurriera dada la distancia entre el planeta Tierra y el Sol (Martínez *et al.*, 2004). Los gases de efecto invernadero como el metano (CH₄) y dióxido de carbono (CO₂) contribuyen al

cambio climático, el metano es emitido en mayor medida por combustibles fósiles y es el gas de mayor importancia en el calentamiento global, ya que posee un efecto 21 veces más contaminante con respecto al CO₂.

En la derivación de metano, aproximadamente el 70% es de origen antropogénico, en el que la agricultura contribuye con dos terceras partes y dentro de este rubro, la fermentación entérica es responsable de una tercera parte del metano producido (Moss *et al.*, 2000). Cerca de 80 millones de toneladas de CH₄ son producidos anualmente por el ganado a través de la fermentación entérica, de las cuales 58 millones de Mt/año son atribuidas al ganado vacuno (Johnson y Johnson, 1995) y se estima en promedio que las novillas de carne producen alrededor de 160 L/d. En los rumiantes el metano se produce principalmente por los procesos fermentativos del alimento que ingresa al rumen y es expulsado a través del eructo y del estiércol. En ese proceso un factor biótico importante a nivel de rumen son las bacterias anaerobias metanógenas (*Archaea*), las cuales degradan la celulosa ingerida a glucosa, que fermentan luego a ácido acético y reducen el bióxido de carbono, formando metano en el proceso. Esa emisión de metano significa energía alimenticia que se transforma en forma de gas y no es aprovechada por el animal representando entre 5.5-6.5% del total de la energía potencialmente consumida en la dieta, es por eso que las características de los alimentos tienen un gran efecto en la producción de metano, de las cuales las más importantes son: cantidad y tipo de alimento, manipulación de la fermentación ruminal, adición de lípidos, tipo de carbohidratos y procesamiento de los forrajes. Por tales motivos, actualmente se están desarrollando estrategias de alimentación en el ganado para minimizar las emisiones de CH₄ como gas de efecto invernadero.

En México los sistemas de agro-ganadería en pequeña escala hacen uso de recursos naturales forrajeros, como vegetación nativa, para complementar la dieta del ganado. A pesar de la importancia que tienen estos forrajes en la alimentación del ganado, hasta hoy se conoce muy poco acerca del efecto que pudieran tener plantas nativas forrajeras que contengan cantidades sustanciales de Taninos Condensados (TC) en la digestibilidad y sobre su

**“EL USO DE *Tagetes erecta* L. EN EL MEJORAMIENTO DE LA FERMENTACIÓN RUMINAL
IN VITRO, COMO REDUCTORA DE LAS EMISIONES DE METANO”**

comportamiento en la producción de CH₄ y CO₂ emitido por los rumiantes. Por lo anterior, y con el objetivo de establecer el efecto de los TC en fermentación ruminal *in vitro* sobre la producción de gases de efecto invernadero, se analizaron compuestos naturales como los metabolitos secundarios producidos por las plantas, particularmente los taninos, los cuales son capaces de tener efectos positivos sobre el aprovechamiento del alimento en los rumiantes. Puesto que los TC forman enlaces con las proteínas reduciendo su disponibilidad en el rumen.

ANTECEDENTES

Con el inicio de la Revolución Industrial, la concentración de los gases de efecto invernadero (GEI) de la atmósfera mostró los siguientes incrementos: Bióxido de Carbono (CO₂) 31%, Metano (CH₄) el 151% y óxidos de Nitrógeno (N₂O) 17% en México. Los científicos consideran que estos incrementos son resultado de la quema de los combustibles fósiles y en menor proporción de la contribución de otras actividades humanas (IPCC, 1996).

Las emisiones históricas de carbono producto de la quema de combustibles fósiles en el periodo de 1900 a 2000, fueron de 261, 233 millones de toneladas. Las emitidas por Norteamérica representaron 32.2%, sigue Europa Occidental con 21.9%. Europa del Este con 18.5%, Asia con 8.2%, Oceanía con 5.4%, Lejano Oriente con 5.0%, Latinoamérica con 3.9%, Medio Oriente con 2.5%, y África con 2.2%. México emitió 2,627 millones de toneladas de carbono que corresponden al 1% de las emisiones totales durante el periodo considerado (1900-2000), ubicándose en la posición número 15.

La temperatura media de la Tierra se viene calentando desde 1840, coincidiendo con el inicio de la revolución industrial (Gribbin, 1992). No obstante, no se puede establecer una relación de causa efecto, ya que la atmósfera no reacciona tan rápidamente. Sólo hay que observar que el verano comienza cuando el sol está más alto sobre el horizonte (durante todo el verano desciende) y ocurre que el sol alcanza su máxima altura en mitad del verano.

Desde 1840 también ha existido un período más frío (1950-1970), sin llegar a ser tan frío como en los años de la pequeña edad de hielo. La realidad del catastrófico cambio climático no parece estar llegando a la gente y no resulta difícil entender por qué. El calentamiento global es tachado de especulación por el presidente y el Congreso de Estado Unidos y en los medios de comunicación (Motavalli, 2005).

Los científicos mencionan que el cambio climático no es simplemente un calentamiento global; es algo más sutil y mucho más peligroso que eso. En realidad, hemos entrado en una época de profunda inestabilidad climática en la que las tormentas son más intensas y las variaciones de las temperaturas y las

precipitaciones mucho mayores, el abrasador verano que padeció Europa en 2003 fue un ejemplo muy drástico de esta tendencia (Motavalli, 2005)

La información obtenida por Motavalli determina que el cambio climático no solo es el calentamiento global a consecuencia de los gases de efecto invernadero como es el dióxido de carbono un ejemplo mencionado por Motavalli es la extensión que abarca desde China hasta Nueva York se han producido en lo que eran patrones climáticos firmemente establecidos cambios menores que ya han tenido efectos profundos y permanentes en algunos ecosistemas locales, las especies de peces están desapareciendo, provocando alteraciones en la cadena trófica, las aves y las mariposas se están desplazando y aparecen en lugares donde nunca se habían visto anteriormente, algunas plantas mueren y otras prosperan a medida que el cambio climático inducido por el hombre se acelera (Motavalli, 2005)

Las emisiones de gases de dióxido de carbono de las centrales eléctricas carboneras, los coches y los camiones, los fuegos que empleamos para cocinar y la deforestación son los causantes de buena parte del mismo. Los estadounidenses tienen una gran responsabilidad, los sistemas de transporte de Estados Unidos emiten más dióxido de carbono que la economía completa de cualquier otro país según informa el Centro Pew sobre Cambio Climático (Motavalli, 2005).

Podríamos reducir esas emisiones con una voluntad colectiva que se encarnara en una legislación como el Protocolo de Kioto, pero se han hecho muy pocos progresos, sólo en unos pocos lugares sobre todo en Europa la gente no solo está prestando atención sino también actuando de acuerdo con su conciencia (Motavalli, 2005)

EL 22 de Abril de 2002: los glaciares están desapareciendo en América del Sur, en los próximos quince años, todos los pequeños glaciares del continente (80% del total) desaparecerán, según dice el glaciólogo Francés Bernard Francou "la tendencia es tan clara que no se puede discutir las cifras" (Gribbin, 1992).

El 9 de noviembre de 2002 los informes sobre el Ártico registraron una pérdida de hielo, según afirman científicos de la American Geophysical Unión. La

superficie derretida en Groenlandia era la mayor de todas desde que se dispone de datos, el hielo del Océano Ártico alcanzó también un mínimo histórico.

El 11 de diciembre de 2002, el año probablemente pasará a la historia como el segundo año más caluroso registrado, sólo superado por 1998, el ecologista Lester Brown (Ludevid, 1997) al estudiar los datos de la temperatura anual, menciona que la temperatura está aumentando.

Los océanos absorben en la actualidad quince veces más de carbono del que contiene la atmósfera (Ludevid, 1997). En 1958 Keeling colocó el primer medidor de CO₂ atmosférico en Mauna Loa (Hawai), lejos de las grandes aglomeraciones industriales que contaminan la atmósfera inmediata, debido a la combustión de hidrocarburos y carbones. El CO₂, al contrario que el vapor de agua, es un gas que tiende a distribuirse homogéneamente por la atmósfera. En esta estación indican que los niveles de CO₂ en la atmósfera han aumentado desde las 315 partes por millón (ppm) en 1958 a 362 en 1993. En los hielos antárticos revelan que hacia 1850 era de 280 ppm, y que durante la última glaciación eran de 170 ppm. También señalan que la temperatura media de la tierra tiene ciclos muy similares. Sin CO₂ no sería posible la fotosíntesis, ni, por lo tanto, la vida como la conocemos. El aumento natural de los porcentajes de CO₂ se debe a un aumento de la actividad volcánica, un aumento de la disolución de las calizas debido al ascenso del mar que invade con su agua corrosiva regiones calizas y la reducción de la masa vegetal y los microorganismos marinos que fijan el carbono para producir oxígeno y realizar la fotosíntesis.

El metano (CH₄) es un gas invernadero muy potente, 58 veces mayor que el CO₂. Su presencia en la atmósfera se debe a la descomposición de las materias orgánicas en un medio anaerobio. Sus fuentes naturales masivas son los manglares y los pantanos. También los gases de los animales de la ganadería, y las grandes extensiones de arrozales, contienen grandes cantidades de metano, aunque su contribución al aumento de metano en la atmósfera es marginal.

El metano se retira de la atmósfera porque queda atrapado y congelado en el suelo permafrost o en el suelo oceánico bajo grandes presiones. Este metano congelado es una fuente de energía muy potente, y puede explotarse como recurso (Gribbin, 1992).

El Instituto Nacional de Investigación Agronómica de Francia colaboró en un trabajo de investigación reciente dirigido por Morgavi, el cual ha demostrado que es posible lograr una reducción del 30% de metano (CH₄) mediante la adición de aceites vegetales que contienen altos niveles de ácidos grasos poliinsaturados de la dieta de vacas lecheras.

En principio, la entrada de lípidos en la dieta de los rumiantes parece prometedora. De hecho, el equipo que dirige Morgavi ha demostrado en diferentes estudios realizados en vacas lecheras en la granja experimental del INRA de Clermont-Ferrand-Theix (centro de Francia) que un aporte del 6% de lípidos de las semillas de lino produce la reducción de las emisiones de metano de los animales entre un 27 y un 37%. El rendimiento de estos animales fue sostenido o se redujo, en función de los diferentes casos.

De este modo, una vaca destinada a la producción de carne expulsa entre 60 y 70 kilos . Las vacas lecheras elevan la cuenta a 120 kilos al año. La emisión de cada oveja al año supone el equivalente a conducir un automóvil tipo europeo 1.000 kilómetros en ese periodo de tiempo. La emisión de metano depende, según explica el experto, si el ganado está estabulado o está destinado al pastoreo.

Científicos del Instituto de Investigación Medioambientales de Aberystwyth (Gales, Reino Unido) plantean cambiar la dieta del ganado vacuno; causante de una cuarta parte de las emisiones de metano producidas por actividades humanas. Los expertos proponen cultivar especies arvenses con mayor nivel de azúcar para que se conviertan en el forraje de estos animales, de esta manera se modificaría el proceso por el que sus estómagos convierten el alimento en metano, que acaba siendo evacuado principalmente por la boca.

Ahora bien diversos estudios hablan de un gran incremento de este gas en los últimos años y algunos científicos incluso lo consideran tanto o más peligroso que el CO₂. La Universidad Abierta de Reino Unido y la Universidad Alemana de Colonia aluden que el metano fue el responsable del calentamiento global de hace unos 180 millones de años y que acabo con un gran número de especies.

Además de la contribución al efecto invernadero el metano contribuye a la alteración de la atmósfera para depurarse de contaminantes. No obstante, se trata también de un gas apreciado como combustible y para producir diversos gases y sustancias de uso industrial (Fernández, 2007).

El calentamiento de la atmósfera derrite el hielo, esto, junto con la subida del nivel eustático del mar, libera grandes cantidades de metano a la atmósfera. El porcentaje de metano en la atmósfera ha aumentado en los dos últimos siglos de 0,8 a 1,7 partes por millón. La combustión de hidrocarburos y carbones produce ozono en superficie; y los abonos nitrogenados emiten dióxido de nitrógeno (NO₂). Estos gases, que también son invernadero, se combinan rápidamente con el dióxido de azufre (SO₂), también procedente de la combustión, y forman ácido sulfúrico (lluvia ácida). Las nubes con grandes cantidades de SO₂ tienen gran capacidad reflectante, con lo que enfrían las capas bajas de la atmósfera.

JUSTIFICACIÓN

México y América Latina, son sitios favorables en la distribución de la riqueza de especies de rumiantes, en términos biogeográficos; será un reto encontrar sistemas de manejo para esa fauna, también lo será el diseñar la introducción de nuevas especies y el reubicar la herencia hispánica en rumiantes: ovinos, caprinos y bovinos.

Es necesario resaltar y reconocer la deficiencia que se tiene para el cuidado adecuado de los rumiantes, estos animales colectan su forraje (pastos, hierbas, hojas de arbustos o árboles frutales, flores y semillas) tragándolos rápidamente, casi sin masticación alguna y conduciéndolo a la cámara de fermentación que se le llama "rumen" o "panza" (Galicia, 1998). Al tener este proceso el alimento se reblandece por la acción de los líquidos y la actividad microbiana; posteriormente se arroja y se somete a masticación más intensa tal que facilita la acción de los microbios, una vez que es re-tragado el dicho alimento al rumen, posteriormente pasa a la redcilla o retículo, de donde puede pasar el omaso o librillo y finalmente pasa al abomaso o a lo que se le conoce como estómago verdadero.

Si los rumiantes tuvieran una alimentación balanceada, y rica en gran concentración con taninos, los gases provocados por estos animales, disminuirían en una medida considerada, ya que el metano es uno de los principales elementos de los gases de efecto invernadero, "la fuente más importante del metano es la descomposición anaerobia (la descomposición de microorganismos sin la presencia de oxígeno libre en El aire)", (Ciesla.1996).

Los taninos son metabolitos secundarios cuyo papel primordial en la planta es como medio de defensa, son compuestos polifenólicos de alto peso molecular asociados con efectos nutricionales al ser ingeridos en el forraje. Los taninos condensados se ligan a las proteínas impidiendo la asimilación de éstas por parte del animal.

El papel de los taninos en la planta es como medio de defensa contra patógenos, herbívoros y condiciones ambientales hostiles, éstos inducen una

respuesta negativa instantánea al ser consumidos por ejemplo su sabor amargo asociado a la astringencia o efectos o puede haber una respuesta lenta, relacionada a los efectos tóxicos y antinutricionales, Los taninos pueden afectar negativamente el consumo del alimento por los animales alterando la digestibilidad, la producción animal pero quizá el factor nutricional más importante es el impedimento del buen aprovechamiento de las proteínas por parte del animal.

Los taninos pueden inactivar las enzimas digestivas y crear complejos agregados de taninos y proteínas de plantas que son difíciles de digerir; la acción de los antinutricionales no sólo consiste en interferir con el aprovechamiento de los nutrientes sino que en varios casos puede producir daños al organismo del animal que los consume (Carretero, 2000).

En este contexto, resulta relevante el estudio de la alimentación que tienen los rumiantes, es por ello saber la importancia de la arvense *Tagetes erecta* L como dieta del animal para una mejora en su digestión, pues ellos, tienen un gran aporte en los gases de efecto invernadero por medio del eructo, los cuales contribuyen en cierto porcentaje, en las emisiones hacia la atmósfera, como ya se mencionó anteriormente, con una buena alimentación, por lo tanto la adición de la especie *Tagetes erecta* permitirá la disminución de éstos gases y el rumiante adquirirá una mejor fermentación ruminal.

HIPÓTESIS

“Debido al contenido de taninos que existen en *Tagetes erecta* L. la fermentación ruminal mejorará reduciendo las emisiones de CH₄, ya que cuenta con la capacidad antimicrobiana o una inhibición de la metanogénesis.”

