

PRODUCCIÓN DE GAS *in vitro* Y DESAPARICIÓN DE LA MATERIA SECA DEL CULTIVO SÓLIDO CON HONGOS LIGNINOLÍTICOS

In vitro GAS PRODUCTION AND DRY MATTER DISSAPEARANCE OF SOLID CULTURE WITH LIGNINOLYTIC FUNGI

Marcela Villegas-Castañeda^{1*}, Marcos Meneses-Mayo^{1,4}, Luis A. Miranda-Romero², Octavio Loera-Corral³

¹Ganadería. Campus Montecillo. Colegio de Posgraduados. 56230. Montecillo, Estado de México (marcela_colpos.mx). ²Zootecnia, Universidad Autónoma Chapingo. 56230, Chapingo, Estado de México. ³Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa. Avenida Sn Rafael Atlixco No. 186. Colonia Vicentina. 09430. Delegación Iztapalapa. ⁴Facultad de Ciencias de la Salud (Nutrición), Universidad Anáhuac, México-Norte. Avenida Universidad Anáhuac No. 46, Colonia Lomas Anáhuac, Huixquilucan, Estado de México 52786 (mmayo_colpos.mx)

RESUMEN

La paja de sorgo, un esquilmo agrícola abundante en México y que se usa como alimento para rumiantes, tiene baja digestibilidad por lo que se usan diversos métodos para aumentar su calidad. Por tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar las características fermentativas *in vitro* del cultivo sólido de paja de sorgo tratada con hidróxido de calcio Ca(OH)₂ y sin tratar, y fermentada durante 20 d con los hongos *Pleurotus sapidus* y *Fomes fomentarius* EUM1. Se usó la técnica de producción de gas *in vitro* y se midió Vmax, S, L, desaparición de la materia seca, AGV y N-NH₃. El diseño experimental fue bloques al azar generalizados y se compararon las medias mediante contrastes. El tratamiento con Ca(OH)₂ mostró la mejor producción de gas fraccional ($p \leq 0.05$) de 0 a 40 h de fermentación y Vmax (382.10 mL g⁻¹). El tratamiento con *F. fomentarius* EUM1 y Ca(OH)₂ mostró el mejor Vmax (311.51 y 281.20 mL g⁻¹) en comparación con *P. sapidus* y Ca(OH)₂ (217.75 y 264.75 mL g⁻¹). Además, *P. sapidus* aumentó la formación de biomasa microbiana ($p \leq 0.01$) y *F. fomentarius* EUM1 la producción de ácido acético 24 h ($p \leq 0.01$). Se concluye que el tratamiento con Ca(OH)₂ mejoró las características fermentativas de la paja y el tratamiento con hongos influyó en la formación de masa microbiana. Y no existió sinergismo en el tratamiento combinado.

Palabras clave: *Fomes fomentarius* EUM1, *Pleurotus sapidus*, digestibilidad, paja de sorgo.

ABSTRACT

Sorghum straw, an abundant agricultural by-product in Mexico, used as food for ruminants, has low digestibility, which is why several methods are used to increase its quality. Therefore, the aim of this study was to evaluate the *in vitro* fermentative characteristics of solid culture of sorghum straw treated or untreated calcium with hydroxide Ca(OH)₂ and fermented for 20 d with the *Pleurotus sapidus* and *Fomes fomentarius* EUM1 fungi. The *in vitro* gas production technique was used, and Vmax was measured, along with S, L, disappearance of dry matter, VFA and NH₃-N. The experimental design was a randomized complete block design and means were compared using contrasts. The treatment with Ca(OH)₂ showed the best production of fractional gas ($p \leq 0.05$) from 0 to 40 h of fermentation and Vmax (382.10 mL g⁻¹). The treatment with *F. fomentarius* EUM1 and Ca(OH)₂ showed the best Vmax (311.51 and 281.20 mL g⁻¹) in comparison with *P. sapidus* and Ca(OH)₂ (217.75 and 264.75 mL g⁻¹). Likewise, *P. sapidus* increased the formation of microbial biomass ($p \leq 0.01$) and *F. fomentarius* EUM1 increased the production of acetic acid 24 h ($p \leq 0.01$). The conclusion was that the treatment with Ca(OH)₂ improved fermentative characteristics of the straw, and the treatment with fungi influenced the formation of microbial mass. Also, there was no synergism in the combined treatment.

Key words: *Fomes fomentarius* EUM1, *Pleurotus sapidus*, digestibility, sorghum straw.

INTRODUCTION

The annual sorghum (*Sorghum vulgare*) grain production in México was 5 972 628 t (SIAP, 2008), which produced 10 351 868 t of straw,

* Autor responsable ♦ Author for correspondence.

Recibido: Abril, 2010. Aprobado: Agosto, 2010.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 44: 917-929. 2010.

INTRODUCCIÓN

La producción anual de grano de sorgo (*Sorghum vulgare*) en México fue 5 972 628 t (SIAP, 2008), que generaron 10 351 868 t de paja usadas parcialmente en dietas para rumiantes. Esta paja tiene un alto contenido de FDN y baja digestibilidad (Álvarez y Combellas, 2005), por lo cual se usan tratamientos físicos, químicos y biológicos para mejorar su digestibilidad. En algunos tratamientos biológicos se usa el cultivo sólido con hongos de la pudrición blanca como *Pleurotus* sp. y *Fomes* sp., que producen celulasas, xilanasas y lacasas (Márquez *et al.*, 2007). Además se ha usado el $\text{Ca}(\text{OH})_2$ como tratamiento químico (Gandi *et al.*, 1997).

La técnica de producción de gas *in vitro* permite determinar la modificación en la paja por los tratamientos químicos y biológicos, así como los efectos de compuestos secundarios en la actividad microbiana ruminal, describir la cinética de fermentación, analizar efectos asociativos de diversos alimentos, examinar el efecto de aditivos en la fermentación ruminal e identificar la composición de gases de la fermentación (Getachew *et al.*, 2005; Posada y Noguera, 2005). Aiple *et al.* (1996) indican que el método de producción de gas fue mejor para predecir la energía neta en ingredientes alimenticios. Pero las respuestas son variables al usar pajas tratadas con hongos de la pudrición blanca (Karma y Zadrazil, 1986) o enzimas fibrolíticas exógenas (Tricarico y Dawson, 2005) en estudios de fermentación *in vitro*. Lo anterior se atribuye a la especificidad enzimática por el sustrato, contenido de humedad en el alimento y la especie de hongo usada para producirlas (Karunananda *et al.*, 1995). El objetivo del presente estudio fue evaluar la fermentación y desaparición de la materia seca mediante la técnica de producción de gas *in vitro*, de la paja de sorgo tratada con $\text{Ca}(\text{OH})_2$, al 0.7 % por 24 h y combinado con el cultivo sólido con *Fomes fomentarius* EUM1 o *Pleurotus sapidus*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Tratamiento de la paja de sorgo

La paja de sorgo se cortó en partículas de 2 a 5 cm, una parte (50 g) se remojó con agua destilada y otra (50 g) con una solución alcalina de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ al 0.7 % (p/v), para alcanzar una humedad de 80 % a las 24 h. Después se esterizaron a 121 °C,

used in part as feed for ruminants. This straw contains a high NDF content and low digestibility (Álvarez and Combellas, 2005), which is the reason for using physical, chemical and biological treatments to improve its digestibility. Some biological treatments use the solid culture with white rot fungi such as *Pleurotus* sp. and *Fomes* sp., which produce cellulases, xylanases and laccases (Márquez *et al.*, 2007). Calcium hydroxide has also been used as a chemical treatment (Gandi *et al.*, 1997).

The *in vitro* gas production technique helps determine the modification in straw by the chemical and biological treatments, as well as the secondary compound effects in the ruminal microbial activity; it also helps describe the fermentation kinetics, analyze the associative effects of different foods, examine the effect of additives on ruminal fermentation and to identify the makeup of fermentation gases (Getachew *et al.*, 2005; Posada and Noguera, 2005). Aiple *et al.* (1996) point out that the gas production method was better for predicting net energy in food ingredients. However, responses vary when using straws treated with white rot fungi (Karma and Zadrazil, 1986) or exogenous fibrolytic enzymes (Tricarico and Dawson, 2005) in *in vitro* fermentation studies. This is due to the enzyme specificity on the substrate, humidity content in the food and the species of fungi used for their production (Karunananda *et al.*, 1995). The aim of this study was to evaluate the fermentation and disappearance of dry matter, using the technique of *in vitro* gas production from sorghum straw treated with $\text{Ca}(\text{OH})_2$, at 0.7 % for 24 h and combined with the solid culture with *Fomes fomentarius* EUM1 or *Pleurotus sapidus*.

