

DEGRADACIÓN DE SUSTRATOS LIGNOCELULÓSICOS Y PRODUCCIÓN DE BIOGÁS *in vitro* POR FERMENTACIÓN SÓLIDA CON *Pleurotus ostreatus*

LIGNOCELLULOSIC SUBSTRATES DEGRADATION AND *in vitro* BIOGAS PRODUCTION BY SOLID FERMENTATION WITH *Pleurotus ostreatus*

Jerónimo Herrera-Pérez¹, Xóchilt Rosales-Barragán², Paulino Sánchez-Santillán^{1*}, Nicolás Torres-Salado¹, Marco Antonio Ayala-Monter¹, Diego Felipe Portela-Díaz³, Daniel Hernández-Valenzuela⁴

²Licenciatura de Médico Veterinario Zootecnista. ¹Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia No. 2, Universidad Autónoma de Guerrero. Km 197, Carretera Acapulco-Pinotepa Nacional. 41940. Cuajinicuilapa, Guerrero. (sanchezsantillanp@gmail.com). ³Ingeniería en Agroindustrias, Universidad de la Costa. Carretera Libramiento Paraje de las Pulgas. 71600. Pinotepa Nacional. Oaxaca. ⁴Facultad de Ciencias Agropecuarias y Ambientales, Avenida Periférico Poniente s/n, Colonia Villa de Guadalupe. 40040, Iguala de la Independencia, Guerrero.

RESUMEN

Los residuos agrícolas y pastos henificados con más de 150 d de rebrote se caracterizan por su alto contenido en fibra y *Pleurotus ostreatus* digiere lignina, celulosa y hemicelulosa. La hipótesis fue que *Pleurotus ostreatus* mejora las características químicas y el valor nutricional de rastrojos y pasturas para la alimentación pecuaria. El objetivo fue determinar las características químicas de valor nutricional, producción de biogás y degradaciones *in vitro* de rastrojo de maíz y pasto mulato (*Brachiaria* híbrido) tratado con las cepas MR y P15 de *P. ostreatus* por 15 y 30 d en fermentación sólida. Las cepas se reactivaron en agar papa-dextrosa y se propagó en sorgo. En un matraz Erlenmeyer se colocaron 50 g de sustrato estéril (80% de humedad) y 5% de inóculo y se fermentaron por 15 y 30 d. Al término, se determinaron las características químicas de valor nutricional, se estimó la producción de biogás y metano (CH₄) y degradaciones de materia seca (DMS) y de fibra detergente neutro (DFDN). El diseño experimental fue completamente al azar con arreglo factorial 2³. Los fermentos de rastrojo de maíz en 30 d presentaron contenido mayor de proteína cruda. El contenido menor de fibra detergente neutro (FDN) estuvo en rastrojo de maíz con cualquier cepa. El rastrojo de maíz con P15 redujo más fibra detergente ácido (FDA) que MR. El fermento con 30 d mostró mayor FDA en los sustratos evaluados. El pasto mulato con la cepa MR produjo más biogás acumulado que con P15. Los fermentos con 30 d produjeron más biogás acumulado que los de 15 d (p≤0.05). Ni los sustratos ni las cepas mostraron diferencias en la producción de CH₄ acumulado (p>0.05). Los fermentos de 30 d con cualquier cepa en