OBJETIVO GENERAL

- Identificar la importancia del uso de *Tagetes erecta* L. en la fermentación ruminal *in vitro* para la disminución de metano.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar el contenido de taninos en *Tagetes erecta* L. para utilizarla como planta reductora de metano en la fermentación ruminal *in vitro*.
- Valorar la fermentación ruminal *in vitro* adicionando *Tagetes erecta* L. para disminuir las emisiones de metano.
- Determinar las emisiones de CH₄ en la fermentación ruminal *in vitro* por medio de cromatografía de gases.
- Probar el comportamiento ruminal *in vitro* de *Tagetes erecta* L. adicionada a una dieta base en diferentes concentraciones.
- Evaluar la inclusión de *Tagetes erecta* L. para determinar sus efectos sobre la emisión de gases de CH₄.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

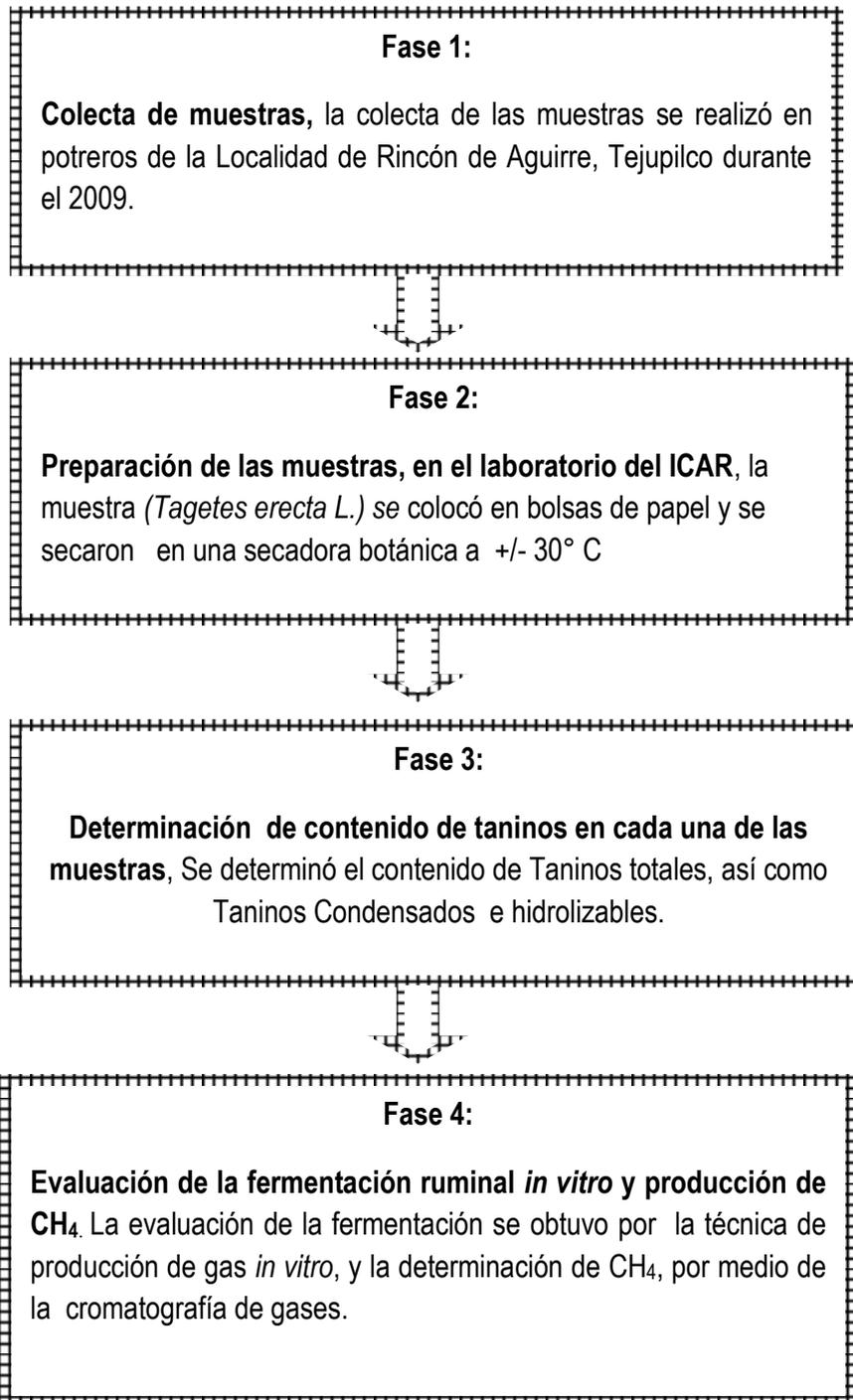
Los recursos naturales, se han ido modificando poco a poco por el uso irracional del hombre, esto conlleva a la mala administración de estos mismos; por el hecho de que el ser humano por instinto tiende a satisfacer sus propias necesidades de sobrevivencia, sin importar el efecto que este tenga hacia la atmósfera.

Cambios radicales se han presentado en la atmósfera, por el alto contenido de gases de efecto invernadero (GEI), como lo son, el metano (CH₄) y el dióxido de carbono (CO₂) que se presentan en el aire, esto ha traído como consecuencia el calentamiento global, que día a día ha ido interviniendo en las distintas actividades; como lo son las actividades agrícolas y ganaderas que contribuyen directamente a la emisión de gases de efecto invernadero, la mayor parte de estas emisiones es ocasionada por la ganadería que, después del sector energético, es la actividad más comprometida; este sector aporta el 35% de las emisiones totales del país.

Por lo anterior es importante redoblar los esfuerzos ante el desafío del cambio climático, aquí la importancia de la elaboración del presente trabajo, donde a través de un sistema *in vitro* se adicionó a una dieta tradicional la especie *Tagetes erecta* L., con la finalidad de disminuir la emisión de metano debido a que esta especie contiene taninos y estas sustancias mejoran la fermentación ruminal.

METODOLOGÍA

El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio del Instituto de Ciencias Agropecuarias y Rurales (ICAR) de la Universidad Autónoma del Estado de México, la cual consistió en cuatro fases.



CAPITULO I. MARCO TEÓRICO CONCEPTUAL

1.1 *Tagetes erecta* L.

Los *Tagetes erecta* L. son reconocidos por otros nombres comunes en español: cempola, flor de muerto, nulibé.

De acuerdo a los orígenes, en México se ha registrado en Aguascalientes, Campeche, Chiapas, Coahuila, Colima, Distrito Federal, Durango, Guerrero, Hidalgo, Estado de México, Michoacán, Morelos, Nayarit, Oaxaca, Puebla, Querétaro entre otros estados de la república.

Es de estatus nativo, su hábitat es de vegetación perturbada, ruderal y arvense, se distribuye por zonas bioclimáticas de forma silvestre y se encuentra principalmente en la región de la selva baja caducifolia. En cuanto a la ubicación altitudinal se registra de los 800 a los 2300 m.

Su propagación de la especie es por semilla, en una planta anual y florece entre los meses de septiembre y diciembre (Villarreal, 2003).

1.2 Cambio Climático

El calentamiento mundial de 0.8 °C recoge las variaciones regionales y de complejidad del clima en las distintas partes del mundo. Pero las variaciones no han sido iguales en todas partes; las mayores modificaciones se han producido en las latitudes medias y altas del hemisferio norte, aunque algunas áreas concretas han experimentado enfriamientos. El incremento de la temperatura se da principalmente durante la noche y los aumentos más fuertes se han producido en los meses de invierno y primavera del hemisferio norte (Graedel y Crutzen, 1993).

1.2.1 Configuración del clima

El científico sueco Svante Arrhenius, sugirió en 1896, que un aumento de los niveles de gas en la atmósfera conllevaría un calentamiento de la Tierra. Sus teorías no fueron creíbles en su momento, sino hasta la década de los ochenta, fue cuando se empezó a percibir el cambio climático. En ese momento, la modernización del clima se desarrolló con la ayuda de programas

informáticos, que aun así, no son comparables con la complejidad de los factores que determinan el clima (Gribbin, 1992).

Para frenar el calentamiento de la Tierra se elaboró y firmó en Río de Janeiro la *Convención Marco de las Naciones Unidas sobre el Cambio Climático* (1992). Al atribuir la Convención, países desarrollados acordaron reducir sus emisiones de dióxido de carbono y otros GEI a los niveles de 1990. Esos países, que son responsables del 60% de las emisiones anuales de dióxido de carbono, convinieron también en transferir a los países en desarrollo tecnología e información que los ayudaran a hacer frente a los problemas derivados del cambio climático. En mayo de 2004, 189 países habían ratificado la Convención (ONU, 2008).

Las negociaciones de las Naciones Unidas sobre el cambio climático se basan en la labor del Grupo Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio Climático (IPCC, 1996), establecido conjuntamente por el Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA) y la Organización Meteorológica Mundial (OMM) en 1988. El Grupo es una red mundial de 2,500 científicos y expertos eminentes que pasan revista a las investigaciones científicas sobre la materia. En 1989 el grupo llegó a la conclusión de que las actividades humanas podían originar cambios en el sistema climático mundial, lo cual hizo que se iniciaran las negociaciones de la convención sobre el cambio climático. En 2001 gracias a la disponibilidad de nuevos modelos de computadora más potentes, se determinó que existían "pruebas nuevas y definitivas" de que la mayor parte del calentamiento observado en los últimos 50 años era atribuible a las actividades del hombre.

Las pruebas presentadas en 1995 por los científicos del IPCC dejaron claro que aunque se cumpliera puntualmente con la meta de 1992 no se evitaría el calentamiento de la Tierra ni los problemas derivados de él. En 1997, los países que habían ratificado la convención se reunieron en Kioto, Japón, y acordaron un *protocolo* jurídicamente vinculante en virtud del cual los países desarrollados debían reducir sus emisiones colectivas de seis gases de efecto invernadero en un 5.2% entre 2008 y 2012, tomando como referencia los

niveles de 1990. El Protocolo también establece varios "mecanismos" innovadores para hacer menos costosa la reducción de las emisiones. Este documento es conocido como Protocolo de Kioto (ONU, 2008).

1.2.2 Efectos y Consecuencias del cambio climático producido por el calentamiento de la tierra

Algunos efectos y consecuencias del cambio climático según Gribbin (1992), se enlistan a continuación:

- Aumentará más el nivel del mar (en los últimos 100 años ha subido entre 10 y 25 centímetros y se prevé que para 2050 puedan subir 20 cm más y 50 cm para 2100, respecto y de los actuales). Pérdida de tierras y humedales.
- Se fundirán glaciares y hielos marinos.
- Se modificará el régimen de lluvias con cambios bruscos de sequías e inundaciones, aumento de temporales, tormentas, huracanes tropicales.
- Se alcanzarán extremos máximos en las temperaturas aumentando la frecuencia de olas de calor y frío.
- Aumentarán las plagas y enfermedades tropicales
- Se dañarán los ecosistemas y agricultura por la imposibilidad de adaptarse tan rápidamente al cambio de temperatura.
- Aumento de la mortalidad por estrés de calor y enfermedades provocadas por insectos tropicales.
- Aumento de la contaminación atmosférica en las ciudades.

1.3 Calentamiento global

"El calentamiento global podría considerarse como la intensificación del efecto invernadero, la disminución de la capa de ozono de la estratósfera, la lluvia ácida y la pérdida de biodiversidad, estas tienen causas naturales y causas humanas. La causa natural es el cambio de la órbita que traza la tierra alrededor del sol, por otro lado la causa humana es la deforestación masiva para la obtención de nuevas tierras de cultivo o pasto" (Ludevid, 1997).

De acuerdo con el autor el hombre ha tenido una gran influencia sobre este problema, el ritmo acelerado del cambio climático se explica con detalle en dos estudios recientes, desde el punto de vista medioambiental y de forma energética.

Considerando el punto de vista medioambiental, la expulsión de GEI que son los principales contribuyentes al calentamiento global.

De forma energética por la quema de biocombustibles y algunos otros productos derivados del petróleo. Algunas noticias presentadas en el año 2002 y 2003 mencionan que los glaciares están desapareciendo en América del Sur, el 80% del total, según el glaciólogo Francés Bernad Francas, menciona que la tendencia es tan clara que no se pueden discutir las cifras (Ludevid, 1997).

Otro de los temas importantes que ha comprobado el calentamiento global es el “Sistema Climático el cual está vinculado con la atmósfera, los océanos, la superficie o corteza terrestre y los seres vivos”. Ludevid (1997) juega un papel muy importante que implica a los principales elementos afectados por el cambio climático, tomando en consideración a la atmósfera, es uno de los componentes más importantes del clima terrestre, el presupuesto energético determina el estado del clima global, por ello es esencial comprender su composición y estructura (GCCIP, 1997). Los gases que la constituyen están bien mezclados pero no son físicamente uniformes pues tiene variaciones significativas en temperatura y presión, relacionado con la altitud sobre el nivel del mar (GCCIP, 1997).

En cuanto a los océanos existen transferencias de momento a través de los vientos superficiales. Estas corrientes asisten en la transferencia latitudinal de calor, análogamente a lo que realiza la atmósfera. Las aguas cálidas se movilizan hacia los polos y viceversa. La energía también es transferida a través de la evaporación.

El agua que se evapora desde la superficie oceánica almacena calor latente que es liberado cuando el vapor se condensa formando nubes y precipitaciones. La sal contenida en las aguas marinas se mantiene disuelta en

ella al momento de formarse el hielo en los polos, esto aumenta la salinidad del océano. Estas aguas frías y salinas son particularmente densas y se hunden, transportando en ellas considerable cantidad de energía. Para mantener el equilibrio en el flujo de masas de agua existe una circulación global termohalina, que juega un rol muy importante en la regulación del clima global (Gribbin, 1992). Debido a los océanos es que existe una transferencia de calor.

El cambio climático inducido por el hombre traerá fenómenos naturales cada vez más extremos y por consiguiente, pérdidas por catástrofes cada vez mayores, "los impactos podrían causar la bancarrota de la economía mundial en un periodo de cincuenta a setenta años" (Motavalli, 2005).

1.4 Efecto invernadero

El efecto invernadero es un fenómeno por el que determinados gases componentes de la atmosfera retiene parte de la energía que el suelo emite al haber sido calentado por la radiación solar. El efecto invernadero se está acentuando en la tierra por la emisión de ciertos gases, como CO₂ y CH₄, debido a la actividad económica humana. Este fenómeno evita que la energía del sol recibida constantemente por la tierra vuelva inmediatamente al espacio produciendo a escala planetaria un efecto similar al observado en un invernadero.

No obstante, su efecto beneficioso puede ser modificado por actividades humanas que aumentan la concentración en la atmósfera de muchos de los gases que lo producen" (Ludevid, 1997).

Los gases de efecto invernadero, por lo tanto, atrapan el calor dentro del sistema superficie-tropósfera. Este mecanismo es diferente al de un verdadero mecanismo de invernadero, donde el aislamiento del aire en el interior de la estructura, evita la transferencia de calor que es lo que calienta el aire interno. El efecto invernadero fue descubierto por Joseph Fourier en 1824, con los primeros experimentos confiables realizados por John Tyndall en el año 1858 y

reportado por primera vez de manera cuantitativa por Svante Arrhenius en 1896.

La razón de esta discrepancia de temperatura, es que la atmósfera es casi transparente a la radiación de onda corta, pero absorbe la mayor parte de la radiación de onda larga emitida por la superficie terrestre. Varios componentes atmosféricos, tales como el vapor de agua, el dióxido de carbono, tienen frecuencias moleculares vibratorias en el rango espectral de la radiación terrestre emitida. Estos gases de invernadero absorben y remiten la radiación de onda larga, devolviéndola a la superficie terrestre, causando el aumento de temperatura (GCCIP, 1997).

Desde hace más de un siglo ya se conoce el efecto invernadero por el cual la Tierra mantiene su temperatura en equilibrio mediante una delicada relación entre la energía solar entrante (radiación onda corta) que absorbe y la energía infrarroja saliente (radiación de onda larga) que emite, parte de la cual escapa al espacio. Los gases de efecto invernadero (vapor de agua, CO₂, CH₄ y otros) dejan pasar la radiación solar a través de la atmósfera de la Tierra casi sin obstáculo, pero absorben la radiación infrarroja de la superficie de la Tierra e irradian parte de la misma nuevamente hacia la Tierra. Este invernadero natural mantiene la temperatura de la superficie de la Tierra aproximadamente 33°C más caliente de lo que sería sin él, permitiendo con ello la vida.

Uno de los resultados del efecto invernadero, es mantener una concentración de vapor de agua en la baja tropósfera, mucho más alta que la que sería posible en las bajas temperaturas que existirían si no existiese el fenómeno. Se especula que en Venus, el volcanismo elevó las temperaturas hasta el punto que no se pudieron formar los océanos, y el vapor resultante produjo un Efecto Invernadero, exacerbado más aún por la liberación de dióxido de carbono en rocas carbonatadas, terminando en temperaturas superficiales de más de 400 °C (Anderson *et al.*, 1987).

1.5 Gases de efecto invernadero

Se denominan GEI a los gases cuya presencia en la atmósfera contribuye al efecto invernadero. Los más importantes están presentes en la atmósfera de

manera natural, aunque su concentración puede verse modificada por la actividad humana, también entran en este concepto algunos gases artificiales, producto de la industria. Los GEI son: H₂O, CO₂, CH₄, NO_x, O₃ y clorofluorocarburos. Los GEI tienen diferente capacidad de calentamiento global, basada en su impacto radiactivo y su duración en la atmósfera. El GEI más conocido es el CO₂ debido a que contiene una fracción de 12/44 de carbono en su peso (IPCC, 1996).

1.5.1 Emisión de metano

El metano es un gas invernadero con una concentración atmosférica entre 1,7 o 1,8 ppm (partes por millón del volumen del aire) según datos de 2007, tiene una vida atmosférica relativamente corta de aproximadamente 12 años, que afecta directamente a los seres vivos en general, CH₄ de acuerdo a sus concentraciones en conjunto con el CO₂ generan la degradación de la capa de ozono.

Las fuentes de emisión son muy variadas pero la destrucción del gas por los radicales libres (en concreto del OH, hidroxilo) del aire es rápida, de tal manera que la vida media del metano atmosférico es de tan sólo unos 12 años (Uriarte, 2008).

Este gas tiene un potente efecto invernadero, se prevé que este resultado afecte al peso que se da en el Protocolo de Kioto a la reforestación como mecanismo secuestrador de dióxido de carbono.

El planeta se está calentando y lo hace debido a la acción del hombre, por lo cual aún no se identifican los elementos que intervienen en el proceso (Uriarte, 2008).

1.5.2 Dióxido de Carbono

El CO₂ en la atmósfera retiene el calor, en 1997 se reunieron 160 naciones en Kioto para elaborar un tratado para reducir las emisiones, Holanda propuso reducir un 80% en 40 años, mientras que en China creció su economía un 36% durante un quinquenio, hasta el 2000 redujo sus emisiones un 17%.