MATERIALS AND METHODS

Treatment of the sorghum straw

The sorghum straw was cut into pieces 2 to 5 cm long. A part (50 g) was soaked in distilled water and another (50 g) with an alkaline solution of $\text{Ca}(\text{OH})_2$ at 0.7 % (p/v), to reach a humidity of 80 % after 24 h. They were then sterilized at 121 °C, 15 PSI for 20 min and were later cooled. Five portions of 10 g each were inoculated with *P. sapidus* and another five with *F. fomentarius* EUM1, allocating in each portion 1 cm² five squares of agar gel with sorghum straw colonized for 7 d by the fungi. The portions inoculated with *P. sapidus* were kept in an incubator at 28 °C and those with *F. fomentarius* EUM1, at 35 °C, for 20 d. The

15 PSI por 20 min y se enfriaron. Cinco porciones de 10 g cada una se inocularon con *P. sapidus* y otras cinco con *F. fomentarius* EUM1, colocando en cada porción cinco cuadros de 1 cm² de placa de agar paja de sorgo colonizada en 7 d por los hongos. Las porciones inoculadas con *P. sapidus* se mantuvieron en una estufa de cultivo a 28 °C y las de *F. fomentarius* EUM1 a 35 °C, por 20 d. La proporción final de Ca(OH)₂ en la paja fue de 5 g por cada 100 g MS de paja.

Tratamientos de la producción de gas *in vitro*

Se usaron tratamientos húmedos y secos. Los tratamientos húmedos fueron paja sin y con Ca(OH)₂ tratada con *P. sapidus* (PL y PLc), o con *F. fomentarius* EUM1, sin y con Ca(OH)₂ (TR y TRc). Los tratamientos testigos fueron paja de sorgo humedecida con agua (DO) o con la solución de Ca(OH)₂ (D0c) preparados 24 h antes de iniciar la prueba de desaparición *in vitro* de la MS (DIVMS). Los tratamientos secos fueron paja tratada con *P. sapidus* (PLs), paja tratada con *F. fomentarius* EUM1 (TRs) y paja sin tratar (PS), los cuales se secaron y molieron antes de la prueba *in vitro*. Se realizaron cinco repeticiones por tratamiento.

Fermentación y desaparición *in vitro* de la materia seca

Se usó la técnica de producción de gas (Theodorou *et al.*, 1994) para evaluar la fermentación. Las muestras de paja de sorgo se redujeron a partículas de 1 mm a 1 cm y se colocaron en frascos de vidrio ámbar con capacidad de 125 mL: 2.5 g para los húmedos y 0.5 g para los secos; se agregó 90 mL de líquido ruminal estandarizado con un flujo continuo de CO₂ y se cerraron herméticamente. Se incluyeron tres frascos como blancos, que sólo contenían inóculo ruminal. Los frascos se colocaron en un baño maría a 39 °C y se midió la presión de gas a 0, 1, 2, 3, 5, 7, 9, 12, 15, 18, 24, 30, 36, 42, 48, 60, 72, 96 h de incubación, mediante un manómetro manual (escala de 0 a 1 kg cm⁻²). Las lecturas de presión (kg cm⁻²) se transformaron a volumen de gas con la ecuación de regresión lineal $V=(P+0.0145) (0.018)^{-1}$ (Orskov y Mc Donald, 1979). Los datos de volumen de gas y tiempo de incubación se usaron para obtener el volumen fraccional (Vf). Las variables de la cinética de producción de gas: volumen máximo de gas producido (Vmax), fase de retardo (L) y tasa de producción de gas (S), se obtuvieron mediante un modelo logístico (Pitt *et al.*, 1999). El líquido ruminal se obtuvo de dos vacas Holstein alimentadas con alfalfa y concentrado (70:30). El líquido ruminal se filtró con gasas y se mezcló con una solución mineral reducida en proporción de 1:9 v/v. La solución mineral reducida provee minerales y nutrientes al medio acuoso *in vitro* para el proceso fermentativo y contenía por L de solución: 4 g

final proportion of Ca(OH)₂ in the straw was of 5 g per 100 g DM of straw.

In vitro gas production treatment

Dry and humid treatments were used. The humid treatments were straw with and without Ca(OH)₂, treated with *P. sapidus* (PL and PLc), or with *F. fomentarius* EUM1, with and without Ca(OH)₂ (TR and TRc). The control treatments were sorghum straw dampened with water (DO) or with the Ca(OH)₂ (D0c) solution, prepared 24 h before beginning the test of *in vitro* disappearance of the dry matter (IVDMD). The dry treatments were dry straw treated with *P. sapidus* (PLs), straw treated with *F. fomentarius* EUM1 (TRs) and straw without any treatment (SW), which were dried and crushed before the *in vitro* test. Five repetitions were carried out for each treatment.

Fermentation and *in vitro* disappearance of the dry matter

The gas production technique (Theodorou *et al.*, 1994) was used to evaluate the fermentation. The samples of sorghum straw were cut into pieces 1 mm to 1 cm long and placed in amber glass jars with a capacity of 125 mL: 2.5 g for the humid ones and 0.5 g for the dry ones; 90 mL of standardized ruminal liquid was added, with a continuous flow of CO₂, and the jars were sealed. Three jars were included as blank, which contained only ruminal inoculum. The jars were placed in a double boil at 39 °C and the gas pressure was measured at 0, 1, 2, 3, 5, 7, 9, 12, 15, 18, 24, 30, 36, 42, 48, 60, 72, 96 h of incubation, using a handheld manometer (scale 0 to 1 kg cm⁻²). The pressure readings (kg cm⁻²) were converted to gas volume using the linear regression equation $V=(P+0.0145) (0.018)^{-1}$ (Orskov and Mc Donald, 1979). The gas volume and incubation time data were used to find the fractional volume (Vf). The variables of the gas production kinetics: maximum volume of gas produced (Vmax), lag phase (L) and gas production rate (S), were found with a logistical model (Pitt *et al.*, 1999). Ruminal fluid was taken from two Holstein cows fed with alfalfa and a concentrate (70:30). The fluid was filtered with a gauze and mixed with a mineral solution, reduced in a proportion of 1:9 v/v. The reduced mineral solution provides the *in vitro* aqueous medium with minerals and nutrients for the fermentation process, and it contained, per every litre of solution: 4 g Ca₂CO₃; 0.45 g K₂HPO₄; 0.45 g KH₂PO₄; 0.45g (NH₄)₂SO₄; 0.90 g NaCl; 0.18 g MgSO₄; 0.07 g CaCl₂; 50 mL distilled water; 2 mL NaOH (1N); 0.5 g Na₂S0₄; 0.5 g L-cisteina; one drop of resazurin. Incubation was carried out in a double boil at 39 °C with a continuous flow of CO₂. At the end of the incubation, the content of the jars was filtered using N

Ca₂CO₃; 0.45 g K₂HPO₄; 0.45 g KH₂PO₄; 0.45g (NH₄)₂SO₄; 0.90 g NaCl; 0.18 g MgSO₄; 0.07 g CaCl₂; 50 mL de agua destilada; 2 mL NaOH (1N); 0.5 g Na₂S₂O₄; 0.5 g L-cisteína; una gota de rezarsurina. La incubación fue en baño maría a 39 °C con flujo continuo de CO₂. Al final de la incubación se filtró el contenido de los frascos con papel filtro N 541 (ø poro 10 µm) y se secaron a 60 °C por 24 h; las muestras se pesaron para calcular la MS residual y calcular la DIVMS. En la MS residual se determinó FDN residual (FDNr).