ABSTRACT

Agricultural residues and hay pastures with more than 150 d of regrowth are characterized by their high fiber content; *Pleurotus ostreatus* digests lignin, cellulose and hemicellulose. The hypothesis of this study was that *Pleurotus ostreatus* improves the chemical characteristics and nutritional value of crop residues and pasture for animal feeding. The objective was to determine the chemical characteristics of nutritional value, biogas production and *in vitro* degradation of corn stubble and mulatto grass (*Brachiaria* hybrid) treated with the MR and P15 strains of *P. ostreatus* for 15 and 30 d in solid fermentation. The strains were reactivated on potato dextrose agar medium, and propagated on sorghum. In an Erlenmeyer flask, 50 g of sterile substrate (80% humidity) and 5% inoculum were placed and fermented for 15 and 30 days. At the end, we determined the chemical characteristics of nutritional value, and estimated the production of biogas and methane (CH₄), and the degradation of dry matter (DMS) and neutral detergent fiber (DFDN). The experimental design was completely randomized with a 2³ factorial arrangement. The corn stubble ferments at 30 d presented higher crude protein content. The lowest neutral detergent fiber (FDN) content was found in corn stubble with any strain. Corn stubble with P15 reduced more acid detergent fiber (FDA) than MR. The ferment of 30 d showed higher FDA in the evaluated substrates. Mulatto grass with MR strain produced more accumulated biogas than with P15. Ferments of 30 d produced more accumulated biogas than those of 15 d (p≤0.05). Neither the substrates nor the strains showed differences in the production of accumulated CH₄ (p>0.05). The 30 d ferments with any strain in corn stubble showed higher DMS and DFDN (p≤0.05). *Pleurotus ostreatus* improved the nutrient content and the *in vitro* fermentative

* Autor para correspondencia ♦ Author for correspondence.

Recibido: enero, 2020. Aprobado: septiembre, 2020.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 55: 37-53. 2021.

rastrajo de maíz mostraron DMS y DFDN mayores ($p \leq 0.05$). *Pleurotus ostreatus* mejoró el contenido de nutrientes y las características fermentativas *in vitro* de rastrajo de maíz y pasto mulatto tratados por fermentación sólida.

Palabras clave: fermentación sólida, rastrajo de maíz, *Brachiaria* híbrido, *Pleurotus ostreatus*.

INTRODUCCIÓN

Los residuos agrícolas y los pastos henificados con más de 150 d de rebrote constituyen una parte importante en la alimentación de los rumiantes. Estos ingredientes se caracterizan por su contenido de fibra con un contenido alto de lignina, la cual forma complejos lignocelulósicos difíciles de digerir por los microorganismos ruminales y limita su digestión (Shrivastava *et al.*, 2011; Olivera-De la Cruz *et al.*, 2019). Diversos métodos de pretratamiento existen para mejorar la digestibilidad, que se clasifican como químicos, mecánicos y biológicos o sus combinaciones para reducir el contenido de fibra, en particular el complejo lignocelulósico (Peláez-Acero *et al.*, 2011; Shrivastava *et al.*, 2011; Sánchez-Santillán *et al.*, 2015a). Los pretratamientos biológicos presentan ventajas sobre los pretratamientos químicos y mecánicos, como es el uso menor de productos químicos tóxicos y corrosivos, rendimiento mayor de producto final y reacción secundaria menor (Shrivastava *et al.*, 2011).

Los métodos biológicos incluyen el uso hongos de podredumbre blanca por la producción de enzimas extracelulares (Shrivastava *et al.*, 2011; Tuyen *et al.*, 2012) como celulasas, xilanasas, peroxidases de lignina, manganeso peroxidases y lacasas (Shrivastava *et al.*, 2011), las cuales mejoran el valor nutritivo de subproductos agrícolas con contenido de fibra alto y henos de pastos muy lignificados (Tuyen *et al.*, 2012). Por este tipo de producción de enzimas, los hongos de podredumbre blanca son eficaces en la deslignificación de este tipo de compuestos fibrosos y aumentan el acceso a los carbohidratos estructurales para mejorar su digestión en el rumen (Shrivastava *et al.*, 2011; Nayan *et al.*, 2018).

Los hongos de podredumbre blanca se usan en fermentaciones sólidas y algunos ejemplos son *Phanerochaete chrysosporio*, *Pleurotus* sp., *Lentinus edodes*, *Coriolus Versi*, etc. (Shrivastava *et al.*, 2011). *Pleurotus ostreatus* es un hongo que degrada lignina, celulosa y

characteristics of corn stubble and mulatto grass treated using solid fermentation.

Key words: solid fermentation, corn stubble, *Brachiaria* hybrid, *Pleurotus ostreatus*.