“El aumento del contenido de CO₂ que se verifica es un componente del cambio climático global, y posiblemente el mejor documentado. Desde mediados del siglo XIX, el aumento ha sido de 80 ppm. El balance del CO₂ es sumamente complejo por las interacciones que existen entre la reserva atmosférica de éste gas, las plantas que lo consumen en el proceso de fotosíntesis y el transferido desde la tropósfera a los océanos” (Motavalli, 2005).

Si el nivel de CO₂ aumentará en la atmósfera la estimación para el año 2100 será una concentración de unas 440 ppm, lo que equivale al 60% por encima del nivel industrial, si continúa el nivel de aumento, para el 2100 la concentración será del 100%.

1.6 Incremento en la concentración de gases de efecto invernadero

Muchas actividades humanas liberan gases de efecto invernadero, principalmente dióxido de carbono (por la quema de combustibles fósiles) y metano (por la práctica de agricultura y ganadería extensiva). El incremento en la concentración de estos gases aumenta la retención de la energía. Si más energía es retenida, el balance energético se vuelve positivo, creando la posibilidad de que la humanidad sea en parte responsable por el incremento en la temperatura del planeta observado desde la segunda mitad del siglo XXI, al final de la Pequeña Edad de Hielo e inicio de la Revolución Industrial.

1.6.1 Actividades agropecuarias y su contribución al efecto invernadero

El sector ganadero es uno de los principales responsables del efecto invernadero en el mundo y resulta más nocivo que el sector del transporte, según un informe divulgado por la Organización de Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). "El sector ganadero genera más gases de efecto invernadero, los cuales al ser medidos en su equivalente en dióxido de carbono (CO₂) son más altos que los del sector del transporte", sostiene la entidad de Naciones Unidas. La ganadería no sólo amenaza al medio ambiente sino que también es una de las principales causas de la degradación del suelo y de los recursos hídricos, sostiene la organización internacional, cuya sede

central se encuentra en Roma. Según el informe de la FAO, el estiércol del ganado es responsable de buena parte de la emisión de los gases de efecto invernadero (Huaman, 2009)

El sector ganadero es responsable del 9 por ciento del CO₂ procedente de la actividades humanas, pero produce un porcentaje mucho más elevado de los gases de efecto invernadero más perjudiciales", sostiene el informe.

El sector ganadero es el medio de subsistencia para 1.300 millones de personas en el mundo y supone el 40 por ciento de la producción agrícola mundial. Para muchos campesinos pobres en los países en desarrollo, el ganado es también una fuente de energía como fuerza de tiro y una fuente esencial de fertilizante orgánico para las cosechas.

La Organización de Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), y un grupo de investigadores de la Universidad de California comprobó que estos rumiantes contaminan cuatro veces más que un auto. Y lo hacen por medio de sus excrementos, ventosidades y eructos, a través de los cuales generan 150 kilos de gas metano al año; un estudio que se realizó en Europa concluyó que los rumiantes producen la tercera parte del metano liberado a la atmósfera. Las vacas principalmente producen gas metano cuando digieren su alimento, debido a que no poseen aire en sus estómagos y, por lo tanto, tampoco oxígeno; pero sí tienen bacterias (Huaman, 2009).

1.6.2 Gases provenientes de la ganadería

La producción de metano es parte de los procesos digestivos normales de los animales, durante la digestión, los microorganismos presentes en el aparato digestivo fermentan el alimento consumido por el animal. Este proceso conocido como fermentación entérica, produce metano como un subproducto, que puede ser exhalado o eructado por el animal. Entre las especies ganaderas, los rumiantes (bovinos, ovinos, caprinos, búfalos, camélidos) son los principales emisores de metano.

En condiciones normales, los rumiantes son alimentados con forrajes, compuestos por celulosa. El proceso de fermentación, que tiene lugar en el

rumen, ofrece una oportunidad para que los microorganismos desdoble la celulosa, transformándola en productos que pueden ser absorbidos y utilizados por el animal.

Estos organismos forman una ecología compleja, que incluye mecanismos de competición y simbiosis, su población es fuertemente influenciada por la composición de la dieta consumida por el animal.

Las bacterias metanogénicas son las responsables de la producción del metano y, si bien constituyen una fracción muy pequeña de la población microbiana total, cumplen una función muy importante, al proveer un mecanismo para eliminar el hidrógeno producido en el rumen (Berra y Finster, 2003).

1.6.3 Emisiones de gases por el manejo del estiércol

El manejo del estiércol del ganado produce emisiones de CH_4 y de N_2O . El CH_4 se produce mediante la descomposición anaeróbica del estiércol, mientras que el N_2O se forma como parte del ciclo del nitrógeno, a través de la desnitrificación del nitrógeno orgánico presente en el estiércol y en la orina del ganado. Cuando el estiércol se dispone en sistemas que promueven las condiciones anaeróbicas (por ejemplo, en forma líquida en lagunas, tanques o fosas), la descomposición de la materia tiende a producir metano. Cuando el estiércol se maneja en forma sólida (por ejemplo, almacenamiento en pilas) o queda depositado sobre las pasturas y los campos naturales, tiende a descomponerse aeróbicamente y produce muy poco o nada de CH_4 ; la temperatura y la humedad influyen en el desarrollo de las bacterias responsables de su formación. La composición del estiércol, que depende de la dieta de los animales, también afecta la cantidad de metano producido, cuanto mayor es el contenido energético y la digestibilidad del alimento, mayor es el potencial de emisión de CH_4 . Por ejemplo, los animales en feedlot, alimentados con dietas altamente energéticas, generan estiércol con gran capacidad de producción de metano, mientras que el ganado mantenido con forrajes de baja concentración energética, producen estiércol con la mitad de capacidad de formación de metano que en el caso del feedlot (Berra y Finster, 2003).

La cantidad de N_2O producido es variable, dependiendo de la composición del estiércol y la orina, del tipo de bacterias involucradas en el proceso y de la cantidad de oxígeno y líquido en el sistema de manejo (Berra y Finster, 2003). En la figura 1.1 se muestra las principales formas de expulsión de metano por parte de los rumiantes las cuales se dan al eructar y obrar debido al proceso de fermentación, que tiene lugar en el rumen, las bacterias metanogénicas son las responsables de la producción del metano y, si bien constituyen una fracción muy pequeña de la población microbiana total, cumplen una función muy importante, al proveer un mecanismo para eliminar el hidrógeno producido en el rumen.

Figura 1.1 Emisiones de gases por el manejo del estiércol



Fuente: Berra y Finster 2003.

1.7 Fuentes de emisión de gases de efecto invernadero

Los cálculos de emisiones de GEI generalmente se realizan para cinco de las seis categorías de emisión del PICC (SEMARNAT, 2006).

1. Energía: comprende dos rubros el primero es consumo de combustibles fósiles en industria, transporte, comercial/institucional, residencial y biomasa para obtener energía. El segundo es emisiones fugitivas y comprende sistemas de petróleo, gas natural y minería del carbón.
2. Procesos Industriales: comprende minerales no metálicos (cemento).
3. Agricultura: abarca la fermentación entérica, desechos animales, cultivo de arroz, quema de sabanas, quema de desperdicios agrícolas y suelos agrícolas.
4. Cambio del uso de suelo y silvicultura: tala y quema *in situ* de bosques, conversión de tierras de pastos, manejo de bosques.
5. Desperdicios o desechos: rellenos sanitarios y aguas residuales.

1.7.1 Efecto invernadero provocado por la agricultura

En México la categoría de agricultura está compuesta principalmente por las emisiones provenientes de actividades agrícolas (cultivos y manejo de suelos) y pecuarias (fermentación entérica y manejo de estiércol). Sus principales gases son CH₄ y N₂O. Esta categoría se estimó con la actualización de los factores de emisión, y los datos de actividad o datos censales de los rubros comprendidos en las actividades agrícolas y pecuarias. Para el periodo 1990–2002, las emisiones promedio de CH₄ representan 84% de la categoría y las de N₂O el 16% restante (SEMARNAT, 2006).

1.7.2 Contribución de los rumiantes al calentamiento global

El metano, uno de los gases de efecto invernadero, está en el punto de mira de los científicos. Un grupo de ellos se reunió en León para debatir si es posible reducir las emisiones de este compuesto que proceden de los rumiantes. La ganadería ocasiona entre el 30 y el 40% de todo el metano que la actividad humana expulsa a la atmósfera. El investigador argentino Diego Morgavi expuso en la Facultad de Veterinaria sus investigaciones en la materia. Un trabajo experimental que es dirigido, ha logrado reducir la producción del gas mediante la adición de aceites vegetales en la dieta de los rumiantes.

Morgavi (nacido en la Provincia de Santa Fe, en el centro de Argentina) es el director de la Unité des Recherche sur les Herbivores del Instituto Nacional de Investigación Agronómica de Francia. Un trabajo de investigación reciente dirigido por este mismo ha demostrado que es posible lograr una reducción del 30% de media en la producción de CH₄ mediante la adición de aceites vegetales que contienen altos niveles de ácidos grasos polinsaturados de la dieta de vacas lecheras. La aplicación de esta dieta, recalca el científico, es "experimental". Se ha evaluado, de forma general, si el uso de aditivos en la dieta puede producir efectos secundarios y afectar a una buena producción ganadera.

Las emisiones de metano por los rumiantes tienen un efecto considerable a nivel medioambiental debido al aporte que este gas hace al calentamiento

global y a la disminución de la capa de ozono, aspectos que llevan a cambios climáticos que afectan drásticamente, a los sistemas de producción agrícola y pecuaria.

Como se ha venido mencionando, los bovinos poseen un sistema digestivo que tiene la capacidad de aprovechar y convertir material fibroso con altos contenidos de carbohidratos estructurales, en alimentos de alta calidad nutritiva, la carne y la leche. Sin embargo, por sus características innatas, éste mismo sistema digestivo también produce metano. La emisión de metano representa energía alimenticia que se transforma en forma de gas y no es aprovechada por el animal (McCaughey *et al.*, 1999).

La eliminación de metano vía eructo en el ganado inicia aproximadamente a las cuatro semanas de vida, cuando los alimentos sólidos empiezan a ser retenidos en el retículo-rumen, aumentándose la fermentación y la producción de gases a medida que el retículo-rumen se va desarrollando. Se considera que en sistemas de producción de alta tecnificación la producción de metano en animales adultos está entre 60 y 126 kg (Johnson y Johnson, 1995). DeRamus *et al.* (2003), reportan en sus investigaciones, que las emisiones anuales de metano por novillas de carne en pastoreo estuvieron entre 32 y 83 kg. y entre 60 y 95 kg para vacas adultas, que pastoreaban diferentes tipos de praderas. El dato más alto en cada tipo de animal, corresponde a gramíneas de baja calidad nutricional, con sistemas de pastoreo continuo y baja disponibilidad forrajera, mientras que los datos más bajos corresponden a praderas mejoradas, a sistemas de pastoreo rotacional, fertilización y con alta disponibilidad de forraje. De acuerdo a las condiciones de la dieta, las emisiones de metano pueden variar ampliamente, indicando que las características nutricionales de la pastura tienen un efecto marcado en la producción de dicho gas.

McCaughey *et al.* (1999), reportan que el 87% de la producción de metano se da en el rumen, y 13% en el tracto digestivo posterior. De este último, aproximadamente el 89% es absorbido hacia la sangre y expirado a través de los pulmones. Esto indica que cerca del 98% del total de metano producido por los rumiantes puede ser expirado a través de la boca y los orificios nasales. La

producción de metano en los bovinos normalmente representa entre 5.5-6.5% del total de energía potencial consumida en la dieta; sin embargo, valores entre 2-12% se reportan en condiciones de pastoreo en zonas templadas. Pero cuando la alimentación es con forrajes de baja calidad nutritiva, la producción de metano puede representar entre el 15 y el 18% de la energía digestible (Kurihara *et al.*, 1999).

La dependencia de pH de las bacterias metanógenas, aporta un factor importante para la predicción de la producción de metano. Dietas con forrajes de baja calidad no causan una significativa disminución en el pH ruminal y están asociadas a una alta producción de metano. Mientras que dietas con altos contenidos de alimentos concentrados, generalmente disminuyen la producción de metano, pero sólo si el consumo es lo suficientemente alto para causar una reducción en el pH ruminal (Moss *et al.*, 2000).

1.7.3 Alternativas para disminuir la emisión de gases en fermentación ruminal

Diversos autores señalan que existen factores alternativos para la disminución de la metanogénesis, Johnson y Johnson (1995), mencionan que la adición de ácidos grasos polinsaturados de cadena larga disminuye la metanogénesis porque se convierte en una alternativa metabólica para el hidrógeno, dando como resultado una reducción del número de protozoos que aparentemente contribuye a una declinación en la población de metanógenas, además se supone que la toxicidad de algunos ácidos grasos de cadena larga y media sobre las bacterias metanógenas también tienen un gran efecto.

Otra de las alternativas que ha generado mucho interés es el uso de extractos de plantas naturales, reconocidos como sustancias seguras para el consumo humano, aunque existen algunos estudios que observaron cambios en la fermentación ruminal por efecto de aceites esenciales o de saponinas, existe muy poca información de los efectos de otros extractos de plantas sobre las poblaciones microbianas ruminales, así como de sus mecanismos de acción y las dosis óptimas que permitan manipular la fermentación. Durante mucho tiempo, los compuestos secundarios fueron ignorados en los trabajos de nutrición animal. El descubrimiento de que taninos (compuestos secundarios)

de *Lotus corniculatus* suelen reducir la emisión de GEI, han resultado de gran interés en la investigación sobre taninos y su efecto sobre la digestión del rumen. De acuerdo con Hess *et al.* (2002) la emisión de metano se puede reducir con el uso de frutos de árbol tropical *Sapindus saponaria* cuando se suministra en dietas con pasto de baja calidad o sin suplementación de leguminosa. Así mismo, señala que el uso de leguminosas como *Calliandra calothyrsus* puede reducir la producción de gas hasta en un 50% si se compara con una dieta de pasto solo. De acuerdo con lo expresado anteriormente, ha nacido el interés de evaluar el efecto de mezclas de leguminosas con y sin taninos y observar cual es el efecto sobre la producción de metano.

Centrándonos en los taninos, su efecto sobre la nutrición de los rumiantes puede ser beneficioso o perjudicial, dependiendo del tipo de tanino que se considere, su concentración, estructura y peso molecular, del resto de componentes de la dieta y de la especie y fisiología del animal que los consume (Hervás, 2001).

1.8 Definición y clasificación de los taninos

Los taninos son un grupo muy heterogéneo de compuestos fenólicos, con un alto peso molecular, que tienen la capacidad de formar complejos reversibles e irreversibles con las proteínas principalmente, y también con otras sustancias, tales como los polisacáridos (celulosa, hemicelulosa, pectina), alcaloides, ácidos nucleicos, minerales, entre otros. (Makkar, 2003).

Makkar *et al.* (2007) definió a los taninos como cualquier compuesto fenólico con suficiente peso molecular y suficientes grupos hidroxilo o similares capaces de formar enlaces con proteínas y otras macromoléculas en unas condiciones determinadas.

Los taninos se dividen en dos grandes grupos, cada uno englobando sustancias químicas muy diferentes, tales como:

- 1) Taninos Hidrolizables (TH): Son hidrolizables químicamente o por enzimas y están constituidos por un núcleo compuesto por un glúcido, cuyos grupos hidroxilo se encuentra esterificados con ácidos fenólicos (básicamente, ácido gálico y hexahidroxidifénico) (Makkar, 2003).

- 2) Taninos Condensados (TC), también denominados proantocianidinas: son polímeros no ramificados de hidroxiflavonoles (flan-3-ol, favan-3,4-diol), como la catequimia unidos mediante enlaces entre carbonos y carecen del núcleo glúcido que caracteriza a los taninos hidrolizables.

1.8.1 Propiedades Químicas de los taninos

Los taninos son sustancias vegetales caracterizadas químicamente como polifenoles, con un alto peso molecular y una elevada afinidad por las proteínas. Los taninos de diferentes especies vegetales poseen diferentes propiedades físicas y químicas, las cuales van a ser responsables de marcadas variaciones en su actividad biológica (Mera-Álvarez, 2004).

La elevada afinidad de los taninos por las proteínas se basa en que la molécula de tanino presenta un gran número de grupos fenólicos que proveen numerosos puntos para la formación de enlaces.

La reactividad y afinidad de estas uniones viene determinada por el tipo, concentración, estructura y peso molecular del tanino, así como por el grado de polimerización, conformación y peso molecular de la proteína. Así proteínas con una alta proporción del aminoácido prolina es la que actúa como oxidante, que conduce a la alteración de la función inmunitaria del intestino, esto, probablemente porque el peróxido de hidrógeno liberado en las reacciones es un agente citotóxico para las bacterias (Mera-Álvarez, 2004).

Además de las características propias de los taninos y de las proteínas, existen otros factores ligados al medio que condicionan la formación de los complejos tanino-proteína. Entre estos factores, el más importante es el pH.

Los complejos formados entre taninos, tanto hidrolizables como condensados, y las proteínas u otros compuestos, son generalmente inestables, con enlaces individuales que continuamente puede romperse y volverse a formar.