Determinación de ácidos grasos volátiles (AGV) y nitrógeno amoniacal (N-NH₃)

Para determinar AGV se tomaron muestras (2 mL) del contenido líquido de los frascos de la prueba de desaparición de la MS de dos repeticiones por tratamiento, a las 12 y 24 h, se mezclaron con ácido metafosfórico (25 % p/v) en una relación 4:1, y se refrigeraron (4 °C). Estas muestras se centrifugaron 20 min a 11 000 rpm, y del sobrenadante de cada muestra se tomó 1 µL y se inyectó en un cromatógrafo de gases (Perkin Elmer, modelo Clarus 500) con columna capilar (Elite PFAP) (Erwin *et al.*, 1961). Se usó H₂ como gas acarreador a un flujo de 5.5 mL min⁻¹, la temperatura de inyector y detector fue 250 °C, y la del horno 80 °C durante 1 min con incrementos de 20 °C min⁻¹ hasta alcanzar 140 °C, con un tiempo por lectura de 8 min (Kung y Hession, 1995). Para determinar la concentración de N-NH₃ se tomaron 20 µL del mismo sobrenadante y se vertieron en tubos de 10 mL, adicionando 1 mL de fenol (10 %) y 1 mL de hipoclorito de sodio (5 %), se incubaron en baño maría a 38 °C por 30 min. Después en cada tubo se agregó 5 mL de agua destilada. La absorbancia se leyó con un espectrofotómetro (VARIAN, modelo CARY I-E) a 630 nm.

Determinación de energía metabolizable (EM), digestibilidad de la materia orgánica (DMO) y masa microbiana (MM)

Dado que la producción de gas es proporcional a la MS degradada se usó la producción neta de gas a las 24 h de incubación del sustrato a partir de la obtenida por 0.5 g (Menke *et al.*, 1979). Para cada tratamiento y repetición se calculó la EM (EM k y kg⁻¹), DMO (%) y MM (mg g⁻¹) usando los modelos propuestos por Menke y Steingas (1998).

Diseño experimental y análisis de los datos

Se analizó el perfil de producción de gas para evaluar las fracciones de degradación (FI rápida fermentación, FII fermentación intermedia y FIII fermentación tardía) en función de los picos de

541 filter paper (ø pore 10 µm) and dried at 60 °C for 24 h; samples were weighed to calculate the residual DM and the DMIVD. In the residual DM, the residual NDF (NDFr) was determined.

Determining the volatile fatty acids (VFA) and ammonia nitrogen (NH₃-N)

In order to determine the VFA, samples (2 mL) were taken of the liquid content of the jars of the DM disappearance test, of two repetitions per treatment, after 12 and 24h, they were mixed with metaphosphoric acid (25 % p/v) in a ratio of 4:1, and stored in the refrigerator (4 °C). The samples were centrifuged for 20 min at 11000 rpm, and 1 µL of the supernatant of each sample was taken and injected in a gas chromatograph (Perkin Elmer, model Clarus 500) with a capillary column (Elite PFAP) (Erwin *et al.*, 1961). Hydrogen was used as a carrying gas, at a flow of 5.5 mL min⁻¹; the injector and detector temperature was 250 °C, and the temperature of the oven was 80 °C for 1 min, with increases of 20 °C min⁻¹ up to 140 °C, with a time per reading of 8 min (Kung and Hession, 1995). To determine the concentration of NH₃-N, 20 µL of the same supernatant were taken and poured into 10 mL tubes, 1 mL of phenol (10 %) was added, along with 1 mL of sodium hypochlorite (5 %); they were incubated in a double boil at 38 °C for 30 min. Later, 5 mL of distilled water were added to each tube. The absorbance was read with a spectrophotometer (VARIAN, model CARY I-E) at 630 nm.

Determination of metabolizable energy (ME), digestibility of organic matter (DOM) and microbial mass (MM)

Given that gas production is proportional to the degraded DM, we used the net production of gas after 24 h of incubation of the substrate from that obtained from 0.5 g (Menke *et al.*, 1979). For each treatment and repetition, ME was calculated (ME k and kg⁻¹), along with DDM (%) and MM (mg g⁻¹) using the models proposed by Menke and Steingas (1998).

Experimental design and data analysis

The gas production profile was analyzed for an evaluation of the degradation fractions (FI fast fermentation, FII intermediate fermentation, and FIII slow fermentation) according to the peaks of higher gas production. The experimental design was a randomized complete block design (the blocks were the replicates of the experiment in time). The values of fractional volume (Vf) for each peak (FI, FII and FIII) were analyzed using Tukey's test for comparison of averages (p≤0.05) (Steel and Torrie, 1986). Variables Vmax, L, S, IVDMD, AGV, NDFr, molar proportion

mayor producción de gas. El diseño experimental fue bloques al azar generalizados (el bloque fue la repetición del experimento en el tiempo). Los valores de volumen fraccional (Vf) para cada pico (FI, FII y FIII) se analizaron con la prueba de comparación de medias de Tukey ($p \leq 0.05$) (Steel y Torrie, 1986). Las variables Vmax, L, S, DIVMS, AGV, FDNr, proporción molar de acético, de propiónico y de butírico, EM, DMO y MM, se analizaron con el procedimiento MIXED (SAS, 1999) y la comparación de medias se realizó por contrastes ortogonales ($p \leq 0.01$; Cuadro 1) (Steel y Torrie, 1986).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La producción de gas resulta de la fermentación de los carbohidratos solubles y estructurales del sustrato, mientras que la fermentación de proteína y lípidos es escasa (Getachew *et al.*, 1998). El perfil del Vf de gas (Figuras 1, 2 y 3) mostró que los tratamientos D0 y D0c producen más gas entre 60 y 80 h de fermentación que PS (Figura 1), pero PS produce más gas de 0 a 25 h de incubación y a las 40 h comienza a disminuir, en comparación con PL, PLc, PLs (Figura 2). Este efecto es poco notorio en TR, TRc y TRs (Figura 3) y en el último tratamiento el secado redujo la producción de gas *in vitro* (Figura 3).

En el Cuadro 2 se presentan los valores medios de la producción de gas (FI, FII y FIII). El FI se presentó entre 5 y 12 h de incubación, FII de 24 a 39 h y FIII de 74 a 84 h. PS produjo más gas ($p \leq 0.05$) en FI (23.123 mL g⁻¹) que D0 (13.630) y D0c (9.911); D0c generó más gas ($p \leq 0.05$) en FII (37.433 mL g⁻¹) y FIII (37.425 mL g⁻¹) que PS. Presumiblemente, el tratamiento alcalino causó cambios estructurales en las fases I y II de Vf. Tarkow y Feist (1969) señalan que el tratamiento con álcalis hidroliza la

of acetic, propionic and butyric, ME, DOM and MM, were analyzed using the procedure MIXED (SAS, 1999) and the means comparison was carried out with orthogonal contrasts ($p \leq 0.01$; Table 1) (Steel and Torrie, 1986).

RESULTS AND DISCUSSION

Gas production is a result of the fermentation of soluble and structural carbohydrates in the substrate, while the fermentation of proteins and lipids is scarce (Getachew *et al.*, 1998). The profile of gas Vf (Figures 1, 2 and 3) showed that the treatments D0 and D0c produce more gas 60 to 80 h after fermentation than PS (Figure 1), although PS produces more gas at 0 to 25 h of incubation and at 40 h, it begins to decrease, in comparison to PL, PLc, PLs (Figure 2). This effect is hardly notorious in TR, TRc and TRs (Figure 3), and in the last treatment, the drying process reduced the *in vitro* production gas (Figure 3).

The average values of gas production (FI, FII and FIII) are shown in Table 2. FI was shown after 5 to 12 h of incubation, FII, 24 to 39 h and FIII, 74 to 84 h. PS produced more gas ($p \leq 0.05$) in FI (23.123 mL g⁻¹) than D0 (13.630) and D0c (9.911); D0c produced more gas ($p \leq 0.05$) in FII (37.433 mL g⁻¹) and FIII (37.425 mL g⁻¹) than PS. Presumably, the alkaline treatment brought about structural changes in phases I and II of Vf. Tarkow and Feist (1969) point out that the treatment with alkalis hydrolyses cellulose, causing the partial loss of its crystalline fraction, turning it into amorphous cellulose, more vulnerable to the enzyme attack, and saponifies it by forming esters between uronic acids and hemicellulose. Likewise, the action of the alkalis modifies some of the fibrous components of the

Cuadro 1. Contrastes ortogonales para el efecto del tratamiento de la paja de sorgo con *Pleurotus sapidus*, *Fomes fomentarius* EUM1 y Ca(OH)₂.
Table 1. Orthogonal contrasts for the effect of the treatment of sorghum straw with *Pleurotus sapidus*, *Fomes fomentarius* EUM1 and Ca(OH)₂.