INTRODUCTION

Agricultural residues and hay pastures with regrowth of more than 150 d constitute an important part of ruminant feeding. These ingredients are characterized by their fiber content with a high lignin content, which forms lignocellulosic complexes that are difficult to digest by ruminal microorganisms and limit their digestion (Shrivastava *et al.*, 2011; Olivera-De la Cruz *et al.*, 2019). There are various pretreatment methods to improve digestibility, which are classified as chemical, mechanical and biological or their combinations to reduce the fiber content, in particular the lignocellulosic complex (Peláez-Acero *et al.*, 2011; Shrivastava *et al.*, 2011; Sánchez-Santillán *et al.*, 2015a). Biological pretreatments have advantages over chemical and mechanical ones, such as the lower use of toxic and corrosive chemicals, higher yield of the final product and lower secondary reaction (Shrivastava *et al.*, 2011).

Biological methods include the use of white rot fungi for the production of extracellular enzymes (Shrivastava *et al.*, 2011; Tuyen *et al.*, 2012), such as cellulases, xylanases, lignin peroxidases, manganese peroxidases and laccases (Shrivastava *et al.*, 2011), which improve the nutritional value of high-fiber agricultural by-products and highly lignified grass hay (Tuyen *et al.*, 2012). Due to this type of enzyme production, white rot fungi are effective in delignifying this type of fibrous compounds and increasing access to structural carbohydrates to improve their digestion in the rumen (Shrivastava *et al.*, 2011; Nayan *et al.*, 2018).

White rot fungi are used in solid fermentations and some examples are *Phanerochaete chrysosporio*, *Pleurotus* sp., *Lentinus edodes*, *Coriolus Versi*, etc. (Shrivastava *et al.*, 2011). The *Pleurotus ostreatus* fungus degrades lignin, cellulose, and hemicellulose through extracellular enzyme complexes (Olivera-De la Cruz *et al.*, 2019) that release monosaccharides from the substrate cell wall (Luna *et al.*, 2013). The fungus shows flexibility in its environmental and

hemicelulosa por medio de complejos enzimáticos extracelulares (Olivera-De la Cruz *et al.*, 2019) que liberan monosacáridos a partir de la pared celular del sustrato (Luna *et al.*, 2013). El hongo muestra flexibilidad en sus requerimientos ambientales y de temperatura para desarrollo (Sánchez-Santillán *et al.*, 2015b). Entre los sustratos usados en la fermentación sólida están el rastrojo de maíz y la paja de cebada; así como, una variedad de subproductos agrícolas y pastos altamente lignificados (Tuyen *et al.*, 2012; Luna *et al.*, 2013; Sánchez-Santillán *et al.*, 2015b; Nayan *et al.*, 2018).

La hipótesis en este estudio fue que las cepas MR y P15 de *P. ostreatus* reducen el contenido de fibras detergentes y aumentan la disponibilidad de carbohidratos estructurales en la degradación *in vitro* de la materia seca y fibra detergente neutro del rastrojo de maíz y pasto mulato (*Brachiaria* híbrido). Por tanto, el objetivo fue determinar las características químicas de valor nutricional, producción de biogás y degradaciones *in vitro* de rastrojo de maíz y pasto mulato tratado con las cepas MR y P15 de *P. ostreatus* por 15 y 30 d de fermentación sólida.

MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar de estudio

El estudio se realizó en el Laboratorio de Nutrición Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia No. 2 de la Universidad Autónoma de Guerrero ubicada en el municipio de Cuajinicuilapa, Guerrero, México. Está situado a 16° 08' N y 98° 23' O, en altitud de 50 m, predomina un clima cálido subhúmedo con lluvias en verano, con precipitación media anual de 1200 mm y una temperatura promedio anual de 25 °C (INEGI, 2018).

Cepas de *Pleurotus ostreatus*

Las cepas fueron MR y P15 de *Pleurotus ostreatus*. Para la reactivación de las cepas se preparó un medio de cultivo con base en agar papa-dextrosa (BD Bioxon®). El medio se esterilizó por 15 min a 15 PSI y 121 °C en una autoclave (All American® 1941X, USA). El medio se vertió en cajas Petri hasta su solidificación y se conservaron a 4 °C hasta su uso. Las cajas Petri se inocularon con cada cepa, se sellaron con papel Parafilm (Bemis®) y se incubaron a temperatura ambiente (promedio 30 °C) por 4 d.