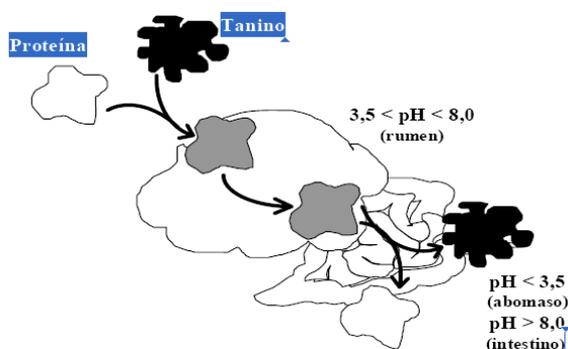
Kumar y Sing (1984) sugirieron que la formación de los complejos tanino-proteína podía producirse mediante cuatro tipos de enlace.

“EL USO DE *Tagetes erecta* L. EN EL MEJORAMIENTO DE LA FERMENTACIÓN RUMINAL IN VITRO, COMO REDUCTORA DE LAS EMISIONES DE METANO”

- 1) Puentes de hidrógeno (reversible y dependientes del pH) entre el anillo aromático del compuesto fenólicos y el oxígeno del grupo carbonilo del enlace péptido de la proteína.
- 2) Interacciones hidrofóbicas (reversibles e independientes del pH) entre el anillo aromático del compuesto fenólicos y las regiones hidrofóbicas de la proteína.
- 3) Enlaces iónicos (reversibles) entre el ion fenolato y el catión de la proteína. Este tipo de enlaces es prácticamente de los TH puesto que cuando el pH es neutro o ligeramente ácido existen grupos cargados eléctricamente como consecuencia de la hidrólisis de este tipo de taninos. En el caso de los TC la disociación del grupo hidroxilo de los compuestos fenólicos se produce sólo aun pH muy básico.
- 4) Enlaces covalentes (irreversibles) formados por la oxidación de los polifenoles o quinonas y la subsiguiente condensación con el grupo nucleofílico de la proteína.

La formación de complejos entre los taninos (hidrolizables y condensados) y las proteínas mediante enlaces no covalentes resultan estables en rangos de pH comprendidos entre aproximadamente 3.5 y 8.0. Estos complejos, estables por tanto a pH ruminal, se disocian a un pH inferior a 3.5 (como lo es el pH del abomaso: 2.5-3) o superior a 8 (como son las condiciones de pH del duodeno: ≈8), (Berra y Finster, 2003).

Figura 1.2 El rumen y sus diferentes funciones.



En la figura 1.2 se describe, el rumen, su pH, y cada una de las cavidades con las que cuenta el rumen, así mismos se hace notar las funciones de las proteínas y los taninos.

.Fuente: Berra y Finster, (2003)

1.8.2 Papel de los rumiantes en el mundo

El ganado vacuno es de especial importancia en regiones desfavorecidas gracias a su capacidad de transformar pastos de baja calidad, ricos en paja vegetal y no aprovechables para el hombre ni otros animales no rumiantes, en proteína de alta calidad.

Los rumiantes han adaptado su tracto gastro-intestinal anterior para poder degradar la celulosa a través de una simbiosis con poblaciones microbianas y poder aprovechar al máximo los productos de fermentación formados. Al localizarse el rumen anterior al intestino delgado, se pueden aprovechar la masa microbiana sintetizada a partir de la fermentación vegetal, a diferencia de otros herbívoros que fermentan la celulosa en el tracto gastro-intestinal posterior (Owens y Zinn, 2001).

Aunque la degradación de la celulosa, es uno de los mayores beneficios de la fermentación ruminal, en los países de mayor productividad, este beneficio ha pasado a ser secundario. Después de la segunda guerra mundial, los cereales se volvieron una fuente de energía barata para los rumiantes y en los países desarrollados se empezaron a incluir grandes cantidades de cereal en los piensos. De esta manera se obtenían mayores velocidades de crecimiento y se podía desligar la producción de la tierra y del pastoreo. Los cereales fermentan rápidamente y esta fermentación va asociada con una disminución en el pH ruminal, lo que conlleva una disminución de la celulolisis. La mayor ventaja de la simbiosis ruminal, pasa a un segundo plano, siendo este el caso de la producción intensiva en España (Rotger, 2005).

1.8.3 pH ruminal

El descenso del pH ruminal, observado en dietas concentradas, ha sido considerado el principal factor responsable de la disminución en la degradación de la fibra en estas dietas. Numerosos estudios *in vitro*, *in situ* e *in vivo* han observado una disminución en la celulolisis cuando el pH desciende por debajo de 6, y se ha considerado el umbral crítico para la celulolisis (Mould *et al.* 1983; Hoover, 1986; Shriver *et al.*, 1986; Russell *et al.*, 1983). Sin embargo, *in vivo* el

pH ruminal no se mantiene constante durante todo el día, sino que oscila, especialmente si la dieta es altamente fermentable o si no se da un correcto manejo de la alimentación. Para la celulolisis es más crítico la magnitud del descenso y el tiempo en que el pH está por debajo del óptimo, que el pH medio diario (De Veth y Kolver, 2000).

Las poblaciones celulolíticas pueden aguantar fluctuaciones moderadas en el pH con una leve disminución de su actividad, pero si la depresión es más severa, serán arrastradas fuera del rumen y la celulolisis se reducirá considerablemente (Hoover, 1986; Calsamiglia *et al.* 2002).

1.8.4 Fermentación ruminal

El rumen es una cámara de fermentación anaeróbica. La población microbiana se mantiene al ingerir justamente la trituración de alimentos con regularidad, añadiendo tampones así como eliminando los ácidos producidos, arrastrando los residuos alimenticios no digeribles y los productos microbianos, manteniendo las condiciones apropiadas de pH, temperatura además de la humedad para el crecimiento microbiano. Estos microorganismos dependen del rumiante para disponer de las condiciones óptimas para su crecimiento, y el rumiante depende de los productos de fermentación anaeróbica del alimento fibroso que ingiere y de la actividad biocinética microbiana, para cubrir sus propias necesidades nutritivas (Yokohama y Johnson, 1993). El metabolismo del rumiante está enfocado a aprovechar los productos de la fermentación microbiana como los ácidos grasos volátiles (AGV); sin embargo, no todos los productos de la fermentación microbiana son útiles para el rumiante, también los hay de inútiles como el metano, o incluso nocivos como el amoníaco y los nitratos (Owens *et al.*, 1998).

1.8.5 Desarrollo ruminal

La capacidad fermentadora del rumen, que hemos mencionado en el apartado de ecosistema ruminal, no está presente en el rumiante recién nacido. Al nacer,

el rumen no es un órgano funcional y el sistema digestivo y metabólico del rumiante no se diferencia de cualquier otro mamífero recién nacido.

El desarrollo ruminal se puede dividir en tres fases: fase de lactante o no rumiante (0-3 semanas); fase de transición (3-8 semanas), donde pasará de alimentarse a base de leche a alimentarse de productos vegetales; y fase de rumiante (a partir de las 8 semanas) donde ya se sustenta exclusivamente de alimentos vegetales. La duración de estas fases es aproximada y se puede manipular, como se verá con el manejo de la alimentación (Rotger, 2005).

1.8.6 Efecto de la dieta sobre las poblaciones microbianas

La dieta es el factor más determinante sobre el tipo y las proporciones de poblaciones microbianas, por lo que determina el perfil de fermentación ruminal (Yokohama y Johnson, 1993). Las diferencias son máximas entre dietas forrajeras y dietas ricas en concentrado. Las dietas forrajeras favorecen el establecimiento de una flora fibrolítica, donde predominan bacterias del género *Butyrivibrio* spp. Mientras que en dietas concentradas con bajos niveles de fibra, la concentración bacteriana es mayor, con poblaciones amilolíticas donde predominan bacterias del tipo *Selenomonas*, *Peptostreptococci* y *Lactobacilli* (McAllister *et al.*, 1994). Estas dietas suelen tener altas velocidades de digestión y de producción de ácidos, por lo que el medio se acidifica y se reducen las poblaciones celulolíticas y metanogénicas que son más sensibles al pH ácido (Van Soest *et al.*, 1992).

Ante un cambio de dieta, la población tiene que adaptarse hacia un nuevo equilibrio. El mayor riesgo se produce al introducir grandes cantidades de concentrado en animales que reciben una dieta forrajera, por su efecto sobre las bacterias que producen y utilizan lactato. En un primer momento, por efecto del descenso en el pH, desaparecen las bacterias que consumen de lactato y las amilolíticas son sustituidas por otras bacterias productoras de lactato, llevando a un descenso de pH más grave, con acidosis láctica. Pero al adaptarse, las poblaciones formadoras de lactato y las que lo utilizan se

equilibran y prácticamente no se detecta ácido láctico en el contenido ruminal (Rotger, 2005).

1.9 Poblaciones ruminales

La mayoría de microorganismos presentes en el rumen funcional son anaerobios estrictos, y estos pueden ser bacterias, protozoos u hongos. El número relativo de las diferentes especies dependerá de la composición y estructura de la dieta, así como de las múltiples interacciones entre ellos (Mould *et al.*, 1983).

1.9.1 Bacterias

En el rumen se encuentran entre 1×10^{10} y 1×10^{11} bacterias/g de contenido ruminal. Estas bacterias se pueden agrupar en 32 géneros y 63 especies, de las cuales 16 géneros y 28 especies se consideran funcionalmente importantes en términos de número y metabolismo.

Las bacterias se pueden clasificar en función del sustrato que utilizan, de los productos formados o de sus requerimientos nutricionales. En función de su principal sustrato de fermentación, se pueden clasificar en microorganismos que degradan celulosa, hemicelulosa, almidón, azúcares, ácidos intermedios, proteína, pectina o lípidos (Rotger, 2005).

Cuadro 1.1 Clasificación de las principales especies bacterianas del rumen según el tipo de substrato que fermentan

Principales especies celulolíticas	Principales especies amilolíticas	Principales especies proteolíticas	Principales especies ureolíticas	Principales especies consumidoras de azúcares	Principales especies utilizadoras de ácidos	Principales especies consumidoras de lípidos	Principales especies productoras de metano	Principales especies productoras de amoniaco
Fibrobacter succinogenes	Ruminobacter amylophilus	Ruminobacter amylophilus	Succinivibrio dextrinosolvens	Treponema bryantii	Megasphaera elsdenii	Anaerovibrio lipolytica	Methanobrevibacter ruminantium	Prevotella ruminicola
	Streptococcus bovis	Prevotella ruminicola	Selenomonas sp.	Lactobacillus vitulinus	Selenomonas ruminantium	Butyrivibrio fibrisolvens	Methanobacterium formicum	Megasphaera elsdenii
	Succinomonas amylolytica	Butyrivibrio	Prevotella ruminicola	Lactobacillus ruminus		Treponema bryantii	Methanomicrobium mobile	Selenomonas ruminantium
	Prevotella ruminicola	Fibrisolvens	Ruminococcus bromii			Eubacterium sp.		
		Streptococcus bovis	Butyrivibrio sp.			Fusocillus sp.		
						Micrococcus sp.		

Fuente: adaptado Rotger, 2005.

Aproximadamente el 75% de las bacterias se encuentran asociadas a las partículas de alimento y son las responsables, en mayor parte, de la degradación ruminal del alimento (Mould *et al.*, 1983); un segundo grupo bacteriano no tan específico, se encuentra asociado a la fase líquida y está formado por las bacterias que se han soltado de las partículas y poblaciones con altos ritmos de división que subsisten a partir de nutrientes solubles en el líquido ruminal. Finalmente, un tercer grupo de bacterias anaeróbicas facultativas adheridas al epitelio ruminal, consumen rápidamente el oxígeno que entra con el alimento y el agua, y están especializadas en degradar las células epiteliales sin intervenir activamente en la degradación del substrato. También tienen gran actividad proteasa y ureasa, mediante la cual intervienen en el reciclaje de urea proveniente del torrente sanguíneo.

1.9. 2 Inoculación y establecimiento de las bacterias

Las bacterias están presentes en el rumen desde los primeros días de vida, antes de que se inicie el consumo de alimento sólido (Anderson *et al.*, 1987). Las poblaciones predominantes a las 1-3 semanas de edad son diferentes que en los animales adultos; aproximadamente en la semana 6 ya son más parecidas y entre las semanas 9-17 las bacterias predominantes son las típicas de los animales adultos (Rotger, 2005).

El primer día de vida colonizan el rumen bacterias aeróbicas o anaeróbicas facultativas como *Streptococcus*, *Escherichia coli* y *Lactobacillus*, prácticamente no están presentes en el rumen desarrollado. Después se produce la colonización secuencial por grupos funcionales: las primeras son las amilolíticas, alcanzando un número constante a los 3 días de edad; después colonizan las bacterias incluidas dentro de los grupos reductoras de sulfato, utilizadoras de lactato (producido por las amilolíticas), fermentadoras de xileno y fermentadoras de pectina; las celulolíticas necesitan nutrientes producidos por los grupos bacterianos anteriores, por lo que colonizan el rumen a los 3-5 días de edad. En último lugar se produce la colonización de las metanogénicas que tienen una relación simbiótica con las bacterias celulolíticas y se establecerán después de éstas (Anderson *et al.*, 1987).

Aunque las bacterias están presentes desde el primer día de vida, con el consumo de alimento sólido proliferarán las poblaciones anaeróbicas estrictas y se potenciará la actividad fermentativa. Cuanto antes se inicie el consumo de alimento sólido, antes se desarrollará la población microbiana, conduciendo a una actividad metabólica más alta (Anderson *et al.*, 1987).

1.9.3 Protozoos

Los protozoos constituyen el grupo microbiano con el papel más controvertido en el rumen. El número de protozoos es de 1×10^5 - 1×10^6 células/mL de contenido ruminal, siendo la mayoría especies ciliadas. Se pueden clasificar en dos subclases, Entodiniomorfa, y Holotrica, (Hungate, 1966) (ver cuadro 1.2). Los protozoos pueden no estar presentes en el rumen o llegar a representar el 2% del peso del contenido ruminal, el 40% del nitrógeno microbiano total y proporciona el 60% de los productos de fermentación microbiana.

Sin embargo, su contribución al flujo duodenal es mínima debido a los tiempos de generación lentos y a una alta retención ruminal mediante su adhesión a las partículas de alimento o, en el caso de los holotricos, a la pared reticular durante los intervalos entre comidas.

Aunque los protozoos constituyen una parte integral de la población microbiana y tienen un papel importante en la fermentación, su beneficio para los rumiantes sigue siendo controvertido. Algunos estudios han demostrado que los protozoos aumentan la digestibilidad ruminal y el rendimiento de los animales, mientras que otros estudios no han observado ninguna diferencia entre animales defaunados y faunados. Ante esta aparente contradicción, otros autores han atribuido a los protozoos una función de estabilización de la fermentación, controlando el nivel de nutrientes y asegurando una fermentación más uniforme durante los periodos entre comidas, evitando así grandes fluctuaciones de pH (Mould *et al.*, 1983).

En el cuadro 1.2 se identifica la clasificación de los principales trofozoos ruminales de la fermentación el sustrato fermentativo más representativo es el almidón y la celulosa que se encuentra en la subclase entodiniomorfa.

Cuadro 1.2. Clasificación de los principales protozoos ruminales con los sustratos de fermentación preferentes

Subclase	Género	Sustrato fermentado
Holotrica	<i>Isotrica</i>	Almidón y azúcares
	<i>Dasytrica</i>	Almidón y azúcares
Entodiniomorfa	<i>Entodinium</i>	Almidón
	<i>Epidinium</i>	Almidón y hemicelulosa
	<i>Ophryoscolex</i>	Almidón
	<i>Diplodinium</i>	Celulosa
	<i>Eudiplodinium</i>	Celulosa
	<i>Polyplastron</i>	Celulosa

Fuente: Hungate, 1966.

1.9.4 Hongos

Se descubrió su presencia en el rumen en los años 70. Anteriormente la fase móvil o zoosporo era confundida con un protozoo flagelado y la fase vegetativa o esporangio, siempre adherida a las partículas de fibra, no era identificada al estudiar el filtrado de líquido ruminal (Mould *et al.*1983). Los géneros más frecuentes en el rumen son *Neocallimastix*, *Caecomyces*, *Pyrocyces* y *Orpinomyces*

El hecho de que los hongos no predominen en el rumen se debe a su lento tiempo de generación en comparación con las bacterias, 6-9 h contra. 0,5-3,5 h, y su paso a duodeno, considerado como muy bajo. En dietas forrajeras pueden representar el 8% de la masa microbiana, pero su número se reduce en dietas ricas en concentrado o en forrajes de alta calidad con tiempos de retención más cortos. Tienen actividad celulosa y hemicelulasa pero no pueden degradar la pectina y el ácido poligalacturónico (Fonty, 1991). No hay evidencia de que degraden la lignina,

pero sus rizoides la pueden penetrar y facilitar la degradación de la pared celular (Van Soest *et al.*, 1992).

1.9.4 Interrelaciones entre los microorganismos

Las poblaciones microbianas descritas anteriormente interaccionan en el ruminal para maximizar la eficiencia de fermentación del alimento.

Desde el punto de vista de la nutrición microbiana, pueden establecerse dos grupos de microorganismos: los que fermentan los alimentos y los que fermentan los productos de fermentación producidos por los primeros. Esta segunda población tiene una función básica eliminando los productos finales de la fermentación del primer grupo y proporcionándoles factores esenciales para su crecimiento. Es por eso que en cultivos puros se descubren muchos productos finales que no se detectan en cultivos mixtos de microorganismos ruminales. Un ejemplo de estas relaciones son los ácidos grasos volátiles de cadena ramificada (AGVR), que son producidos por las especies amilolíticas y son esenciales para las celulolíticas para la síntesis de aminoácidos o para la producción de ácidos grasos de cadena larga (Van Soest *et al.*, 1982).