Contrastes	Tratamientos	Efecto analizado
C1	D0, D0c <i>vs.</i> PL, PLc, TR, TRc	T* biológico <i>vs.</i> alcalino con humedad
C2	PL, PLc, PLs <i>vs.</i> TR, TRc y TRs	Tipo de hongo
C3	D0 <i>vs.</i> PL y TR	T biológico con humedad sin T alcalino
C4	PLs TRs <i>vs.</i> TR y PL	Secado y tamaño de partícula sin T alcalino
C5	PS <i>vs.</i> PLs y TRs	T biológico en seco sin tratamiento alcalino
C6	PL, PLc <i>vs.</i> TR y TRc	Tipo de hongo en humedad con o sin T alcalino
C7	PS, PLs, TRs <i>vs.</i> D0, PL y TR	Humedad sin T alcalino
C8	D0c, PLc, TRc <i>vs.</i> D0, PL y TR	T alcalino-biológico

*T = tratamiento

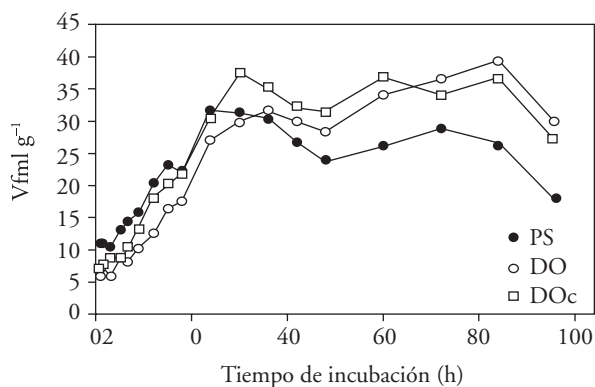


Figura 1. Perfil de producción fraccional de gas *in vitro* de paja (PS), paja húmeda (D0) y paja tratada con Ca(OH)₂ al 0.7 % (D0c).

Figure 1. Profile of fractional production of gas *in vitro* of straw (PS), humid straw (D0) and straw treated with Ca(OH)₂ at 0.7 % (D0c).

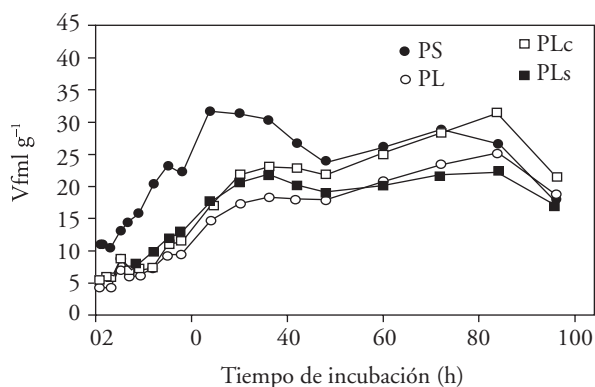


Figura 2. Perfil de producción fraccional de gas *in vitro* paja de sorgo (PS) tratada con: *Pleurotus sapidus* (PL), Ca(OH)₂ al 0.7 % más PL (PLc) y seca (PLs).

Figure 2. Profile of fractional production of gas *in vitro* of sorghum straw (PS) treated with: *Pleurotus sapidus* (PL), Ca(OH)₂ at 0.7 % plus PL (PLc) and dry (PLs).

celulosa provocando la pérdida parcial de su fracción cristalina, transformándola en celulosa amorfa, más vulnerable al ataque enzimático y la saponifica mediante la formación de ésteres entre ácidos urónicos y hemicelulosa. Además, la acción de los álcalis modifica algunos de los componentes fibrosos de la paja (Chen *et al.*, 2007). El D0 sólo superó la producción de gas a PS en FIII. Así también el tratamiento con *P. sapidus* (PL, PLc, PLs) disminuyó ($p \leq 0.05$) la producción de gas en las fracciones FI, FII y FIII, con respecto a PS (Cuadro 2). Para *P. sapidus*, la mezcla de tratamientos (PLc) favoreció ($p \leq 0.05$) la producción de gas en FII y FIII (11.317 y 23.257 mL g⁻¹) comparado con PL (9.788 y 18.019 mL g⁻¹). El

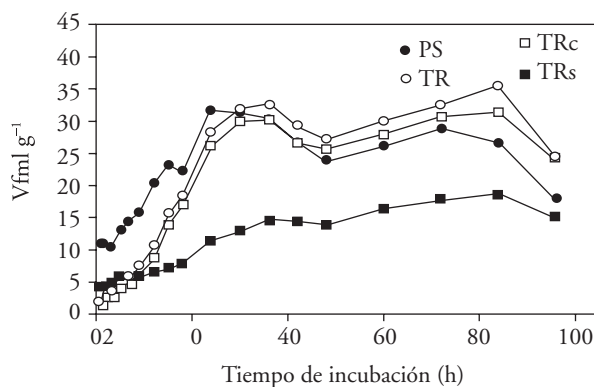


Figura 3. Perfil de producción fraccional de gas *in vitro* de paja de sorgo (PS), paja tratada con: *Fomes fomentarius* EUM1 (TR), Ca(OH)₂ al 0.7 % más *F. fomentarius* EUM1 (TRc) y seco (TRs).

Figure 3. Profile of fractional production of gas *in vitro* of sorghum straw (PS), straw treated with: *Fomes fomentarius* EUM1 (TR), Ca(OH)₂ at 0.7 % plus *F. fomentarius* EUM1 (TRc) and dry (TRs).

Cuadro 2. Volumen fraccional de gas producido durante la fermentación *in vitro* (96 h) de la paja de sorgo tratada con *Pleurotus sapidus*, *Fomes fomentarius* EUM1 o Ca(OH)₂ al 0.7 %.

Table 2. Fractional volume of gas produced during the fermentation *in vitro* (96 h) of the sorghum straw treated with *Pleurotus sapidus*, *Fomes fomentarius* EUM1 or Ca(OH)₂ at 0.7 %.

Tratamiento	Fracción de degradación [†]		
	FI	FII	FIII
	Volumen fraccional de gas (mL g ⁻¹)		
PL	9.788 a	18.019 b	25.477 b
PLc	11.317 a	23.257 a	31.626 a
PLs	10.460 a	21.571 a	22.664 c
TR	12.416 a	32.496 a	35.411 a
TRc	9.740 b	30.465 a	32.388 a
TRs	7.394 c	15.973 b	19.449 b
D0	13.633 b	31.633 a,b	39.923 a
D0c	9.911 c	37.433 a	37.425 b
PS	23.123 a	31.535 b	30.236 c

Medias con distinta literal en una columna son diferentes ($p \leq 0.05$) ♦ Means with different letter in a column are different ($p \leq 0.05$).

[†] FI: fracción de carbohidratos de rápida fermentación; FII: fracción de carbohidratos estructurales; FIII: fracción de compuestos como lignina ♦ FI: fraction of fermented polysaccharides; FII: fraction of structural polysaccharides; FIII: fraction of like lignin compounds.

straw (Chen *et al.*, 2007). D0 only surpassed the gas production of PS in FIII. Also, the treatment with *P. sapidus* (PL, PLc, PLs) decreased ($p \leq 0.05$) gas

tratamiento con *F. fomentarius* EUM1 (TR, TRc, TRs) disminuyó ($p \leq 0.05$) la producción de gas sólo en FI, con respecto a PS, excepto en TRs que se secó y molió antes de fermentarla *in vitro*. El tratamiento con hongos o cultivo sólido, redujo la producción del Vf en FI y modificó la fase II (32.496 TR), lo cual muestra el cambio estructural provocado por los hongos. Los hongos de la pudrición blanca como *P. sapidus* y *F. fomentarius* EUM1 consumen nutrientes de la paja durante su crecimiento y producen otros metabolitos, como enzimas, durante su desarrollo. Así, Meneses *et al.* (2009) señalan que la máxima actividad enzimática de xilanasas y celulasas de *P. sapidus* y *F. fomentarius* EUM1 en paja de sorgo ocurre antes de la máxima producción de lacasas entre los días 9 y 15. Los tratamientos TR y TRc mostraron mejor actividad de: xilanasas, 79.47 ± 8.69 y 68.95 ± 0.07 U g^{-1} MS; de celulasas, 15.24 ± 0.99 y 12.01 ± 0.07 U g^{-1} MS; y lacasas, 2.45 ± 0.00 y 10.66 ± 0.21 U g^{-1} MS. Las celulasas y xilanasas actúan sinérgicamente para hidrolizar mejor las paredes celulares (Bhat y Hazlewood, 2001); además, los hongos de la pudrición blanca usan carbohidratos solubles antes de degradar lignina (Krause *et al.* 2003). Contradictoriamente, para preparaciones enzimáticas (actividad xilanasas y celulasas) de *Trichoderma viridae*, *T. longibrachiatum* y *Aspergillus niger* en heno de pasto, los tratamientos con enzimas estimulan las fases iniciales de degradación del sustrato, pero estos efectos se reducen a medida que aumenta el tiempo de fermentación (Giraldo *et al.*, 2007; Nserko *et al.*, 1999).