Después se preparó el inóculo, se hirvieron 500 g de sorgo entero en 1 L de agua destilada por 30 min y se filtró para eliminar el exceso de agua. A continuación, el sorgo se colocó en

temperature requirements for development (Sánchez-Santillán *et al.*, 2015b). Among the substrates used in solid fermentation are corn stubble and barley straw; as well as a variety of highly lignified agricultural by-products and grasses (Tuyen *et al.*, 2012; Luna *et al.*, 2013; Sánchez-Santillán *et al.*, 2015b; Nayan *et al.*, 2018).

The hypothesis of this study is that the MR and P15 strains of *P. ostreatus* reduce the content of detergent fibers and increase the availability of structural carbohydrates, at the *in vitro* degradation of dry matter and neutral detergent fiber of corn stubble and mulatto grass (hybrid *Brachiaria*). Therefore, the objective was to determine the chemical characteristics of nutritional value, biogas production and *in vitro* degradation of corn stubble and mulatto grass treated with the MR and P15 strains of *P. ostreatus* for 15 and 30 d of solid fermentation.

MATERIALS AND METHODS

Study site

The study was carried out in the animal nutrition laboratory of the Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia No. 2 of the Universidad Autónoma de Guerrero, located in the municipality of Cuajinicuilapa, Guerrero, Mexico. It is located at 16° 08' N and 98° 23' W, at 50 m altitude, with a warm subhumid climate with rains in summer, an average annual rainfall of 1200 mm, and average annual temperature of 25 °C (INEGI, 2018).

Pleurotus ostreatus strains

The strains were MR and P15 of *Pleurotus ostreatus*. For the reactivation of the strains, we prepared a culture medium based on potato-dextrose agar (BD Bioxon®). The medium was sterilized for 15 min at 15 PSI and 121 °C in an autoclave (All American® 1941X, USA). The medium was poured into Petri dishes until solidification, and they were stored at 4 °C until use. The Petri dishes were inoculated with each strain, sealed with Parafilm paper (Bemis®) and incubated at room temperature (average 30 °C) for 4 d.

Then the inoculum was prepared, 500 g of whole sorghum were boiled in 1 L of distilled water for 30 min, and filtered to remove water excess. The sorghum was then placed in an Erlenmeyer flask, the flask was capped, a cotton and brown paper plug was placed and sterilized. In a biosafety hood (Labconco®, USA), the flask was cooled to room temperature and inoculated with 10 mycelium agar cylinders (1 cm diameter), and incubated at room temperature for 10 d.

un matraz Erlenmeyer, el matraz se tapó, se colocó un tapón de algodón y papel de estraza y se esterilizó. En una campana de bioseguridad (Labconco®, USA), el matraz se enfrió a temperatura ambiente y se inoculó con 10 cilindros de agar con micelio (1 cm diámetro) y se incubaron a temperatura ambiente por 10 d.

Sustratos

Los sustratos fueron pasto mulato (*Brachiaria* híbrido) con una edad de rebrote de 150 d y rastrojo de maíz. Los sustratos se deshidrataron en una estufa (Felisa® FE-293a, México) a 60 °C por 72 h y se molieron en molino convencional con malla de 0.5 cm de diámetro. En matraces Erlenmeyer se colocaron 50 g de cada sustrato con 80% de humedad, se colocó un tapón de algodón y papel de estraza y se esterilizó.

Fermento sólido

En una campana de bioseguridad (Labconco®, USA), los matraces con el sustrato estéril se inocularon con 5% P/P de inóculo de MR o P15 de *P. ostreatus*. Después se colocó un tapón de algodón y se incubaron a temperatura ambiente (30 °C promedio) por 15 y 30 d. Al término del periodo de fermentación sólida, el fermento se deshidrató a 60 °C hasta peso constante en una estufa (Felisa® FE-293A, México). Luego, el fermento se molió con una criba de 1 mm en un molino Thomas-Wiley Mill (Thomas Scientific®, Swedesboro, NJ, USA) según el método 950.02 de la AOAC (2005).