CAPITULO II. MARCO JURÍDICO

En 1968 Suecia propuso una conferencia sobre el medio humano ante el consejo económico y social con apoyo del mismo, la asamblea general dictó en ese mismo año su primera resolución sobre problemas de medio humano.

La preocupación de la comunidad internacional por la degradación del medio ambiente, se reflejó en las naciones unidas que acogieron las repuestas internacionales a los problemas del medio ambiente y tras las conferencias de París 1968, Londres 1970, y las reuniones de Nueva York, Praga y Ginebra en 1971, tuvo lugar la conferencia de Estocolmo en 1972.

Para ello se crearon organizaciones especializadas con lo que se institucionalizo el PNUMA con sede en Nairobi, Kenya y se estableció el día mundial del medio ambiente. Las naciones unidas han creado en colaboración con el PNUMA un Centro Internacional de Formación de Ciencias Ambientales (CIFCA) para los países hispanos.

Es importante hacer mención de la Ley General de Equilibrio Ecológico y Protección al Ambiente donde en el Capítulo II en distribución de competencias y coordinación en el artículo 8 en el apartado III se manifiesta la aplicación de la disposiciones jurídicas en materia de prevención y control de la contaminación atmosférica generada por fuentes fijas que funcionen como establecimientos mercantiles o de servicios, así como de emisiones de contaminantes a la atmósfera provenientes de fuentes móviles que no sean consideradas de jurisdicción federal, con la participación que de acuerdo con la legislación estatal corresponda al gobierno del estado.

2.1 Protocolo de Montreal

En septiembre de 1987, el PNUMA realizo esfuerzos de negociación para desarrollar obligaciones vinculantes que condujeron a la adopción del “Protocolo de Montreal el cual se basó en combatir las sustancias que agotan la Capa de Ozono”; en él se entiende, un acuerdo internacional que limita, controla y regula la producción, el consumo y el comercio de sustancias que agotan la capa de Ozono; éste fue adoptado el 16 de septiembre de 1987 y entró en vigor el 1° de enero de

1989. México el 31 de marzo de 1988, fue de los primeros países en ratificar el Protocolo de Montreal.

Este instrumento divide a los países en dos grandes grupos: los desarrollados en el "Art. 2, en donde establece que cada parte se asegurará de que, en el período de 12 meses contados a partir del primer día del séptimo mes siguiente a la fecha de entrada en vigor del presente Protocolo, y en cada período sucesivo de 12 meses, su nivel calculado de consumo de las sustancias controladas que figuran en el Grupo I del anexo A no supere su nivel calculado de consumo de 1986".

El PNUMA menciona que "Al final del mismo período, cada parte que produzca una o más de estas sustancias se asegurará de que su nivel calculado de producción de estas sustancias no supere su nivel calculado de producción de 1986, aunque ese nivel puede haber aumentado en un máximo del 10% respecto del nivel de 1986. Dicho aumento sólo se permitirá a efectos de satisfacer las necesidades básicas internas de las Partes que operen al amparo del artículo 5 y a fines de racionalización industrial entre las partes y por otro lado se encuentra el Art. 5, en donde se estipula que, toda parte que sea un país en desarrollo y cuyo nivel calculado de consumo anual de las sustancias controladas el consumo sea inferior a 0.3 kg/hab. en la fecha en que el Protocolo entre en vigor para dicha parte, o en cualquier otra fecha a partir de entonces hasta el 1º de enero de 1999, tendrá derecho, para satisfacer sus necesidades básicas internas, sobre esta base los países asumen compromisos, con diferencia de 10 años entre unos y otros, de reducción en producción y consumo de las sustancias agotadoras de la capa de ozono, como los CFC's, Halones, HCFC's y el Bromuro de metilo, entre otros".

El Protocolo de Montreal y sus enmiendas identifican una serie de compuestos dañinos para la capa de ozono (ODS o SAO), Por otro lado, establece claramente los plazos y los niveles de producción y consumo de ODS permitidos a saber:

- Los países que operan al amparo del Art. 5 párrafo 1 no podrán incrementar su consumo en los años venideros y, en todo caso, deberán cesar su consumo en el año 2010.
- Estas sustancias podrán ser utilizadas sólo en fines esenciales para los cuales no existan sustitutos en el mercado.

“El Protocolo fija también el itinerario detallado de reducción de SAO fijado por el Protocolo y sus enmiendas. En el caso de los HCFC (sustancias de bajo potencial agotador de ozono, consideradas como de transición), el calendario de reducción es más flexible y paulatino, alcanzando una eliminación total el año 2030”.

“Asimismo, desde 1990, los productos en aerosol distribuidos en México utilizan propelentes alternativos, y a partir de 1997, todos los refrigeradores domésticos y comerciales producidos en el país se encuentran libres de CFC’s.

Gracias a la ejecución de proyectos en los sectores de solventes y espumas de poliuretano, a partir de 2005 se eliminó en México el uso de CFC’s en ambos sectores” (PNUMA, 2000).

2.2 Protocolo de Kioto

La convención de las Naciones Unidas sobre el cambio climático fue adoptada en Nueva York el 9 de mayo de 1992, cuando comenzaron a aportarse datos científicos que preveían un posible cambio climático permanente e irreversible a escala mundial, causado por el aumento de GEI’s provenientes principalmente de las actividades humanas como lo son, la agricultura y el cambio de uso de suelo.

El objetivo principal es estabilizar las concentraciones de estos gases en la atmósfera a nivel que ya no exista interferencia antropogénica significativa en el sistema climático.

Cuando se adoptó la convención, los gobiernos sabían que sus compromisos no serían suficientes para abordar en serio los problemas del cambio climático. En la Conferencia de la Parte 1 (CP1) (UNFCCC, 2007), en una decisión conocida con el nombre de Mandato de Berlín, las partes pusieron en marcha una nueva ronda de conversaciones para decidir la adopción de compromisos firmes y más detallados para los países industrializados. Después de dos años y medio de negociaciones intensas, se adoptó el protocolo de Kioto en la CP3 de Kioto (Japón), el 11 de diciembre de 1997.

No obstante, debido a la complejidad de las negociaciones, quedaron “pendientes” un considerable número de cuestiones, incluso después de la adopción del Protocolo de Kioto. En éste se esbozaban los rasgos básicos de sus “mecanismos” y

el sistema de cumplimiento, por ejemplo, pero no se especificaban las trascendentales normas que regulaban su funcionamiento. Aunque 84 países firmaron el Protocolo, muchos se resistieron a dar ese paso y hacer que el Protocolo entrara en vigor, antes de tener una idea clara sobre las normas del tratado. Por ello, se inició una nueva ronda de negociaciones para especificar las normas concretas del protocolo de Kioto, que se organizó en paralelo con las negociaciones sobre las cuestiones pendientes en el marco de la convención. Esta ronda culminó finalmente en la CP7 con la adopción de los acuerdos de Marrakech, en que se establecían normas detalladas para la aplicación del Protocolo de Kioto. Como se ha examinado más arriba, los acuerdos de Marrakech adoptaron también algunas medidas importantes para la aplicación de la Convención (UNFCCC, 2007).

2.2.1 Disposiciones del Protocolo de Kioto y sus normas

El Protocolo de Kioto de 1997 tiene los mismos objetivos, principios e instituciones de la convención de Montreal, pero refuerza ésta de manera significativa ya que a través de él, se comprometen a lograr objetivos individuales y jurídicamente vinculantes para limitar o reducir sus emisiones de GEI's. Sólo las partes a la convención de Montreal, que sean también partes al protocolo (es decir, que lo ratifiquen, acepten, aprueben o adhieran a él) se ven obligadas por los compromisos del protocolo de Kioto.

Entre todos suman un total de recorte de las emisiones de gases de efecto invernadero de al menos el 5% con respecto a los niveles de 1990 en el periodo de compromiso de 2008-2012.

La principal característica del protocolo es que tiene objetivos obligatorios relativos a las emisiones de gases de efecto invernadero para las principales economías mundiales que lo hayan aceptado. Estos objetivos van desde -8% hasta +10% del nivel de emisión de los diferentes países en 1999 "con miras a reducir el total de sus emisiones de esos gases a un nivel inferior en no menos de 5% al de 1990 en el período de compromiso comprendido entre el año 2008 y el 2012". En casi todos los casos, incluso en los que se ha fijado un objetivo de +10% de los niveles de 1990, los límites exigen importantes reducciones de las emisiones actualmente proyectadas. Se prevé el establecimiento de objetivos obligatorios futuros para los

“períodos de compromiso” posteriores a 2012. Éstos se negociarán con suficiente antelación con respecto a los períodos afectados.

Los compromisos contraídos en virtud del Protocolo varían de un país a otro. El objetivo global del 5% para los países desarrollados debe conseguirse mediante recortes (con respecto a los niveles de 1990) del 8% en la Unión Europea (UE), Suiza y la mayor parte de los países de Europa central y oriental; 6% en Canadá; 7% en los Estados Unidos (aunque posteriormente los Estados Unidos retiraron su apoyo al protocolo), y el 6% en Hungría, Japón y Polonia. Nueva Zelanda, Rusia y Ucrania deben estabilizar sus emisiones, mientras que Noruega puede aumentarlas hasta un 1%, Australia un 8% (posteriormente retiró su apoyo al protocolo) e Islandia un 10%. La UE ha establecido su propio acuerdo interno para alcanzar su objetivo del 8% distribuyendo diferentes porcentajes entre sus estados miembros. Estos objetivos oscilan entre recortes del 28% en Luxemburgo y del 21% en Dinamarca y Alemania a un aumento del 25% en Grecia y del 27% en Portugal.

Para compensar las duras consecuencias de los “objetivos vinculantes”, el acuerdo ofrece flexibilidad en la manera en que los países pueden cumplir sus objetivos. Por ejemplo, pueden compensar parcialmente sus emisiones aumentando los bosques, que eliminan el dióxido de carbono de la atmósfera. Ello puede conseguirse bien en el territorio nacional o en otros países. Pueden pagar también proyectos en el extranjero cuyo resultado sea una reducción de los gases de efecto invernadero. Se han establecido varios mecanismos con este fin (véanse los apartados sobre “comercio de derechos de emisión”, el “Mecanismo para un desarrollo limpio” y la “aplicación conjunta”).

El Protocolo de Kioto ha avanzado lentamente: se encuentra todavía en lo que se conoce con el nombre de “fase de ratificación”, y es un acuerdo complicado. El Protocolo no sólo debe ser eficaz frente a un problema mundial tan complicado; debe ser también políticamente aceptable. En consecuencia, se ha multiplicado el número de grupos y comités creados para supervisar y arbitrar sus diferentes programas, e incluso después de la aprobación del acuerdo en 1997, se consideró necesario entablar nuevas negociaciones para especificar las instrucciones sobre la manera de instrumentalizarlo. Estas normas, adoptadas en 2001, se conocen con el nombre de “Acuerdos de Marrakech”.

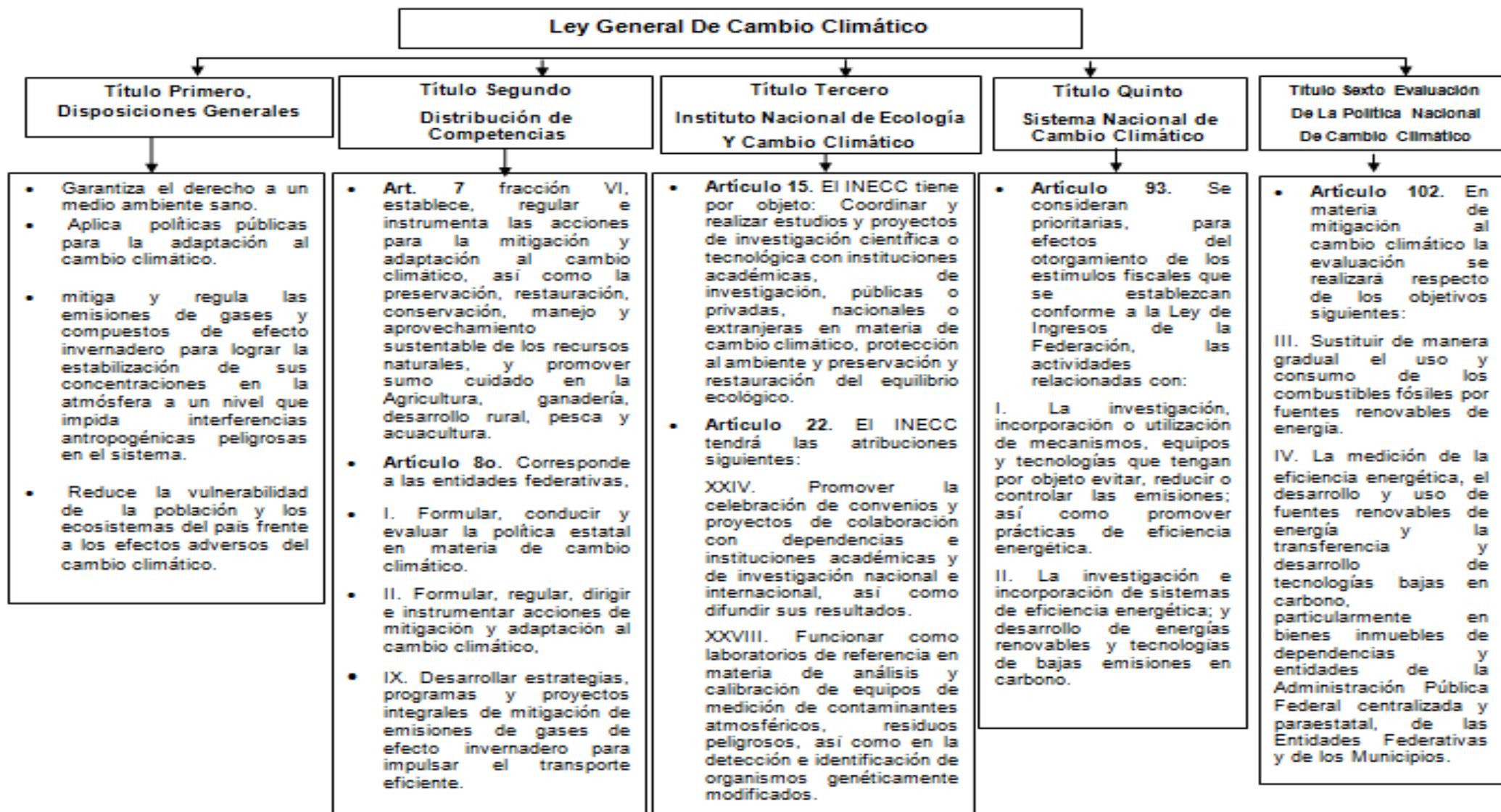
Los tratados internacionales deben tratar de conseguir un delicado equilibrio. Los que se proponen conseguir un apoyo general muchas veces no son lo bastante enérgicos como para resolver los problemas que tratan de solucionar (como se consideraba que la convención Marco presentaba esa deficiencia, a pesar de sus numerosas y valiosas disposiciones, se creó el protocolo con la finalidad de complementarla). En cambio, los tratados con disposiciones firmes pueden tener problemas a la hora de conseguir el apoyo necesario para que resulten eficaces.

Lo que ahora se necesita realmente es que el Protocolo consiga ratificaciones suficientes para entrar en vigor. Lo mismo que el Protocolo en general, esta materia es complicada. El Protocolo será jurídicamente vinculante cuando lo hayan ratificado no menos de 55 países, entre los que se cuenten países desarrollados cuyas emisiones totales representen por lo menos el 55% del total de las emisiones de dióxido de carbono en 1990. Ello no ha ocurrido todavía. El principal problema es que deben decidir adherirse más naciones industrializadas que se verán afectadas por los límites de emisión del protocolo. Una segunda preocupación es que los Estados Unidos y Australia han manifestado que no apoyarán ya el tratado.

Al mismo tiempo, una novedad positiva es que algunos mecanismos del protocolo cuentan con apoyo suficiente y se están estableciendo antes incluso de la entrada en vigor del protocolo. Por ejemplo, el mecanismo para un desarrollo limpio a través del cual los países industrializados pueden cumplir en parte sus objetivos vinculantes de emisión mediante "créditos" obtenidos patrocinando proyectos que reducen las emisiones de gases de efecto invernadero en los países en desarrollo cuentan ya con una junta ejecutiva que está preparando algunas propuestas (UNFCCC, 2007).