En el Cuadro 3 se presentan los valores para V_{max} , L, S, DIVMS y FDNr. Para V_{max} hubo efecto ($p \leq 0.01$) en C1, C3, C4, C5, C6 y C7, pero no ($p > 0.01$) para C2 y C8. El tratamiento biológico (C1) produjo 93 mL g^{-1} menos de V_{max} en comparación al tratamiento alcalino (D0 y D0c). Además los tratamientos TR y TRc muestran mayor V_{max} en comparación con los tratamientos con PL y PLc (C6). La variable V_{max} se relaciona con la fermentación potencial de un alimento y con la cantidad, disponibilidad y composición química del sustrato. La fase Lag o fase de retardo es el tiempo antes de que los microorganismos inicien la degradación de los componentes del sustrato. Al respecto, V_{max} , S y L fueron mayores cuando la paja fue tratada con $Ca(OH)_2$. Las variables de fermentación fueron menores en la paja tratada con *P. sapidus* y la tratada con *F. fomentarius* EUM1 y $Ca(OH)_2$.

production in fractions FI, FII and FIII, in regard to PS (Table 2). For *P. sapidus*, the combination of treatments (PLc) favored ($p \leq 0.05$) the production of gas in FII and FIII (11.317 and 23.257 mL g^{-1}) in comparison to PL (9.788 and 18.019 mL g^{-1}). The treatment with *F. fomentarius* EUM1 (TR, TRc, TRs) reduced ($p \leq 0.05$) gas production only in FI, in regard to PS, except in TRs, which was dried and ground before fermenting it *in vitro*. The treatment with fungi or solid culture reduced the production of Vf in FI and modified phase II (32.496 TR), which shows the structural change caused by the fungi. White rot fungi such as *P. sapidus* and *F. fomentarius* EUM1 consume nutrients from the straw during their growth and produce other metabolites, such as enzymes, during their development process. In this regard, Meneses *et al.* (2009) point out that the highest enzyme activity of xylanases and cellulases of *P. sapidus* and *F. fomentarius* EUM1 in sorghum straw occurs before the highest production of laccases, between days 9 and 15. Treatments TR and TRc showed a better activity of: xylanases, 79.47 ± 8.69 and 68.95 ± 0.07 U g^{-1} DM; cellulases, 15.24 ± 0.99 and 12.01 ± 0.07 U g^{-1} DM; and laccases, 2.45 ± 0.00 and 10.66 ± 0.21 U g^{-1} DM. Cellulases and xylanases act synergistically to hydrolyze the cell walls better (Bhat and Hazlewood, 2001); also, white rot fungi use soluble carbohydrates before degrading lignin (Krause *et al.* 2003). In contradiction to this, for enzyme preparations (activity xylanases and cellulases) of *Trichoderma viridae*, *T. longibrachiatum* and *Aspergillus niger* in grass hay, enzyme treatments stimulate the initial phases of substrate degradation, although these effects are reduced as the time of fermentation is increased (Giraldo *et al.*, 2007; Nserko *et al.*, 1999).

The values for V_{max} , L, S, IVDMD and FDNr are shown in Table 3. V_{max} had a greater effect ($p \leq 0.01$) in C1, C3, C4, C5, C6 and C7, but not ($p > 0.01$) for C2 and C8. The biological treatment (C1) produced 93 mL g^{-1} less V_{max} than the alkaline treatment (D0 and D0c). Also, treatments TR and TRc show higher V_{max} than treatments with PL and PLc (C6). The variable V_{max} is related to the potential fermentation of a nutrient and with the amount, availability and chemical composition of the substrate. The phase Lag, or delay phase, is the time before which the microorganisms begin the breakdown of the substrate. In this sense, V_{max} , S

Cuadro 3. Variables de producción de gas *in vitro* en paja de sorgo (96 h).
Table 3. Variables of *in vitro* gas production in sorghum straw (96 h).

Tratamiento	Vmax (mL g ⁻¹)	S (h ⁻¹)	L (h)	DIVMS	FDNr (%)
PS (1)	351.60	0.02	2.24	53.49	67.98
D0 (2)	343.65	0.01	7.61	29.60	86.79
D0c (3)	382.10	0.01	6.31	37.53	86.60
PL (4)	217.75	0.01	5.79	51.76	91.67
PLc (5)	264.75	0.01	6.22	46.85	92.11
TR (6)	311.51	0.02	10.89	35.22	87.11
TRc (7)	281.20	0.02	11.86	39.77	89.72
PLs (8)	233.38	0.01	4.71	43.24	80.24
TRs (9)	168.61	0.01	5.07	36.47	81.01
EEM	10.12	0.00	0.53	1.04	2.44

Contrastes: C1=2,3 vs 4,5,6,7; C2=4,5,8 vs 6,7,9; C3=2 vs 4,6; C4=8,9 vs 4,6; C5=1 vs 8,9; C6=4,5 vs 6,7; C7=1,8,9 vs 2,4,6; C8=3,5,7 vs 2,4,6. Contrastes significativos: 1) Vmax: C1, C3, C4, C5 C6 C7 ≤ 0.001; 2) S: C2, C4, C5, C6 ≤ 0.001; 3) L: C1 ≤ 0.002, C2, C4 ≤ 0.001, C5 ≤ 0.003, C6, C7 ≤ 0.001; 4) DIVMS: C2, C3, C5 ≤ 0.001, C6 ≤ 0.003, C7 ≤ 0.001; 5) FDNr: C4 ≤ 0.001, C5 ≤ 0.006, C7 ≤ 0.001. ♦
 Contrasts: C1=2,3 vs 4,5,6,7; C2=4,5,8 vs 6,7,9; C3=2 vs 4,6; C4=8,9 vs 4,6; C5=1 vs 8,9; C6=4,5 vs 6,7; C7=1,8,9 vs 2,4,6; C8=3,5,7 vs 2,4,6. Significant contrasts: 1) Vmax: C1, C3, C4, C5 C6 C7 ≤ 0.001; 2) S: C2, C4, C5, C6 ≤ 0.001; 3) L: C1 ≤ 0.002, C2, C4 ≤ 0.001, C5 ≤ 0.003, C6, C7 ≤ 0.001; 4) DIVMS: C2, C3, C5 ≤ 0.001, C6 ≤ 0.003, C7 ≤ 0.001; 5) FDNr: C4 ≤ 0.001, C5 ≤ 0.006, C7 ≤ 0.001.

La producción de gas mejora al incubar forrajes tratados con enzimas exógenas (Colombatto *et al.*, 2003; Carro *et al.*, 2005) y es directamente proporcional a la tasa de degradación del sustrato (France *et al.*, 2000). En el presente estudio la producción de gas se redujo presumiblemente por el consumo de nutrientes por los hongos y debido a que la adición de nuevos metabolitos fúngicos, como proteína enzimática, no fue importante. La velocidad con la cual los microorganismos del rumen fermentan los componentes del alimento o tasa de producción de gas (S), mostró un efecto ($p \leq 0.01$) en C2, C4, C5, C6. El C5 hace suponer que el tratamiento biológico (PLs y TRs) disminuye S y al comparar el tipo de hongo, *F. fomentarius* EUM1 fermentó más rápidamente (0.02 h^{-1} ; $p \leq 0.01$) la paja que *P. sapidus* (C2 y C6). Además el proceso de secado de la paja antes de la producción de gas *in vitro* disminuyó S (0.01 h^{-1}) en comparación con los tratamientos húmedos (C4) donde hubo mayor producción ($p \leq 0.01$). En la fase de retardo (L) el tratamiento de la paja con *P. sapidus* mostró un menor tiempo de retardo de la producción de gas *in vitro*, en contraste al tratamiento con *F. fomentarius* EUM1 (C2 y C6). El secado de la paja (PLs y TRs) antes de la producción de gas *in vitro* redujo el tiempo de retardo (C4). En la DIVMS, contrariamente a Vmax, el tratamiento de la paja con *P. sapidus* mejoró la digestibilidad en comparación al tratamiento con *F. fomentarius* EUM1 (C2 y C6). Además, el tratamiento

and L were greater when the straw was treated with Ca(OH)_2 . The fermentation variables were lower in the straw treated with *P. sapidus* and that treated with *F. fomentarius* EUM1 and Ca(OH)_2 .