Análisis químico para determinar valor nutricional

En los sustratos rastrojo de maíz y pasto mulato (Cuadro 1) y en los fermentos sólidos se determinó proteína cruda (PC; método 976.05), cenizas (Ce; método 942.05) y materia orgánica (MO) de acuerdo con AOAC (2005); además, fibra detergente neutro

Substrates

The substrates were mulatto grass (*Brachiaria* hybrid) with a regrowth age of 150 d, and corn stubble. The substrates were dehydrated in an oven (Felisa® FE-293a, Mexico) at 60 °C for 72 h and ground in a conventional mill with a mesh of 0.5 cm in diameter. In Erlenmeyer flasks, 50 g of each substrate were placed with 80% humidity, a cotton plug and brown paper, and sterilized.

Solid ferment

In a biosafety hood (Labconco®, USA), the flasks with the sterile substrate were inoculated with 5% P/P inoculum of MR or P15 of *P. ostreatus*. Then a cotton plug was placed and they were incubated at room temperature (30 °C average) for 15 and 30 d. At the end of the solid fermentation period, the ferment was dehydrated at 60 °C to constant weight in an oven (Felisa® FE-293A, Mexico). The ferment was then ground through a 1 mm sieve in a Thomas-Wiley Mill (Thomas Scientific®, Swedesboro, NJ, USA), according to method 950.02 of the AOAC (2005).

Chemical analysis to determine nutritional value

Crude protein (CP; method 976.05), ash (method 942.05) and organic matter (MO) were determined in the maize stubble and mulatto grass substrates, and their solid ferments (Table 1), according to AOAC (2005). Also, neutral detergent fiber (FDN) and acid detergent fiber (FDA) by using the method ANKOM Technology, according to Van Soest *et al.* (1991).

Culture medium

The culture medium contained: 30 mL of clarified ruminal fluid (fresh bovine ruminal fluid centrifuged for 10 min

Cuadro 1. Características químicas de valor nutricional de los sustratos rastrojo de maíz y pasto mulato.

Table 1. Chemical characteristics of nutritional value of maize stubble and mulatto grass substrate.

Sustrato	MS (%)	FDN (%)	FDA (%)	Hemi (%)	PC (%)	Ce (%)	MO (%)
Rastrojo de maíz	94.15	80.94	48.39	32.55	3.03	11.80	88.20
Pasto mulato	91.89	83.53	49.73	33.80	1.74	5.24	94.76

MS: materia seca; FDN: fibra detergente neutro; FDA: fibra detergente ácido; Hemi: hemicelulosa; PC: proteína cruda; Ce: cenizas; MO: materia orgánica. ♦ MS: dry matter; FDN: neutral detergent fiber; FDA: acid detergent fiber; Hemi: hemicellulose; PC: crude protein; Ce: ash; MO: organic matter.

(FDN) y fibra detergente ácido (FDA) con la metodología de ANKOM Technology acorde con Van Soest *et al.* (1991).

Medio de cultivo

El medio de cultivo contenía: 30 mL de fluido ruminal clarificado (líquido ruminal bovino fresco centrifugado 10 min a 12 857 x g y esterilizado), 5 mL de solución mineral I [6 g K₂HPO₄ (J. T. Baker®) en 1000 mL de agua destilada], 5 mL de solución mineral II [6 g KH₂PO₄ (J. T. Baker®) + 6 g (NH₄)₂SO₄ (J. T. Baker®) + 12 g NaCl (Meyer®) + 2.45 g MgSO₄ (Meyer®) + 1.6 g CaCl-2H₂O (Meyer®) en 1000 mL de agua destilada], 0.1 mL de resazurina a 0.1% (Sigma-Aldrich®), 0.2 g de peptona de soya (MCD Lab®), 0.1 g de extracto de levadura (BD Bioxon®), 4 mL de solución cisteína-sulfido [2.5 g L-cisteína (Sigma-Aldrich®) a pH 10 con 2N NaOH (Meyer®) + 2.5 g de Na₂S-9H₂O (Meyer®) aforado en 100 mL de agua destilada], 5 mL de solución a 8% de Na₂CO₃ (J. T. Baker®) y 50.6 mL de agua destilada. El medio de cultivo se esterilizó según lo descrito por Sánchez-Santillán *et al.* (2016) y Torres-Salado *et al.* (2019).