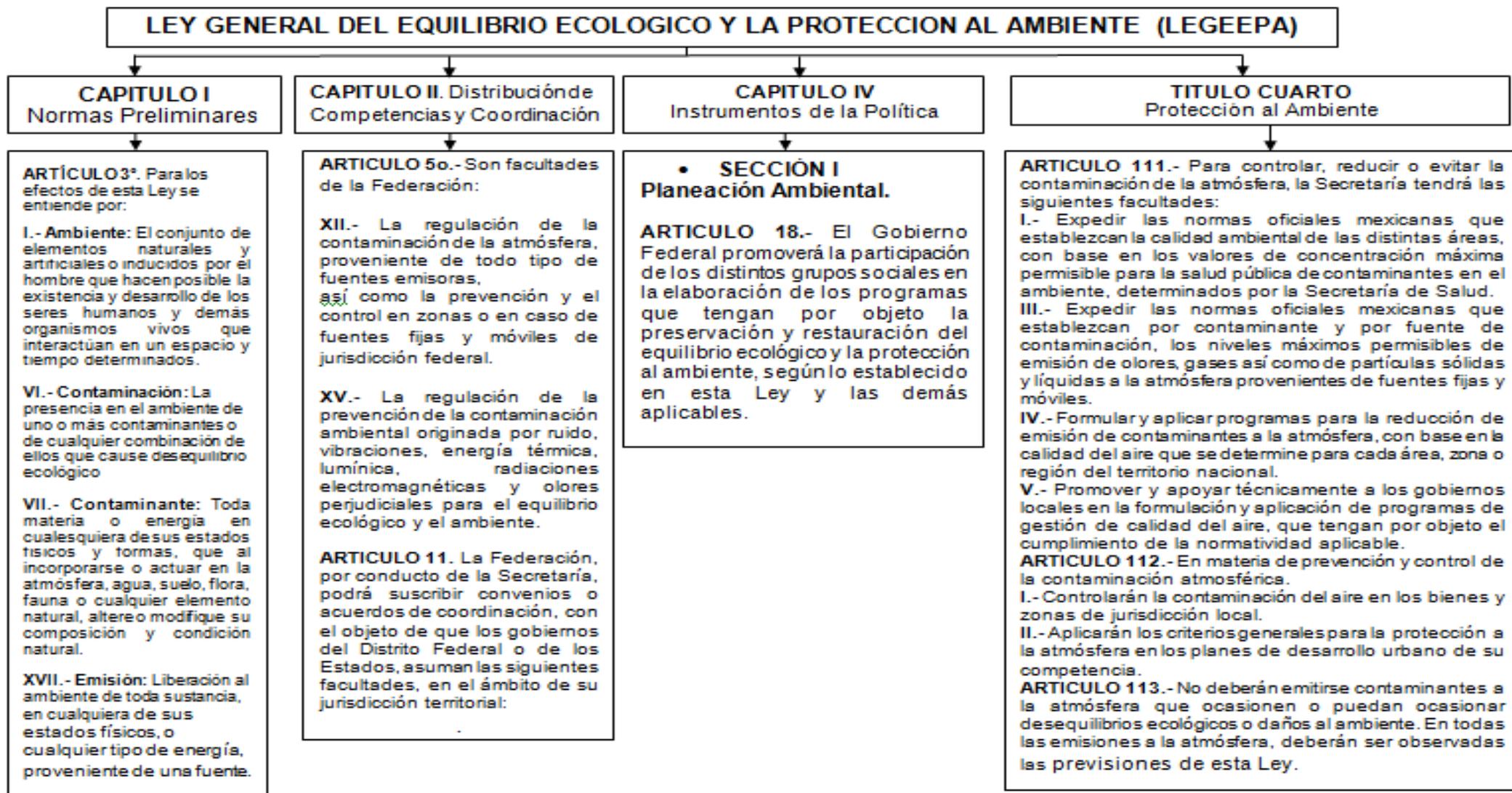
2.3. Ley General De Cambio Climático

En el cuadro 2.3 se presenta la normatividad y parámetros generales de la evaluación de contaminación del medio ambiente establecida por la Ley General De Cambio Climático, y sus diferentes artículos basados en emisiones de GEI hacia la atmosfera.



2.4 Ley General del Equilibrio Ecológico Y Protección al Ambiente

El cuadro 2.4 nos presenta la normatividad y regulación a seguir para un mejor cuidado del equilibrio ecológico.



CAPITULO III. REFERENTES BASADOS EN LA FERMENTACION RUMINAL

3.1 Estimación de la emisión de gases de efecto invernadero en el municipio de montería (Córdoba, Colombia).

Este estudio fue realizado en Córdoba Colombia específicamente en el municipio de Montería.

El desarrollo económico de Montería se basa en la ganadería y en un comercio activo de hecho es considerada la capital ganadera de Colombia y allí se celebra cada año la feria y reinado nacional de la ganadería.

Montería tiene una decidida vocación ganadera alentada por la fecundidad de sus tierras que hacen parte de uno de los valles más fértiles del mundo, principalmente se desarrolla la ganadería bovina (de leche, carne y doble propósito). Para llevar a cabo el conteo de sus emisiones se realizó dentro del proyecto un inventario de emisiones.

3.1.1 Inventario de emisiones

Un inventario de emisiones es un listado actualizado y amplio de las emisiones de contaminantes atmosférico por fuente de un área geográfica específica durante un intervalo de tiempo determinado. Así mismo un inventario de emisiones es el elemento base para desarrollar un programa de calidad de aire consistente y con posibilidades de establecer estrategias de reducción pertinentes, equitativas y eficaces de las emisiones producidas por la industria, el comercio, parque automotor y las actividades agropecuarias.

Entre las actividades más relevantes en la emisión de gases de efecto invernadero están el uso de combustibles, los procesos de transformación en la industria, algunas actividades agrícolas y pecuarias, la disposición de residuos sólidos y la explotación de los bosques.

El uso de combustibles fósiles produce gases de efecto invernadero, pues para obtener la energía que contienen estos materiales y convertirla en vapor, electricidad y movimiento es necesario someter los combustibles al proceso de combustión.

Entre las actividades agrícolas y pecuarias que más contribuyen a la emisión de gases de efecto invernadero están la ganadería intensiva el cultivo de arroz y la quema de sabanas, en la ganadería se produce metano durante el proceso digestivo de los animales y en el manejo del estiércol, al igual que en los cultivos de arroz cuando la cosecha se realiza bajo régimen de inundación por la descomposición anaeróbica de la materia orgánica presente bajo el agua.

3.1.2 Factores de emisión

Los factores de emisión correspondiente a cada proceso se buscaron en la base de datos FIRE 6.24 (AirCHIEF). Para el cálculo de las emisiones generadas por la actividad ganadera se utilizaron los siguientes factores de emisión: Para el cálculo de las emisiones generadas por la actividad ganadera se utilizaron los siguientes factores de emisión (ver cuadro 3).

En el cuadro 3 se expresan las diversas emisiones producidas por ganado lechero, en donde se observa que la mayor emisión de gas CH₄, se presenta en los animales de menor o igual a 24 meses.

Cuadro 3.1 Factores de emisión para actividades agropecuarias (ganadería)

Factores de emisión (kg/cabeza-año)				
CH ₄ (fermentación entérica)			CH ₄ (excretas)	N ₂ O (excretas)
0-12 meses	12-24 meses	≥ 24meses		
21	61.8	111	1.5	0.5

Fuente: Echeverría, 2006.

La emisión estimada de gases de efecto invernadero a través del modelo IVE (International Vehicle Emission Model) para algunas categorías de fuentes móviles. Las fuentes móviles aportan alrededor de 43,134 toneladas al año, de las cuales el 99.63% es CO₂ (ver cuadro 4).

El cuadro 4 nos muestra las principales fuentes de emisión de los GEI's, considerando que la mayor emisión de CO₂, se da en los vehículos, en comparación con la ganadería, se refleja un mayor porcentaje de CH₄ en toneladas por año por esta actividad.

Cuadro 3.2 Emisión de gases de efecto invernadero por tipo de fuente

Fuente	CO ₂		N ₂ O		CH ₄		Total	
	(ton/año)	%	(ton/año)	%	(ton/año)	%	(ton/año)	%
Vehículos	42975.52	100	0.17	0	158.3	0.4	43134	50.4
relleno sanitario	0	0	0	0	3088	7.7	3088	3.6
Vegetación	0	0	2017.4	88.8	384.2	1	2401.6	2.8
Ganadería	0	0	253.2	11.2	36725.1	91	36978.3	43.2
Total	42975.52	100	2270.77	100	40355.6	100	85601.9	100

Fuente: Echeverría, 2006.

3.2 Efectos de extractos de plantas sobre las características de fermentación microbiana ruminal en sistemas *in vitro*

En dos estudios *in vitro* y dos *in vivo* se evaluó los efectos de extractos de plantas sobre las características de la fermentación microbiana ruminal. Se midieron las concentraciones de AGV, péptidos largos, péptidos cortos y número de protozoos, la ingestión de MS y el consumo de agua. En el primer experimento se utilizaron 8 fermentadores de doble flujo continuo en 4 periodos de 10 días para determinar los efectos de 15 mg/Kg de extractos de ajo, canela, yuca, anís, orégano, o pimienta sobre la fermentación microbiana ruminal. Después de 6 días la yuca incremento un 26% de las concentraciones. En el segundo experimento los mismos extractos de plantas y tres compuestos secundarios puros (anetol, cinnamaldehído y ugenol) se

evaluaron a cinco dosis a dos niveles de pH en concentrados, cuando el pH fue 7.0 los efectos de los extractos de las plantas sobre el perfil de fermentación no resultaron favorables para los objetivos de los sistemas engorden.

En el tercer experimento 30g/d de extracto de la alfalfa, una mezcla de 180 mg/d y 90 mg/d y una combinación de ambos tratamientos se evaluaron en terneros holstein de 360 +/- 22 Kg de peso vivo y provistos de un trocar en el rumen. Ningún tratamiento afecto al pH ruminal a la concentración de los ácidos grasos totales ni al proporción de butirato, se incrementa el consumo de agua, se redujo la proporción de acetato y las concentraciones de ácidos grasos de cadena ramificada.

De acuerdo a los resultados que se arrojaron de los cuatro experimentos indican que los extractos de plantas que fueron seleccionados para ser potencialmente incorporados en dietas para terneros de cebo intensivo pueden variar sus efectos en función de la dieta y del ambiente ruminal, logran ser útiles como modificadores de la fermentación ruminal en los sistemas de cebo intensivo de terneros.

3.2.1 La agricultura y la ganadería como origen de gases con efecto invernadero

El N_2O se forma en los procesos microbianos de nitrificación: oxidación de N-amoniaco (NH_4^+) a nitratos (NO_3^-) y de desnitrificación: reducción de NO_3^- y NO_2^- hasta N molecular (N_2) y procede en su mayor parte del abonado químico de los cultivos y en una pequeña proporción de la fertilización orgánica. Las emisiones de N_2O aumentan en proporción a los aportes de N al terreno, y depende de numerosos factores, tales como la aireación del suelo (el proceso sólo se produce en condiciones aerobias), la temperatura, el pH y la humedad del suelo. Al efecto contaminante del N_2O como gas con efecto invernadero debe añadirse además el hecho que participa de forma activa en la destrucción de la capa de ozono (Johnson y Johnson, 1995).

El metano se forma en procesos de fermentación anaerobia que tienen lugar en los animales (fermentación entérica) y en el estiércol, pero también de la fermentación de material celulósico en arrozales y terrenos pantanosos, o se libera por fugas en los yacimientos de energía fósil (gas natural, gas grisú). La contribución

relativa de las principales fuentes de metano se presenta en el cuadro 4. Como puede apreciarse, la ganadería es responsable en España de una parte significativa de las emisiones de CH₄ (del orden de un 60% del total, incluyendo tanto la fermentación entérica como la gestión del estiércol). (Johnson y Johnson, 1995).

CAPITULO IV. METODOLOGÍA

4.1 Fase 1 : Recolecta de muestras

La colecta de las muestras fue realizada en 4 potreros de la Localidad de Rincón de Aguirre, municipio de Tejupilco durante el 2009.

4.1.1 Selección de las especie nativa tanífera

La especie *Tagetes erecta* se seleccionó debido a los resultados obtenidos por Figueroa (2008) (comunicación personal), donde evaluó las especies nativas presentes en los potreros de la localidad de Rincón de Aguirre Tejupilco, debido a su alto consumo por vacas lecheras (índice de selección) y por su contenido de metabolitos secundarios. De las 98 especies que se presentaban en los potreros se eligió a *Tagetes erecta* ya que tuvo un índice de selección del 12.48%, el contenido de taninos condensados fue del 1.3% y de taninos totales del 7.3 % (Andrade-Rivero et al., 2012).

4.1.2 Toma de muestras

De cada uno de los cuatro potreros seleccionados, se colectaron al menos 100 individuos de *Tagetes erecta* al azar en el periodo comprendido de agosto a octubre de 2009, y que cumplieran con la condición de estar en la etapa de floración para asegurar la colecta de la especie. Las muestras se colocaron cuidadosamente en bolsas de papel y se trasladaron al laboratorio del Instituto de Ciencias Agropecuarias y Rurales (ICAR) de la Universidad Autónoma del Estado de México.

Las muestras de *Cynodon plectostachyus* (pasto considerado como la base del forraje para los experimentos de inclusión) se colectó de los mismos potreros y en las mismas fechas. Se trasladaron al laboratorio del ICAR en las mismas condiciones anteriormente descritas.

4.2 Fase 2: Secado de las muestras

El *Cynodon plectostachyus* se secó en estufa de tiro forzado de la marca Riossa, modelo HCF-82D a una temperatura de 60° C hasta obtener su peso constante. Las

plantas de *Tagetes erecta* se secaron en secadoras botánicas a 30°C dentro de bolsas de papel y hasta que se obtuvo su peso constante, esto con la finalidad de no alterar el contenido de metabolitos secundarios de esta especie (Williams, 2000).

4.2.1 Molienda del sustrato

Una vez secas las muestras de *Tagetes erecta* se molieron en un molino Willey a un tamaño de partícula de 1 mm y se almacenaron a -4°C hasta su uso. El forraje de *Cynodon plectostachyus* seco se molió con una picadora utilizándose un molino estacionario General Electric, modelo 5KH39QN5525, las muestras se almacenaron a temperatura ambiente hasta su uso.

4.3 Fase 3: Extracción y cuantificación de taninos

Para determinar el contenido de taninos de *Tagetes erecta* se utilizó la técnica descrita por Makkar (2003), la cual consiste en el siguiente procedimiento:

- a) Colecta del material: se define el estado de madurez de la planta para colectarse.
- b) Secado del material: las muestras se secaron bajo sombra en un lugar con poca humedad. Las muestras se almacenaron con un porcentaje mayor al 90% de contenido de materia seca, en un lugar frío, oscuro y seco.
- c) Molienda del material: se molieron aproximadamente 500 g y se tamizó por una malla de 2 mm. El material molido incluyendo los restos que quedaron dentro de la malla se tomaron y se mezclaron nuevamente, aproximadamente 100 g de esta muestra se molió y tamizó en una malla de 0.5 mm. Ésta muestra se tomó para el análisis de los taninos.
- d) Extracción de taninos: se usó acetona acuosa al 70% (v/v) para todos los análisis excepto para el análisis de la precipitación de proteínas fenólicas. Para esos dos ensayos se usó metanol acuoso al 50% (v/v), dado que la acetona interfiere en el proceso de formación del complejo.
- e) Después de secado y tamizado, 200 mg de muestra se colocaron en un vaso de precipitado de 25 mL. Se agregaron 10 mL de acetona acuosa 70% (v/v) al vaso de precipitado y se suspendió en baño de agua ultrasónico durante 20 minutos a

temperatura ambiente. El contenido del vaso se transfirió a tubos para centrifugar durante 10 minutos a 3000 rpm a 4 °C, pasado ese tiempo se colectó el sobrenadante y se colocó en hielo. El pellet contenido en los tubos se transfirió a un vaso de precipitado usando dos porciones de 5 mL cada una con acetona acuosa al 70% (v/v) y de nuevo se sometió el contenido a un tratamiento ultrasónico por 20 min. Se centrifugó y colectó el sobrenadante como se describió anteriormente. El método de Folin-Ciocalteu se usó para la determinación de fenoles totales en los dos sobrenadantes.

4.3.1 Medición de fenoles totales y taninos usando el método de Folin-Ciocalteu

El método de fenoles totales es usado para conocer la eficiencia de extracción de los taninos en solventes. Este método puede ser acompañado con el uso de una Matrix insoluble, polivinil polipyrrolidone (PVPP; une taninos-proteínas). Los resultados se expresan en ácido tánico equivalente.

4.3.2 Reactivos

- **Reactivo Ciocalteu (1N).** Reactivo Folin-Ciocalteu (2N) disponible comercialmente diluido con un volume igual de agua destilada. Este reactivo se transfiere en una botella oscura y se almacena en refrigeración (4°C).
- **Carbonato de Sodio (20%).** Se pesaron 40 g de carbonato de sodio ($\text{x10.H}_2\text{O}$) y se disolvieron en 150 mL de agua destilada.
- Polivinil Pirrolidone (PVPP) insoluble.
- **Solución Estándar de ácido tánico (0.1 mg/mL).** Se disolvieron 25 mg de ácido tánico (TA) en 25 mL de agua destilada y entonces se diluyeron 1:10 en agua destilada.

4.3.3 Análisis de fenoles totales

Se preparó el extracto de taninos del material vegetal como se mencionó en la sección anterior (Makkar 2003).

Se tomó una alícuota convenientemente del extracto que contenía taninos (inicialmente tratados con 0.02, 0.05 y 0.1) en tubos de ensaye, se llevó a un

volumen de 0.5 mL con agua destilada, se agregaron 0.25 mL del reactivo Folin Ciocalteu y luego 1.25 mL de solución de carbonato de sodio. Se agitaron los tubos en Vortex y se leyó la absorbancia a 725 nm después de 40 min. El cálculo de la cantidad de fenoles totales se realizó como equivalente de ácido tánico con la curva de calibración. El contenido de fenoles totales se expresó en porcentaje de materia seca.