Gas production improves when incubating forage treated with exogenous enzymes (Colombatto *et al.*, 2003; Carro *et al.*, 2005) and is directly proportional to the rate of substrate degradation (France *et al.*, 2000). In this study, the gas production was reduced, presumably due to the intake of nutrients by the fungi and to the addition of new fungal metabolites, as enzymatic protein, was not important. The speed with which the microorganisms of the rumen ferment the components of the food or gas production rate (S), showed an effect ($p \leq 0.01$) on C2, C4, C5, C6. The C5 leads to suppose that the biological treatment (PLs and TRs) reduces S and when comparing fungal types, *F. fomentarius* EUM1 fermented the straw quicker (0.02 h^{-1} ; $p \leq 0.01$) than *P. sapidus* (C2 and C6). Also, the process of drying the straw before *in vitro* gas production was decreased S (0.01 h^{-1}) in comparison to the humid treatments (C4), where production was higher ($p \leq 0.01$). In the lag phase (L) the treatment of straw with *P. sapidus* showed a lower lag time in the *in vitro* gas production, as opposed to the treatment with *F. fomentarius* EUM1 (C2 and C6). Drying the straw (PLs and TRs) before the *in vitro* gas production reduced the time of delay (C4). In IVDMD, contrary to Vmax, the treatment

biológico (PLs, PL, TR y TRs) disminuyó la digestibilidad de la paja de sorgo (C3, C5 y C7).

El tratamiento con hongo disminuyó la DIVMS (Cuadro 3), lo cual se atribuye al consumo de nutrientes durante el tiempo de crecimiento del hongo sobre la paja de sorgo. Sin embargo, Peláez *et al.* (2008) indican que el tratamiento con hongos mejora la DIVMS *in vitro*; además, Agosin *et al.* (1985) señalan un aumento de 30 % en la DIVMS de paja de trigo tratada con *Dichomitus squalens* y *Cyathus stercoreus*. Pero según Eun y Beauchemin (2007), muchos productos enzimáticos disminuyen la eficiencia de fermentación, así como la materia orgánica degradada por mL de gas producido en 18 h de incubación, y la degradación es proporcional a la cantidad de endoglucanasas usada.

Los AGV totales (Cuadro 4) variaron de 12 a 23 mmol dL⁻¹; el ácido acético varió de 69 a 71 mmol dL⁻¹, el ácido propiónico de 19 a 21 mmol dL⁻¹, y el ácido butírico de 8 a 11 mmol dL⁻¹. Las concentraciones de ácido acético, propiónico y butírico a 12 h de incubación no se reportan en este documento ya que los contrastes no mostraron diferencias (p>0.01), por lo cual el análisis se orientó a los datos de 24 h. Hubo efecto de bloque y tratamiento (p≤0.01) en los AGV totales, acético, propiónico y butírico a las 24 h de fermentación. La concentración de AGV totales disminuyó (p≤0.01) por el tratamiento fúngico de

of straw with *P. sapidus* improved digestibility, as compared to the treatment with *F. fomentarius* EUM1 (C2 and C6). Also, the biological treatment (PLs, PL, TR and TRs) reduced the digestibility of the sorghum straw (C3, C5 y C7).

The treatment with fungi reduced IVDMD (Table 3), which is due to the intake of nutrients during the time of growth of the fungus on the sorghum straw. However, Peláez *et al.* (2008) point out that the treatment with fungi improves the *in vitro* IVDMD; also, Agosin *et al.* (1985) indicate an increase of 30 % in the IVDMD of wheat straw treated with *Dichomitus squalens* and *Cyathus stercoreus*. However, according to Eun and Beauchemin (2007), many enzyme products reduce the efficiency of fermentation, as well as the organic matter degraded by mL of gas produced in 18 h of incubation, and the degradation is proportional to the amount of endoglucanasas used.

The total VFA (Table 4) varied from 12 to 23mmol dL⁻¹; acetic acid varied from 69 to 71 mmol dL⁻¹, propionic acid, from 19 to 21 mmol dL⁻¹ and butyric acid, from 8 to 11 mmol dL⁻¹. The concentrations of acetic, propionic and butyric acids after 12 h of incubation no are not reported in this document, since the contrasts did not show differences (p>0.01), which is why the analysis pointed to the data for 24 h. There were significant block

Cuadro 4. Ácidos grasos volátiles (AGV) y nitrógeno amoniacal (N-NH₃).

Table 4. Volatile fatty acids (VFA) and ammonia nitrogen (NH₃-N).

Tratamiento	AGV totales Mmol dL ⁻¹		Acético %	Propiónico %	Butírico %	N-NH ₃ mol dL ⁻¹
	12 h	24 h	24 h			
PS (1)	16.20	23.20	69.80	21.23	8.96	20.41
D0 (2)	13.00	16.50	70.99	19.56	9.44	17.72
D0c (3)	17.40	21.90	70.05	20.37	9.56	18.65
PL (4)	14.70	17.10	70.55	20.50	8.94	18.14
PLc (5)	14.20	16.00	70.19	20.69	9.11	15.14
TR (6)	12.60	17.10	70.22	20.84	8.92	17.40
TRc (7)	12.60	18.10	69.53	20.70	9.75	18.82
PLs (8)	12.70	16.50	70.83	20.23	8.93	20.16
TRs (9)	12.30	15.10	71.38	19.78	8.83	20.14
EEM	0.01	0.01	0.65	0.32	0.36	1.51

Contrastes: C1=2,3 vs 4,5,6,7; C2=4,5,8 vs 6,7,9; C3=2 vs 4,6; C4=8,9 vs 4,6; C5=1 vs 8,9; C6=4,5 vs 6,7; C7=1,8,9 vs 2,4,6; C8=3,5,7 vs 2,4,6. Contrastes significativos: 1) Total AGV 12h: C1≤0.003, C5≤0.002, 24 h: C1, C5, C8≤0.001; 2) acético: C4≤0.002, C5≤0.003; 3) propiónico: C3, C4, C5≤0.001; 4) butírico: C3≤0.006, C8≤0.003. EEM = error estándar de la media ♦ Contrastes: C1=2,3 vs 4,5,6,7; C2=4,5,8 vs 6,7,9; C3=2 vs 4,6; C4=8,9 vs 4,6; C5=1 vs 8,9; C6=4,5 vs 6,7; C7=1,8,9 vs 2,4,6; C8=3,5,7 vs 2,4,6. Significant constrasts: 1) Total VFA 12h: C1≤0.003, C5≤0.002, 24 h: C1, C5, C8≤0.001; 2) acetic C4≤0.002, C5≤0.003; 3) propionic: C3, C4, C5≤0.001; 4) butiric: C3≤0.006, C8≤0.003. EEM = mean standard error.

la paja (C1, C5), pero aumentó ($p \leq 0.01$) debido al tratamiento con $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (C8). La proporción molar de ácido acético y propiónico fue ligeramente mayor ($p \leq 0.01$) cuando la paja se secó y molió antes de realizar la prueba de fermentación (C4), y fue menor ($p \leq 0.01$) cuando la paja se trató con $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (C8). Este último contraste también fue significativo para ácido butírico. La concentración de N-NH_3 (Cuadro 4) entre 12 y 24 h fue similar (15 a 20 mmol dL^{-1}) entre tratamientos ($p \geq 0.01$).

La EM y DMO calculadas (Cuadro 5) fueron menores ($p \leq 0.01$) en la paja tratada con *P. sapidus* y *F. fomentarius* EUM1, en comparación con los tratamientos húmedos D0 y D0c o PS (C1, C3, C5). La biomasa microbiana (MM) y adherencia (Cuadro 5) fueron mayores cuando la paja fue tratada con *P. sapidus* y *F. fomentarius* EUM1, con o sin $\text{Ca}(\text{OH})_2$, (C1, C3, C5). Cuando se comparó PL vs TR (C6), PL incrementó ($p \leq 0.01$) la MM y la adherencia según los cálculos con los modelos matemáticos de Menke y Steingas (1998). Cuando *P. sapidus* crece sobre la paja se forman o liberan sustancias nutritivas que pueden actuar como promotores del crecimiento microbiano. Según Martin y Nisbet (1992), los productos de la fermentación con *Saccharomyces cerevisiae* y *Aspergillus oryzae* contienen metabolitos o productos de la fermentación que estimulan el crecimiento de microorganismo ruminales. Varias enzimas fibrolíticas

and treatment effects ($p \leq 0.01$) in the total acetic, propionic, butyric and total volatile fatty acids after 24 h of fermentation. The concentration of total VFA fell ($p \leq 0.01$) due to the straw fungal treatment (C1, C5), but it increased ($p \leq 0.01$) due to the treatment with $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (C8). The molar proportion of acetic and propionic acids was slightly higher ($p \leq 0.01$) when the straw was dried and ground before the fermentation test (C4), and it was lower ($p \leq 0.01$) when the straw was treated with $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (C8). The latter contrast was also significant for butyric acid. The concentration of $\text{NH}_3\text{-N}$ (Table 4) from 12 to 24 h was similar (15 to 20 mmol dL^{-1}) between treatments ($p \geq 0.01$).