Solución salina saturada y NaOH (2N)

En 1 L de agua destilada se disolvieron 80 g de NaOH (Meyer®). La solución se vertió en viales serológicos (60 mL) hasta llenarlos por completo para obtener los viales trampa de NaOH (2N). En 1 L de agua destilada se disolvieron 370 g de NaCl y se agregaron 5 mL anaranjado de metilo (Merk®) al 0.1%; el pH se ajustó a 2. La solución se vertió en viales serológicos (120 mL) hasta llenarlos por completo para obtener los viales trampa de solución salina saturada; ambos se sellaron herméticamente con un tapón de neopreno (20 mm Ø) y con un arillo de aluminio.

Biodigestores

Los biodigestores fueron viales serológicos de vidrio (120 mL) con 0.5 g de fermento sólido y 45 mL de medio de cultivo. Estos viales se mantuvieron en condiciones anaeróbicas con CO₂, se sellaron herméticamente con un tapón de neopreno (20 mm Ø) y con un arillo de aluminio. Los biodigestores se esterilizaron y se incubaron a 39 °C por 24 h para verificar esterilidad (Herrera-Pérez *et al.*, 2018). Luego se inocularon con 5 mL de fluido ruminal con bacterias ruminales totales obtenidas de una vaca Suiz-bu. La vaca apacentó en praderas de pasto pangola con una edad de rebrote de 60 d antes de tomar la muestra de fluido ruminal. Los biodigestores con fluido ruminal se centrifugaron a 1570 x g por 3 min para precipitar protozoarios y partículas de fibra y se incubaron a 39 °C por 72 h (Texta *et al.*, 2019).

at 12 857 x g, and sterilized), 5 mL of mineral solution I [6 g K₂HPO₄ (JT Baker®) in 1000 mL of distilled water], 5 mL of mineral solution II [6 g KH₂PO₄ (JT Baker®) + 6 g (NH₄)₂SO₄ (JT Baker®) + 12 g NaCl (Meyer®) + 2.45 g MgSO₄ (Meyer®) + 1.6 g CaCl-2H₂O (Meyer®) in 1000 mL of distilled water], 0.1 mL of resazurin at 0.1% (Sigma-Aldrich®), 0.2 g of soy peptone (MCD Lab®), 0.1 g of yeast extract (BD Bioxon®), 4 mL of cysteine-sulfide solution [2.5 g L-cysteine (Sigma-Aldrich®) at pH 10 with 2N NaOH (Meyer®) + 2.5 g of Na₂S-9H₂O (Meyer®) in 100 mL of distilled water], 5 mL of 8% Na₂CO₃ solution (JT Baker®) and 50.6 mL of distilled water. The culture medium was sterilized as described by Sánchez-Santillán *et al.* (2016) and Torres-Salado *et al.* (2019).

Saline solution saturated and NaOH (2N)

In 1 L of distilled water 80 g of NaOH (Meyer®) were dissolved. The solution was poured into serological vials (60 mL) until they were completely filled to obtain the NaOH (2N) trap vials. Then, 370 g of NaCl were dissolved in 1 L of distilled water, and 5 mL methyl orange (Merk®) at 0.1% were added; the pH was adjusted to 2. The solution was poured into serological vials (120 mL) until they were completely filled to obtain the trap vials of saturated saline solution; both were hermetically sealed with a neoprene plug (20 mm Ø) and an aluminum ring.

Biodigesters

Biodigesters were glass serological vials (120 mL) with 0.5 g of solid ferment and 45 mL of culture medium. These vials were kept in anaerobic conditions with CO₂, hermetically sealed with a neoprene stopper (20 mm Ø), and an aluminum ring. Biodigesters were sterilized and incubated at 39 °C for 24 h to verify sterility (Herrera-Pérez *et al.*, 2018). Then, they were inoculated with 5 mL of ruminal fluid with total ruminal bacteria obtained from a Swiss-bu cow. The cow grazed on pangola grass meadows with a regrowth age of 60 d before taking the ruminal fluid sample. Biodigesters with ruminal fluid were centrifuged 1570 x g for 3 min to precipitate protozoa and fiber particles, and were incubated at 39 °C for 72 h (Texta *et al.*, 2019).