4.3.4 Determinación de taninos totales

Para esta determinación fue fundamental saber que el PVPP se usa para enlazar taninos. Se pesaron 100 mg de PVPP en un tubo de ensaye de 100 x 12 mm. Se agregaron a este 1.0 mL de agua destilada y luego 1.0 mL del extracto que contenía taninos (100 mg de PVPP es suficiente para enlazar 2 mg de fenoles totales; indicando así que, el contenido de fenoles totales en el material vegetal es más del 10 % de MS, con esto se demuestra que se diluyó el extracto apropiadamente). Se agitó y se conservó el tubo a 4 °C por 15 min. Se agitó de nuevo, y se centrifugó (3000 rpm por 10 min.), se colectó el sobrenadante. Este sobrenadante tuvo sólo fenoles simples y no taninos (los taninos se precipitaron con el PVPP; el procedimiento para enlazar los taninos al PVPP se modificó, (la modificación fue enlazar los taninos al PVPP a un pH de 3 puesto que el PVPP enlaza al máximo los taninos a este pH). Se midió el contenido de fenoles del sobrenadante mencionado arriba (se tomaron al menos el doble de volumen para la estimación de los fenoles totales, porque ya se había diluido el extracto dos veces y se espera la pérdida de taninos-fenoles a través del enlace con el PVPP). Se expresó el contenido de fenoles sin taninos en porcentaje de MS.

4.4. Fase 4 Evaluación de una dieta base en fermentación in Vitro

Se realizó la formulación de una dieta en similares condiciones, a la que consumen los animales en el sur del Estado de México.

En diversos experimentos se ha comprobado que una de las formulaciones que mejores resultados ha dado en la producción de leche para el caso de las vacas de la región sur del Estado de México es con 60% de forraje y 40% de concentrado. El

concentrado consistió en: 24% de maíz, 10.8% de soya, 4% de melaza y 1.2% de urea. El forraje fue pasto estrella de África (*Cynodon plectostachyus*). Las variables a evaluar en la dieta fueron:

- a) producción de gas,
- b) cinética de fermentación
- c) producción de CH₄, esta determinación se realizó por la técnica de cromatografía de gases (CG).

Las dos primeras variables se determinaron por la técnica *in vitro* de producción de gas.

4.4.1 Técnica de producción de gas *in vitro*

La evaluación de la fermentación se realizó por la técnica de producción de gas *in vitro*, empleando un transductor de presión y variantes del sistema descrito por Theodorou *et al.* (1994), que permitieron determinar la extensión y la cinética de fermentación del alimento, además de que permitieron determinar el volumen de gases generados.

4.4.2 Preparación del medio

El medio se preparó un día antes del inicio del experimento de acuerdo con las recomendaciones de Mauricio *et al.* (2001). La solución amortiguadora se preparó utilizando bicarbonato de sodio en polvo, bicarbonato de amonio en polvo, fosfato de sodio dibásico y fosfato de potasio monobásico, un agente reductor, una fuente de nitrógeno, varios minerales como cloruro de calcio (CaCl₂ 2H₂O), cloruro de magnesio (MnCl₂ 4H₂O), cloruro de hierro (FeCl₂ 6H₂O), cloruro de cobalto (CoCl₂ 6H₂O) y resazurina como indicador de potencial redox. El medio se agitó para permitir la completa mezcla de las soluciones, la solución se saturó con CO₂ por aproximadamente veinte minutos para simular las condiciones de anaerobiosis del rumen. Posteriormente se agregó una solución reductora (H₂O+Na₂S+NaOH 1N) hasta adquirir primero una leve tonalidad rosa y posteriormente completamente transparente, esto con la finalidad de estabilizar el pH de la solución total a 6.8 para mantener una simulación de las condiciones idóneas del rumen.

4.4.3 Preparación de los frascos de incubación

La incubación se realizó en frascos de vidrio con capacidad de 110 ml. Un día antes del inicio del experimento se adicionaron manualmente a cada frasco 90 ml de medio de cultivo mediante la utilización de un dispensador automático. Los frascos previamente se prepararon con 0.999 gr del sustrato a evaluar. Los frascos se sellaron con tapas de caucho y se mantuvieron en refrigeración a 4° C para evitar cualquier tipo de fermentación. Cinco horas antes de la inoculación los frascos se removieron del refrigerador y se llevaron a una estufa de tiro forzado a 39° C.

4.4.4 Preparación del inóculo e inoculación

El líquido ruminal se retiró de dos vacas fistuladas de raza Limousin y Holstein mantenidas en la Posta de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma del Estado de México. Los animales donadores se alimentaron con 4.400Kg de heno de alfalfa, 6Kg de paja de avena, 1.600Kg de maíz molido y 400g de concentrado de soya. El líquido ruminal se retiró manualmente de varias partes del rumen y se almacenó en termos. Después de la colecta, el líquido ruminal se filtró a través de dos capas de manta de cielo. El líquido ruminal se mantuvo en baño maría a 39° C y se saturó con CO₂. Este procedimiento se realizó para garantizar que el inóculo resultante estuviera compuesto por microorganismos ruminales adheridos y no adheridos a la fibra (Theodorou *et al.*, 1994). Los frascos con el medio y el sustrato se inocularon con 10 ml de líquido ruminal utilizando una jeringa graduada, se agitaron manualmente y se transfirieron a un baño maría 39° C.

4.4.5 Blancos

Una serie de botellas blanco conteniendo medio e inóculo pero no sustrato, fueron incluidas. El promedio de gas registrado por los blancos, se substrajo, desde el total de gas producido por los sustratos evaluados, obteniendo así el total de gas realmente derivado desde la fermentación del sustrato.

4.4.6 Lecturas de producción de gas

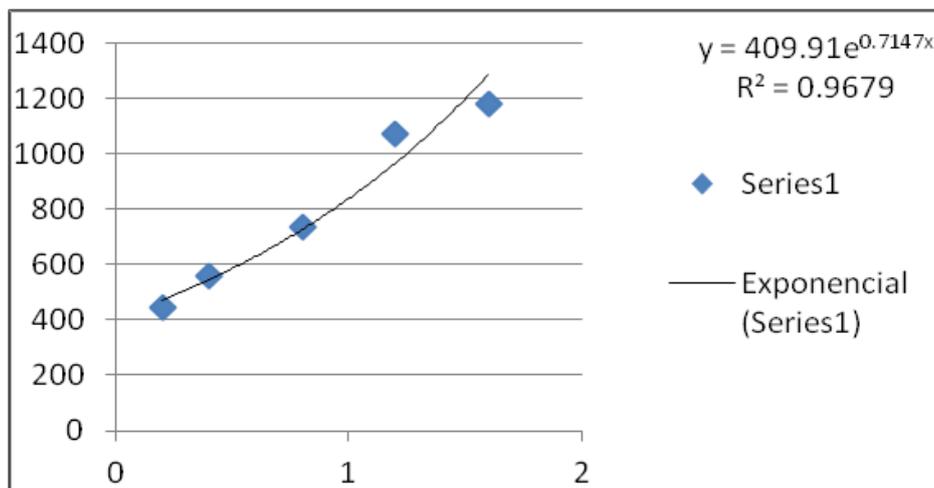
El gas producido durante el proceso de fermentación se midió con un transductor de presión de la marca Delta OHM modelo HD8804 a las 2, 4, 6, 8, 10, 12, 15, 19, 24,

30, 36, 48, 72 y 96 horas (Mauricio *et al.*, 2001). De esta manera, se cuantificó la producción acumulada de gas, proveniente de cada tiempo de fermentación. El número de datos obtenidos durante la fermentación ruminal *in vitro* se usó para la estimación de la ecuación que relaciona presión y volumen. Posteriormente, se estimó la producción de gas acumulado, la tasa acumulada de producción de gas, el volumen de gas producido por mg de materia seca (MS) y materia orgánica (MO) degradada.

4.4.7 Cuantificación de metano en la fermentación ruminal

La cantidad de metano producido en la fermentación *in vitro*, se determinó mediante cromatografía de gases (CG) en un cromatógrafo de la marca SRI y una columna empacada CTRI (6ft x 1/4”), el tipo de detector fue de ionización de flama (FID), el gas de transporte fue nitrógeno con un flujo de 25 ml/min, la temperatura del FID fue de 170°C y la del horno de 130 °C. Para la calibración del equipo se utilizó un estándar externo con una mezcla de CO, CO₂, CH₄, C₂H₆, C₂H₂, y N₂ todos a una concentración del 1% (MicromMAT-14). El tiempo de corrida fue de 8 minutos. Los picos fueron determinados por integración automática y el pico del metano fue identificado por su tiempo de retención. Se tomó una muestra de 400 µl de gas y se inyectaron 200 µl.

Los mililitros de metano a partir de las áreas bajo la curva se determinaron utilizando la ecuación de calibración que se muestra a continuación:



4.4.8 Diseño Experimental

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar donde los tratamientos fueron los tres niveles de inclusión de *Tagetes* a la dieta base

El modelo general lineal fue:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + e_{ijk}$$

Donde:

Y_{ij} = variable respuesta

μ = media general.

T_i = Efecto del factor tratamiento ($i=1\dots3$)

e_{ijk} = verdadero error contenido en el i ésimo nivel de inclusión del j ésimo tratamiento.

Las variables evaluadas fueron PC, FDN, FDA, dFDN, parámetros de fermentación y producción de metano.

Los resultados se analizaron mediante un análisis de varianza y cuando existieron diferencias significativas se aplicó la prueba de Tukey. Se utilizó el paquete estadístico de MINITAB v14 (2000).

CAPITULO V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se determinó el contenido de taninos en *Tagetes* ya que interfieren en su digestibilidad y es un antioxidante, con la finalidad de conocer el total de taninos que contiene la planta.

El contenido de taninos en arvenses en este estudio es beneficioso cuando se incluyen en la dietas para rumiantes ya que los TC forman enlaces de proteínas y enzimas impidiendo la asimilación de estas. Los taninos son compuestos de metabolitos que confieren cierto valor nutricional a la planta y otros que resultan tóxicos y antinutricionales para el animal que las consume, estos contribuyentes pueden tener efectos adversos como la pérdida de apetito, reducción en la ingesta de materia seca y digestibilidad de materia orgánica.

Los TC pueden afectar negativamente el consumo del alimento por los animales alterando la digestibilidad, la producción animal pero quizá el factor antinutricional más importante es el impedimento del buen aprovechamiento de las proteínas por parte del animal (Solano, 1997).

Cuadro 5.1 Contenido de taninos en *Tagetes erecta* L.

Taninos totales (TT)	Taninos condensados (TC)
%	%
7.3	1.3

Así mismo se obtuvo la composición química, dMO, dFDN de la dieta base, así como también las características nutritivas de la dieta base más la inclusión de *Tagetes*, TCQ y AO (Cuadro 5.2). La inclusión de la planta nativa (*Tagetes*) en cuanto a la PC está muy por debajo de la dieta base en los tres niveles de inclusión ($p < 0.001$). Lo cual indica que en ninguno de los tres casos se mejora el aporte de PC del alimento adicionando los tres componentes.

En cuanto a la dFDN la dieta base (cuadro 5.2) presentó 631.1 g/kg MS. Por otro lado la dFDN de la dieta donde se incluyó *Tagetes* aumentó conforme se incrementa

el nivel de inclusión ya que para el nivel 1 la dFDN fue de 694.2 g/kg MS, por lo que la inclusión de esta especie nativa incrementa la dFDN en un 9.1%. Así también se observó la misma tendencia en cuanto a la dMO ya que el valor más alto se localiza en la dieta con *Tagetes* en el nivel alto de inclusión con una diferencia de 10.8% en comparación con la dieta base lo que indica que existe una mayor digestibilidad del alimento y por lo tanto el animal lo puede aprovechar más eficientemente.

Es importante destacar que el AO muestra una dMO muy por debajo de la dieta base debido a que es un bactericida, tiene la capacidad de atenuar la actividad de parte de la población bacteriana ruminal. En este sentido Evans y Martin (2000) confirmaron la capacidad antibacteriana del aceite de orégano y demostraron su capacidad para modificar el metabolismo y perfil de la fermentación ruminal.

El aceite de orégano se representa como una alternativa para mejorar la eficiencia de utilización de los alimentos y reducir las pérdidas de nutrientes modificando el perfil de fermentación ruminal (Castillejo, 2005).

Cuadro 5.2 Composición química, dMO, dFDN (g/kg MS) y EM (MJ/kg MS) de la dieta más el nivel de inclusión

	PC	FDN	FDA	dFDN	dMO§	EM§
Dieta Base	167.5	458	156.9	631.1	655.1	10.3
Nivel de inclusión						
	Nivel -1					
Dieta+ <i>Tagetes</i>	143.2 ^a	474.3 ^d	206.8 ^c	577.8 ^a	632.7	9.93
Dieta+TCQ	123.3 ^b	544.4 ^a	222.2 ^{ab}	553.6 ^{ab}	563.1	8.84
Dieta+AO	121.4 ^b	513.5 ^c	215.7 ^b	60.4 ^c	688.7	10.81
EEM	0.94	0.82	1.58	4.6		
p<	***	***	***	***		
	Nivel 0					
Dieta+ <i>Tagetes</i>	157.5 ^a	411.4 ^d	165.7 ^b	634.6 ^a	712.8	11.19
Dieta+TCQ	113.6 ^b	535.8 ^a	179.0 ^c	551.4 ^c	555.4	8.72
Dieta+AO	120.9 ^c	503.8 ^c	186.6 ^b	61.9 ^d	340.8	4.51
EEM	1.37	1.61	1.38	5.63		
p<	***	***	***	***		
	Nivel 1					
Dieta+ <i>Tagetes</i>	146.0 ^b	303.7 ^c	121.6 ^b	694.2 ^a	735.1	11.54
Dieta+TCQ	117.2 ^d	505.1 ^a	117.4 ^b	534.3 ^c	561.5	8.82
Dieta+AO	121.3 ^c	459.7 ^b	242.0 ^a	111.0 ^d	287.4	5.35
EEM	0.88	1.73	1.22	8.51		
p<	***	***	***	***		

^{abcd} Diferentes letras en una misma columna indican diferencias significativas ($p < 0.05$). * ($p < 0.05$); ** ($p < 0.01$); *** ($p < 0.001$). **TCQ**: Taninos Condensados de Quebracho, **AO**: Aceite de Orégano, **PC**: Proteína Cruda, **FDN**: Fibra Detergente Neutro, **FDA**: Fibra Detergente Ácido, **dMO**: Digestibilidad de Materia. Orgánica, **dFDN**: Digestibilidad de Fibra Detergente Neutro, **EM**: Energía Metabolizable, **EEM**: Error Estandar de la Media. **Nivel -1**: Nivel bajo de inclusión, **Nivel 0**: Nivel medio de inclusión, **Nivel 1**: Nivel alto de inclusión. § Representa valores sin repetición.

Por otro lado los parámetros de fermentación ruminal se muestran en el cuadro 5.3, en el caso de la fracción B en el nivel bajo de inclusión la dieta + *Tagetes* es la que presentó una mayor producción de gas muy por arriba de la dieta base; en el nivel medio y alto se observa una gran variación, principalmente en nivel alto ya que la producción de gas disminuye considerablemente. En contraste con la dieta + TCQ, la producción más alta se presenta en el nivel de inclusión alto y en el caso de AO es al contrario la mayor producción se da en el nivel bajo de inclusión y conforme pasa de nivel la producción desciende.

La tasa de fermentación *c* (cuadro 5.3) presenta diferencias significativas ($P < 0.01$) en los tres niveles de inclusión y en el nivel de inclusión alto de *Tagetes* a la dieta la fermentación se mejora en un 15 % si se compara con la dieta base. En el caso del aceite de orégano la tasa de fermentación es alta en comparación con el resto de las inclusiones y aparentemente mejor que la dieta base.

Los resultados de la tasa de fermentación del AO en el nivel alto de inclusión deben considerarse con mucha precaución ya que no sólo indican que el AO es un mejorador de la fermentación ruminal y hace que la dieta este rápidamente disponible para los microorganismos, y al comparar este dato con las respectivas digestibilidades se puede observar que no representa beneficios importantes para el animal.

Cuadro 5.3. Parámetros de fermentación en producción de gas *in vitro* en la dieta más el nivel de inclusión

	<i>B</i> (ml/g MS)	<i>c</i> (h)	<i>Lag</i> (h)
Dieta Base	407.3	0.042	5.7
Nivel de inclusión			
Nivel -1			
Dieta+<i>Tagetes</i>	436.1	0.033 ^a	5.6 ^b
Dieta+TCQ	376.3	0.040 ^a	6.5 ^a
Dieta+AO	408.2	0.017 ^b	5.8 ^b
EEM	15.8	0.002	0.1
<i>P</i><	NS	***	**
Nivel 0			
Dieta+<i>Tagetes</i>	405.2 ^a	0.046 ^a	5.4
Dieta+TCQ	391.8 ^a	0.030 ^b	5.4
Dieta+AO	280.8 ^c	0.011 ^c	6.9
EEM	6.5	0.001	0.4
<i>P</i><	***	***	NS
Nivel 1			
Dieta+<i>Tagetes</i>	364.3 ^b	0.057 ^b	4.7
Dieta+TCQ	458.9 ^a	0.020 ^b	5.2
Dieta+AO	8.6 ^c	0.403 ^a	5.1
EEM	18.2	0.018	0.1
<i>P</i><	***	***	NS

^{abcd} Diferentes letras en una misma columna indican diferencias significativas ($p < 0.05$). **NS**, No significativo; * ($p < 0.05$); ** ($p < 0.01$); *** ($p < 0.001$). **TCQ**: Taninos Condensados de Quebracho, **AO**: Aceite de Orégano, **B**: Producción potencial de gas (ml gas/ g MS), **c**: Tasa de fermentación de la fracción b, **Lag**: Fase antes de iniciar la fermentación de la FDN, **EEM**: Error Estándar de la Media **Nivel -1**: Nivel bajo de inclusión, **Nivel 0**: Nivel medio de inclusión, **Nivel 1**: Nivel alto de inclusión.