The ME and DOM calculated (Table 5) were lower ($p \leq 0.01$) in the straw treated with *P. sapidus* and *F. fomentarius* EUM1, than in the humid treatments D0 and D0c or PS (C1, C3, C5). The microbial biomass (MM) and adherence (Table 5) were greater when the straw was treated with *P. sapidus* and *F. fomentarius* EUM1, with or without $\text{Ca}(\text{OH})_2$, (C1, C3, C5). When comparing PL vs TR (C6), PL increased ($p \leq 0.01$) MM and adherence, according to the estimates using the mathematical models by Menke and Steingas (1998). When *P. sapidus* grows on the straw, nutritional substances are released that can act as microbial growth enhancers. According to Martin and Nisbet (1992), the products of fermentation

Cuadro 5. Variables calculadas de la producción de gas *in vitro* (96 h).

Table 5. Variables calculated from the *in vitro* gas production (96 h).

Tratamiento	EM kJ kg^{-1} MS	DMO %	MM mg g^{-1} MS	Adherencia microbiana mg g^{-1} MS
PS	7.14	48.32	270.03	147.53
D0	5.58	37.71	104.14	56.45
D0c	6.38	43.25	142.66	74.05
PL	4.48	30.72	305.72	116.36
PLc	4.89	33.52	209.39	93.69
TR	5.16	35.23	174.34	70.22
TRc	4.79	32.94	204.45	77.81
PLs	4.96	33.85	235.69	96.26
TRs	4.09	28.28	218.64	76.53
EEM	0.20	1.37	10.08	4.02

Contrastes: C1=2,3 vs 4,5,6,7; C2=4,5,8 vs 6,7,9; C3=2 vs 4,6; C4=8,9 vs 4,6; C5=1 vs 8,9; C6=4,5 vs 6,7; C7=1,8,9 vs 2,4,6; C8=3,5,7 vs 2,4,6. Contrastes significativos: 1) EM: C1 \leq 0.001, C3 \leq 0.005, C5 \leq 0.001; 2) DMO: C1 \leq 0.001, C3 \leq 0.007, C5 \leq 0.001; 3) MM: C1, C2, C3 \leq 0.001, C5 \leq 0.001, C6, C7 \leq 0.001; 4) adherencia microbiana: C1, C2, C3, C5 C6, C7 \leq 0.001. EEM= error estándar de la media ♦ Contrastes: C1=2,3 vs 4,5,6,7; C2=4,5,8 vs 6,7,9; C3=2 vs 4,6; C4=8,9 vs 4,6; C5=1 vs 8,9; C6=4,5 vs 6,7; C7=1,8,9 vs 2,4,6; C8=3,5,7 vs 2,4,6. Significant contrasts: 1) EM: C1 \leq 0.001, C3 \leq 0.005, C5 \leq 0.001; 2) DOM: C1 \leq 0.001, C3 \leq 0.007, C5 \leq 0.001; 3) MM: C1, C2, C3 \leq 0.001, C5 \leq 0.001, C6, C7 \leq 0.001; 4) microbial adherence: C1, C2, C3, C5 C6, C7 \leq 0.001. EEM = mean standard error.

exógenas mejoran algunos componentes de forrajes para rumiantes, con diversos mecanismos de acción: unas aumentan el ataque microbiano y otras mejoran la colonización de la pared vegetal (Newbold, 1997). Sin embargo, algunos efectos no pueden ser equiparables al cultivo sólido ya que éste contiene complejos enzimáticos lignocelulósicos y otros metabolitos derivados del crecimiento de los hongos.

En este estudio no se encontró efecto de secado (C4), el cual puede estar confundido con el efecto de tamaño de partícula. Las muestras en fresco pueden producir menores volúmenes de gas que las secas (Lowman *et al.*, 2002), debido a que el secado modifica los alimentos facilitando el ataque microbiano y la fermentación, lo cual aumenta la producción de gas. Según Rymer *et al.* (2005), cuando se hidratan muestras antes de la fermentación, aumenta el volumen de gas producido y mejora el inicio de la segunda fase de producción de gas. Además, el hecho de que el humedecimiento de la paja haya reducido V_{max} y S, puede deberse a que el tamaño de partícula fue menor en el sustrato seco y mayor en el húmedo. Wimer *et al.* (1990) mencionan que el tamaño de partícula es un factor importante en la degradación ruminal y ataque de enzímico pues las bacterias ruminales tienen mayor acceso a la superficie de las paredes vegetales, para su subsecuente degradación.

CONCLUSIONES

El tratamiento alcalino mejoró las variables fermentativas. Pero el tratamiento de la paja con *Pleurotus sapidus* promovió la formación de biomasa microbiana y la producción de AGV totales y ácido propiónico a las 24 h. Aunque el tratamiento fúngico redujo las variables de la producción de gas *in vitro*, el aumento significativo en la formación de masa microbiana es importante por su contribución al aporte de proteína y la transformación de nutrientes. Pero el sinergismo entre tratamiento alcalino y hongos no mostró resultados significativos en las variables fermentativas.

LITERATURA CITADA

- Agosin, E., B. Monties, and E. Odier. 1985. Structural changes in wheat straw components during decay by lignin-degrading white-rot fungi in relation to improvement of digestibility for ruminants. *J. Sci. Food. Agric.* 36: 925-935.
- Aiple, K. P., H. Steingass, and W. Drochner. 1996. Prediction of net energy content of raw materials and compound feeds

with *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus oryzae* contain metabolites or products of fermentation that stimulate the growth of ruminal microorganisms. Several exogenous fibrolytic enzymes improve some components of forage for ruminants, in various ways: some increase the microbial attack and others improve the colonization of the cell wall (Newbold, 1997). However, some effects can't be compared to the solid culture, since it contains lignocellulosic enzyme complexes and other metabolites derived from fungal growth.

In this study there was no effect of drying (C4), which may be confused with the effect of the particle size of portions. The fresh samples may produce lower volumes of gas than the dry samples (Lowman *et al.*, 2002), due to the fact that drying modifies the nutrients, facilitating microbial attack and fermentation, which increases gas production. According to Rymer *et al.* (2005), when samples are hydrated before fermentation, the volume of gas produced increase, improving the beginning of the second phase of gas production. Also, the fact that the humidification of the straw reduced V_{max} and S, could be due to the sizes of the portions were lower in the dry substrate and higher in the humid one. Wimer *et al.* (1990) mention that the size of the portion is an important factor in ruminal breakdown and enzyme attacks, since ruminal bacteria have a greater access to the surface of the cell walls, for their subsequent breakdown.

CONCLUSIONS

The alkaline treatment improved the fermentative variables. However, the treatment of straw with *Pleurotus sapidus* promoted the formation of microbial biomass and the production of total VFA and propionic acid after 24 h. Although the fungal treatment reduced the variables of the *in vitro* gas production, the significant increase in the formation of microbial mass is important due to its protein contribution and the transformation of nutrients. But the synergism between the alkaline treatment and fungi produced no significant results in the fermentative variables.

—End of the English version—

-----*-----

- for ruminants by different laboratory methods. *Arch. Anim. Nutr.* 23: 1508-1513.
- Álvarez, R., and J. Combellas. 2005. Evaluation of poultry litter on sorghum straw intake and dry matter disappearance using dry cows. *Rev. Bras. Zootec.* 34(2): 584-588.
- Bhat, M. K., and G. P. Hazlewood. 2001. Enzymology and other characteristics of cellulases and xylanases. *In: Bedford, M. R., and G. G. Partridge, (eds). Enzymes in Farm Animal Nutrition.* CABI Publishing, Wallingford, Oxon, UK. pp: 11-60.
- Carro, M. D., M. J. Ranilla, and M. L. Tejido. 2005. Using an *in vitro* gas production technique to examine feed additives: effects of correcting values for different blanks. *Anim. Feed Sci. Technol.* 123-124: 173-184.
- Colombatto, D., D. P. Morgavi, A.F. Furtado, and K.A. Beauchemin. 2003. Screening of exogenous enzymes for ruminant diet: relationship between biochemical characteristics and *in vitro* ruminal degradation. *J. Anim. Sci.* 81: 2628-2638.
- Chen, X. L., J. K. Wang, Y. M. Wu, and J. X. Liu. 2007. Effects of chemical treatments of rice straw on rumen fermentation characteristics. *Anim. Feed Sci. Technol.* 141 (1): 1-14
- Eun, J. S., and K. A. Beauchemin. 2007. Assessment of the efficacy of varying experimental exogenous fibrolytic enzymes using *in vitro* fermentation characteristics. *Anim. Feed Sci. Technol.* 132: 298-315.
- Erwin, E. S., G. T. Marco, and E. M. Emery, 1961. Volatile fatty acid analysis of blood and rumen fluid by gas chromatography. *J. Dairy Sci.* 44: 1768-1771.
- France, J., J. Dijkstra, M. S. Dhanoa, S. Lopez, and A. Bannink: 2000. Estimating the extent of degradation of ruminant feeds from a description of their gas production profiles observed *in vitro*: Derivation of models and other mathematical considerations. *Br J. Nutr.* 83: 143-150.
- Gandi, J., M. T. Holtzapfle, A. Ferrer, F. M. Byers, N. D. Turner, M. Nagwani, and S. Chang. 1997. Lime treatment of agricultural residues to improve rumen digestibility. *Anim. Feed Sci. Technol.* 68: 195-211.
- Getachew, G., M. Blümmel, H. P. S. Makkar, and K. Becker. 1998. *In vitro* gas measuring techniques for assessment of nutritional quality of feeds: A review. *Anim. Feed Sci. Technol.* 72: 261-281.
- Getachew, G., E. J. De Peters, P. H. Robinson, and J. G. Fadel. 2005. Use of an *in vitro* rumen gas production technique to evaluate microbial fermentation of ruminant feeds and its impact on fermentation products. *Anim. Feed Sci. Technol.* 123-124: 547-559.
- Giraldo, L. A., M. L. Tejido, M. J. Ranilla, and M. D. Carro. 2007. Effects of exogenous fibrolytic enzymes on *in vitro* ruminal fermentation of substrates with different forage: concentrate ratios. *Anim. Feed Sci. Technol.* 16 (2): 25-30.
- Karma, D. N., and F. Zadrazil. 1986. Influence of gaseous phase, light and substrate pretreatment on fruit body formation, lignin degradation and *in vitro* digestibility of wheat straw fermented with *Pleurotus* sp. *Agric. Wastes* 18: 1-17.
- Karunananda, K., G. A. Varga, D. E. Akin, L. L. Rigsby, and D. J. Royle. 1995. Botanical fractions of rice straw colonized by white-rot fungi: changes in the chemical composition and structure. *Anim. Feed Sci. Technol.* 55: 179-199.
- Krause, D. O., S. E. Denman, R. Mackie, M. Morrison, A.L. Rae, G.T. Attwood, and C.S. McSweeney. 2003. Opportunities to improve fiber degradation in the rumen: microbiology, ecology, and genomics. *FEMS Microbiol. Rev.* 797: 1-31.
- Kung, L. Jr., and A. O. Hession. 1995. Preventing *in vitro* lactate accumulation in ruminal fermentation by inoculating with *Megasphaera elsdenii*. *J. Anim. Sci.* 73: 250-256.
- Lowman, R. S., M. K. Theodorou, and D. Cuddeford. 2002. The effect of sample processing on gas production profiles obtained using the pressure transducer technique. *Anim. Feed Sci. Technol.* 97: 221-237.
- Márquez-Araque, A. T., G. D. Mendoza Martínez, S. S. González Muñoz, S. E. Búntinx Dios, y O. Loera Corral. 2007. Actividad fibrolítica de enzimas producidas por *Trametes* sp. EUM1, *Pleurotus ostreatus* IE8 y *Aspergillus niger* AD96.4 en fermentación sólida. *Interciencia* 32 (11):780-785.
- Martin, S. A., and D. J. Nisbet. 1992. Effect of direct fed microbials on rumen microbial fermentation. *J. Dairy Sci.* 75: 1736-1744.
- Meneses, M., M. Villegas, S. González, L. Miranda, y O. Loera. 2009. Estudio de la composición nutrimental de paja de sorgo tratada con *Trametes* sp. EUM1 y *Pleurotus sapidus*. *In: Memorias del XII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería.* Guerrero, México. CD.
- Menke, K. H., L., Raab, A., Salewski, H., Steingass, D. Fritz, and W. Schneider 1979. The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor *in vitro*. *J. Agric. Sci. (Camb.)* 92: 217 -222.
- Menke K. H., and H. Steingass. 1998. Estimation of the energetic feed value from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid. *Anim. Res. Develop.* 28: 7-55
- Newbold, C.J., 1997. Proposed mechanisms of enzymes as modifiers of ruminal fermentation. *In: Staple, C.R. (ed). Proc. 8th Annual Florida Ruminant Nutrition Symp, USA.* pp: 146-159.
- Nsereko, V.L., L.M. Rode, K.A. Beauchemin, T.A. McCallister. D.P. Morgavi, A. Furtado, Y. Wang, A.D. Iwaasa, and W.Z., Yang. 1999. Effect of feeding a fungal enzyme preparation from *Trichoderma longibrachiatum* on the ruminal microbial population of dairy cows. IX Int. Symp. Rumen Physiol. Pretoria, South Africa. pp: 17-22 p.
- Órskov, E.R., and L.M. McDonald. 1979. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurement weighted according to rate of passage. *J. Agric. Sci. (Cambridge)* 92: 499-503
- Peláez, A. A., M. Meneses, R.L. Miranda, R.M. Megias, G.R. Barcena, y O. Loera. 2008. Ventajas de la fermentación sólida con *Pleurotus sapidus* en ensilajes de caña de azúcar. *Arch. Zootec.* 57(217): 25-33.
- Pitt, R. E., T. L. Cross, A. N. Pell, P. Shofield, and P. H. Doane. 1999. Use of *in vitro* gas production models in ruminal kinetics. *Math. Biosci.* 159: 145-163.
- Posada S. L., y R. R. Noguera. 2005. Técnica *in vitro* de producción de gases: Una herramienta para la evaluación de alimentos para rumiantes. *Liv. Res. Rural Development* 17:36. <http://www.cipav.org.co/lrrd/lrrd17/4/posal7036.htm>. (Consulta: febrero 2009).
- Rymer, C., J. A. Huntington, B. A. Williams, and D. I. Givens. 2005. *In vitro* cumulative gas production techniques: History, methodological considerations and challenges. *Anim. Feed Sci. Technol.* 123- 124: 9-30.
- SAS, 1999. SAS/STAT User's Guide, Version 8. Statistical Analysis System Institute Inc., Cary, NC, USA.

- SIAP, 2008 http://www.siap.sagarpa.mx/ar_compec_avan.html (consulta: noviembre 2008).
- Steel, G. R., y J. H. Torrie. 1986. Bioestadística: Principios y Procedimientos. 2da edición. Ed. McGraw-Hill. México, D.F. pp: 167-171.
- Tarkow, H., and W. C. Feist. 1969. A mechanism for improving the digestibility of lignocellulosic materials with dilute alkali and liquid ammonia. Amer. Chem. Soc. Adv. Chem. Ser. (95): 197-218.
- Theodorou, M. K., B. A. Williams, M. S. Dhanoa, A. B., McAllan, and J. France. 1994. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. Anim. Feed Sci. Technol. 48: 185-197.
- Tricarico, J. M., and K. A. Dawson. 2005. Influence of supplemental endoglucanase or xylanase on volatile fatty acid production from ruminant feed by ruminal *in vitro* cultures. Archiv. Anim. Nutri. 59 (5): 325-34
- Wimer, P. J., Lopez- Guisa, and A. D. French. 1990. Effect of cellulose fine structure on kinetics of its digestion mixed microorganism *in vitro*. Appl. Environ. Microbiol. 56(26): 1-275.