Producción de metano en la fermentación ruminal *in vitro*

La cantidad total de CH₄ producido en los tratamientos (cuadro 5.4) fue de 5.0 a 55.3 ml/g considerando que el AO tiene la producción más baja en los tres niveles de inclusión, el mayor incremento de metano se produjo entre las 8 y 24 hrs de incubación.

Según Tavendale *et al.* (2005), existen dos mecanismos por medio de los cuales los taninos condensados reducen la producción de metano en rumiantes, uno es indirectamente a través de la reducción en la digestibilidad de la fibra, con una disminución en la producción de H₂ y directamente a través de la inhibición de la metanogénesis. De acuerdo a los resultados para el nivel bajo de inclusión de *Tagetes* a la dieta se observó que la menor producción de metano se presentó en el nivel bajo de inclusión.

La inclusión más contundente que permite la reducción de la producción de metano es el AO. Desde el punto de vista ambiental el AO representa una excelente oportunidad para incluirse en la dieta de los animales y a su vez reducir hasta en un 92 % la producción de metano comparada con dietas tradicionales como en este caso la dieta base. Sin embargo, desde el punto de vista de la productividad animal la inclusión del AO a la dieta no representa ningún beneficio ya que no hay buenas fermentaciones y la dFND es muy baja.

La inclusión de la especie nativa a la dieta permitió reducir las emisiones de metano en todos los niveles de inclusión, especialmente en el nivel alto, en este caso la producción de metano se redujo en un 13.5% y desde el punto de vista de la productividad animal, especialmente en la digestibilidad de la FND (dFDN), ésta incluso fue mejor que la digestibilidad de la dieta base sola. En este caso la reducción de metano y la mejora de la digestibilidad especialmente de la FND se debió al aporte de taninos condensados (1.3%) que como menciona Tavendale *et al.* (2005), concentraciones menores al 3% de TC reducen la producción de metano y mejoran la fermentación ruminal.

Cuadro 5.4 Efecto del nivel de inclusión en la producción de metano (ml/g MS) en fermentación *in vitro*

Tiempo (h)	Producción de metano						Producción total de metano	Producción total de gas
	8	16	24	32	40	48		
Dieta Base	11.9	13.6	23.8	4.5	6.0	3.6	63.9	348.6
Nivel de inclusión								
	Nivel -1							
Dieta+ <i>Tagetes</i>	8.1 ^a	6.3	10.6 ^{ab}	5.0	3.2	5.8	39.0 ^a	329.6 ^a
Dieta+TC	5.4 ^b	9.5	10.0 ^{ab}	6.1	3.7	3.9	38.5 ^a	275.7 ^{ab}
Dieta+AO	9.7 ^a	2.0	2.5 ^b	6.0	5.4	1.6	27.3 ^b	210.1 ^b
EEM	0.9	1.91	2.2	1.4	1.9	1.4	2.3	18.5
<i>p</i> <	*	NS	*	NS	NS	NS	*	*
	Nivel 0							
Dieta+ <i>Tagetes</i>	10.7 ^a	12.0 ^a	11.9 ^a	2.7	3.5 ^{bc}	3.7	44.5 ^a	350.1 ^a
Dieta+TC	7.7 ^a	10.4 ^a	11.8 ^a	2.9	1.9 ^c	5.0	39.7 ^a	290.7 ^b
Dieta+AO	1.4 ^b	2.4 ^b	1.6 ^b	1.4	6.4 ^a	2.6	15.9 ^c	96.9 ^c
EEM	1.0	1.5	1.3	0.8	0.4	1.7	1.4	6.3
<i>p</i> <	**	*	**	NS	***	NS	***	***
	Nivel 1							
Dieta+ <i>Tagetes</i>	2.9 ^{ab}	21.4 ^a	16.5 ^{ab}	4.5	8.1 ^{ab}	1.9	55.3 ^a	364.7 ^a
Dieta+TC	8.5 ^a	6.8 ^c	11.1 ^a	2.3	2.6 ^a	2.1	33.4 ^a	264.5 ^c
Dieta+AO	0.5 ^b	0.4 ^d	2.3 ^{bc}	1.3	0.1 ^{bc}	0.4	5.0 ^b	8.6 ^d
EEM	1.3	1.4	3.1	1.7	1.4	0.6	5.0	4.7
<i>p</i> <	*	***	*	NS	*	NS	***	***

*** Diferentes letras en una misma columna presentan diferencias significativas (p<0.05). NS, No Significativo; * (p<0.05); ** (p<0.01); *** (p<0.001). TCQ: Taninos Condensados de Quebracho, AO: Aceite de Orégano, Nivel -1: Nivel bajo de inclusión, Nivel 0: Nivel medio de inclusión, Nivel 1: Nivel alto de inclusión.

CONCLUSIONES

La concentración de taninos condensados en *Tagetes erecta* favoreció la disminución de metano una vez adicionada esta planta a la dieta base.

La inclusión de la especie nativa tanífera en la dieta base permitió no solo reducir las emisiones de metano, sino que también mejoró la digestibilidad de la dieta. Por lo que muestra que los animales pueden aprovechar mejor los alimentos beneficiando también al ambiente a través de las reducciones de metano.

Si bien el uso de aceite de orégano no causó gran efecto a gran medida en el rumen para la disminución de metano, si actúa como un bactericida en los niveles de inclusión elevados, lo cual representa una oportunidad para poder reducir las emisiones de metano, pero desde el punto de vista de la productividad animal no representa beneficios ya que no tendría una buena fermentación y la digestibilidad es muy baja. Por lo que se deben hacer más estudios sobre la inclusión de aceite de orégano para encontrar el nivel de inclusión ideal que permita la reducción de las producciones de metano y por otro lado se mejore la productividad animal.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- **Anderson, K. L., T. G. Nagaraja, y J. L. Morril.** 1987. *Ruminal metabolic development in calves weaned conventionally or early.* J. Dairy Sci. 70:1000-1005, Washington, D.C.
- **Berra G. y Finster L.** 2003. *Emisión de gases de efecto invernadero: Influencia de la ganadería argentina.* Instituto de patobiología, INTA Castelar.
- **Calsamiglia, S., A. Ferret, y M. Devant.** 2002. *Effects of pH fluctuations on microbial fermentation and nutrient flow from a dual-flow continuous culture system.* J. Dairy Sci. 85:574-579
- **Castillejo V.L.** 2005. *Modificación de la fermentación ruminal mediante compuestos de aceites esenciales,* Barcelona. 178pp.
- **Ciesla, W.** 1996. "Cambio Climático, Bosque y Ordenamiento Forestal".
- **DeRamust H A, Clement TC, Giampola DD, Dickison PC.** 2003. Methane emissions of beef cattle on forages: efficiency of grazing management systems. *Journal Environ Qual*; 32: 269-277.
- **De Veth, M.J. and Kolver E.S.** 2000 Diurnal variation in pH reduce digestion and synthesis of microbial protein when pasture is fermented In continuous culture. *J. Dairy Sci.* 84:066-2072
- **Evans, J.D y S.A Martin.** 2000. Effects of thymol on ruminal microorganisms. *Curr. Microbiol.*41:366-340.
- **Fraume, Nestor, Julio,** 2006 *Abecedario Ecológico,* Edit. San Pablo,
- **Fonty G.** 1991 *The rumen anaerobic fungi.* In: Jouany, JP. *Rumen microbial metabolism and ruminant digestion.* INRA editions, Paris, France,; pp 53-70
- **Galicia M, E.** 1988. *Digestión Ruminal, Ecología y Evolución,* Edit. Acribia.

- **Graedel, T.E. y Crutzen, P.J.** 1993. Atmospheric change. An Earth System perspective. Freeman, N. York.
- **Gribbin, J.** 1992. El Efecto Invernadero, Edit.Gaia.
- **Hervás G. F.** 2001. Efecto sobre la fermentación en el rumen y la digestibilidad, toxicidad y utilización como protectores frente a la degradación ruminal. Los taninos condensado quebracho en la nutrición de ovejas. Consejo Superior de Investigación Científicas Estación Agrícola Experimental. Universidad de León. España. P.p. 9-13.
- **Hess HD, Monsalve LM, Carulla JE, Lascano CE, Díaz TE, Kreuzer M.** 2002 In vitro evaluation of the effect of *Sapindus saponaria* on methane release and microbial populations. URL: <http://www.ciat.cgiar.org/forrajes/pdf/>. Consultada el 19-03-2010.
- **Hoover, W. H.** 1986. Chemical factors involved in ruminal fiber digestion. J. Dairy Sci. 69:2755-2766
- **Hungate R .E.** 1966. The Rumen and its Microbes. Academic Press, New York. 533 p.
- **IPCC,** 1996. Climate change 1995: The science of climate change (eds.) Houghton J. T., Meira Filho L. G., Callander B. A., Harris M., Kattenburg A. and Maskell K. Cambridge University Press, Cambridge, UK, 572 pp.
- **Johnson, K. A., Johnson D. E.** 1995. Methane emissions from cattle. J. Anim. Sci. 73: 2483-2495.
- **Kumar, R. & Sing, M,** 1984. Tannins: their adverse role in ruminant nutrition. J. Agric. Food Chem. 32, 447–453.
- **Kurihara M, Magner T, McCrabb H, McCrabb G.** 1999. Methane production and energy partition of cattle in the tropics. British Journal of Nutrition; 81:227-234.
- **Ludevid, M.** 1997. “El cambio climático en el medio ambiente: introducción de sus causas humanas”edit. Alfaomega, 1 edición.

- **McCaughey W, Wittenberg K, Corrigan D.** 1999. Impact of pasture type on methane production by lactating beef cows. *Can J An Sc*, 1999; 79 (2): 221-226
- **McAllister, T.A. Bae, H.D., Yanke, L. J. y Cheng, K.J.** 1994. Effect of condensed tannins from birdsfoot trefoil on endoglucanase activity and the digestion of cellulose filter paper by ruminal fungi. *Canadian Journal of Microbiology* 40: 298-305.
- **McSweeney, C. S. Palmer, B., McNell, D. M. y Krause, D. O.** 2001. Microbial enteraction with tannins: nutritional consequences for ruminants. *Animal Feed Science and Technology*. 91: 83-93.
- **Mauricio R M, Owen E, Mould F L, Givens I, Theodorou M K, France J, Davies D R and Dhanoa M S.** 2001. Comparison of bovine rumen liquor and bovine faeces as inoculum for an in vitro gas production technique for evaluating forages. *Animal Feed Science and Technology*. 89: 33-48.
- **Mera Álvarez, M. I.** 2004. Efecto de leguminosas forrajeras tropicales ricas en taninos sobre la fermentación ruminal y la producción de metano en un sistema *in vitro* (RUSITEC). Trabajo de grado presentado para optar al título de Zootecnista. Universidad Nacional de Colombia. Sede Palmira Centro Internacional de Agricultura Tropical CIAT. Laboratorio de forrajes. 78p.
- **Makkar, H. P. S.** 2003. Quantification of tannins in tree and shrub foliage. *A Laboratory Manual*. Kluwer Academic Publishers. Netherlands. Pag. 101.
- **Makkar, H. P. S., Siddhuraju, P., y Becker, K.** 2007. Tannins. En: *Plant Secondary Metabolites*. Humana Press Inc. Totowa, New Jersey. pp. 67-79.
- **Martínez F. J., Fernández B. A. y Osnaya P.** 2004. Cambio climático: Una visión desde México. Publicado por Instituto Nacional de Ecología,. páginas.18,19, 29.
- **Minitab Version 14.** 2000. Statistical software. User's guide1: Data graphics, and macros. USA
- **Moss A.R, Jouany JP, Newbold J.** 2000. Methane production by ruminants: its contribution to global warming. *INR EDP Sciences. Ann Zootech*; 49:231-253.

- **Motavalli, J.** 2005. "El cambio climático: crónicas desde las zonas de riesgo del planeta".
- **Mould, F. L., y E. R. Orskov.** 1983. Manipulation of rumen fluid pH and its influence on cellulolysis in sacco, dry matter degradation and the rumen microflora of sheep offered either hay or concentrate. *Anim. Feed Sci. Technol.* 10:1-14.
- **Owens, F. N. y Zinn., R.** 1988. Metabolismo de la proteína en rumiantes. En: *El rumiante, fisiología digestiva y nutrición.* Ed: Church, D. C. ed. Prentice Hall, Englewood Cliffs. NJ. 255-282.
- **Owens, F. N., D. S. Secrist, W. J. Hill, y D. R. Gill.** 1998. Acidosis in cattle: a review. *J. Anim. Sci.* 76:275-286.
- **Richardson, L. F., A. P. Raun, E. L. Potter, C. O. Cooley, and R. P. Rathmacher.** 1976. Effect of monensin on rumen fermentation in vitro and in vivo. *J. Anim. Sci.* 43:657-664.
- **Russell, J. B. C. J. Sniffen, y P. J. Van Soest.** 1983. Effect of carbohydrate limitation on degradation and utilization of casein by mixed rumen bacteria. *J. Dairy Sci.* 66:763- 775
- **Shriver, B. J., W. H. Hoover, J. P. Sargent, R. J. Crawford, Jr., y W. V. Thayne.** 1986. Fermentation of a high concentrate diet as affected by ruminal pH and digesta flow. *J. Dairy Sci.* 69:413-419.
- **Tavendale, M. H., Meagher, L. P., Pacheco, D., Walker, N., Attwood, G. T., Sivakumaran, S.** 2005. Methane production from in vitro rumen incubations with *Lotus pedunculatus* and *Medicago sativa*, and effects of extractable condensed tannin fractions on methanogenesis. *Animal Feed Science and Technology.* 123-124: 403-419.
- **Theodorou M K, Williams B A, Dhanoa M S, McAllan A B y France J. A.** 1994. simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology.* 48: 185-197.

- **Van Soest, P. J., Robertson, J. B., Lewis, B. A.** 1992. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*. 74: 3583-3597
- **Yokohama MT, Johnson K.A.** 1993. Microbiología del rumen e intestino. En: Church DC. *El rumiante: fisiología digestiva y nutrición*. Editorial Acribia S.A. Zaragoza, España; 137-156.
- **Williams B A.** 2000. Cumulative gas-production techniques for forage evaluation. In: Givens D I, Owen E, Omed H M and Axford R F E. *Forage Evaluation in Ruminant Nutrition*. Wallingford (UK). CAB International. 475 p.

BIBLIOGRAFÍA MESOGRÁFICA

- **Carretero, M.E;** 2000, *Plantas Medicinales*, "Compuestos fenólicos: Taninos"; http://www.webdelprofesor.ula.ve/ciencias/chataing/Cursos/productos_naturales/taninos.pdf. 2000. 08/12/20/12.
- **Fernandez, A;** 2007, consumer, "metano, vacas y cambio climático, Erosky Consumer, época 4, No. 169, julio-agosto, 2012, Reyno Unido. http://www.consumer.es/web/es/medio_ambiente/energia_y_ciencia/2007/07/30/165488.php. 16/11/2012.
- **Instituto Nacional de Investigación Agronómica (INRA)**, 2008."rumiantes menos contaminantes, Francia, <http://www.ladyverd.com/articulo/247.agosto,2008.16/01/2013>.
- **ONU;** 2008, chile alimenta, "Gases de Efecto Invernadero"; 25/11/2008. <http://www.chilepotenciaalimentaria.cl/content/view/327060/Gases-de-efecto-invernadero-continuaron-creciendo-en-2007-segun-la-ONU.html>. 28/11/2009.
- **PNUMA;** 2000, "Protocolo de Montreal ", relativo a las sustancias que agotan la capa de ozono; secretaria del Ozono y PNUMA; <http://www.inet.org.ozone.marzo2000>. 14/01/2013.
- **Sataines, Francisca**, 2007-2008, *Cambio Climático*": interpretando el pasado para entender el futuro, Redalyc, Noviembre-Febrero, Vol.14, No.003, pp.345-351

- **SEMARNAT**, 2006. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Ine, México, Instituto Nacional de Ecología (México). Inventario nacional de emisiones de gases de efecto invernadero, 1990-2002. Publicado por Instituto Nacional de Ecología
- **UNFCCC**; 2007, Convención Marco de las Naciones Unidas para el Cambio Climático, "Unidos por el Clima), noviembre. http://unfccc.int/resource/docs/publications/unitingonclimate_spa.pdf. 16/01/20013.
- **Uriarte**, A; 2008, Madre-gea; "Fuentes de Emisiones de Metano", 02/10/2008, Historia del Clima de la Tierra; <http://www.madre-gea.com/2008/10/fuentes-de-emisin-del-metano.html>. 27/07/2010.
- **Villarreal, J.A**; 2003, "Flora del Bajío y Regiones Adyacentes", Departamento de Botánica.
- **Solano, H**; 1997, Universidad Autónoma de Nuevo León, "efecto de las diferentes concentraciones de taninos sobre la flora microbiana ruminal y en la degradación *in vitro* del forraje de alfalfa".