Biogas and methane production

A Taygon® hose (2.38 mm internal Ø and 45 cm long) with hypodermic needles (20 G x 32mm) on its ends was used to couple the biodigester with a trap vial of saturated saline solution. The trap vial was placed inverted in a modified cylinder

Producción de biogás y metano

Una manguera Taygon® (2.38 mm Ø interno y 45 cm de longitud) con agujas hipodérmicas (20 G x 32mm) en los extremos se usó para acoplar el biodigestor con un vial trampa de solución salina saturada. El vial trampa se colocó de manera inversa en una probeta modificada que sirve para recolectar la solución salina desplazada por los gases producidos durante la incubación por medio de una aguja hipodérmica colocada como válvula de salida. La producción de biogás se midió a las 24, 48 y 72 h. La producción de CH₄ se midió a las 24, 48 y 72 h con el mismo procedimiento que biogás, pero se usó el vial trampa de solución NaOH (2N; Torres-Salado *et al.*, 2019). La producción de CH₄ se tomó como los mL desplazados de la solución NaOH (2N), ya que el CO₂ reacciona con el NaOH formando Na₂CO₃ (Prada-Matiz y Cortés-Castillo, 2011).

Degradación de la materia seca y de la fibra detergente neutro

La muestra residual del biodigestor se filtró en bolsas ANKOM F57 (ANKOM® Technology) a peso constante. Las bolsas con muestra se secaron 24 h a 60 °C en una estufa (Felisa® FE-293A, México). La degradación de la materia seca (DMS) se calculó con la fórmula % DMS = (muestra inicial - muestra residual / muestra inicial) * 100 (Sánchez-Santillán *et al.*, 2019; Hernández-Morales *et al.*, 2018). Las bolsas ANKOM® se sellaron con calor y se determinó el contenido de FDN con la metodología de ANKOM® Technology según Van Soest *et al.* (1991). El porcentaje de degradación de la FDN (% DFDN) se calculó con la fórmula % DFDN = (FDN inicial - FDN residual / FDN inicial) * 100 según Hernández-Morales *et al.* (2018).

Diseño experimental y análisis estadístico

El diseño experimental fue completamente al azar con arreglo factorial 2³, los factores fueron tipo de sustrato (rastrajo de maíz y pasto mulato), cepa de *Pleurotus ostreatus* (MR y P15) y tiempo de fermentación sólida (15 y 30 d) con cinco repeticiones por interacción. Los datos se analizaron con el procedimiento GLM de SAS® (SAS Institute Inc., 2011) y los valores promedio significativos del análisis factorial se compararon con la prueba de Tukey (p≤0.05).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El fermento sólido con rastrajo de maíz presentó 24.4% mayor PC que el fermento de pasto mulato; en contraste, el fermento con pasto mulato mostró

that serves to collect the saline solution displaced by the gases produced during incubation by means of a hypodermic needle placed as an outlet valve. Biogas production was measured at 24, 48 and 72 h. CH₄ production was measured at 24, 48 and 72 h with the same procedure as biogas, but using the NaOH solution trap vial (2N; Torres-Salado *et al.*, 2019). The production of CH₄ was recorded as the displaced mL of the NaOH (2N) solution, since CO₂ reacts with NaOH to form Na₂CO₃ (Prada-Matiz and Cortés-Castillo, 2011).

Dry matter and neutral detergent fiber degradation

The residual sample from the biodigester was filtered into ANKOM F57 (ANKOM® Technology) bags at constant weight. The sample bags were dried 24 h at 60 °C in an oven (Felisa® FE-293A, Mexico). Dry matter degradation (DMS) was calculated with the formula % DMS = (initial sample - residual sample / initial sample) * 100 (Sánchez-Santillán *et al.*, 2019; Hernández-Morales *et al.*, 2018). The ANKOM® bags were heat sealed and the FDN content was determined with the ANKOM® Technology methodology, according to Van Soest *et al.* (1991). The percentage of FDN degradation (% DFDN) was calculated with the formula % DFDN = (initial FDN - residual FDN / initial FDN) * 100, according to Hernández-Morales *et al.* (2018).

Experimental design and statistical analysis

The experimental design was completely randomized with a 2³ factorial arrangement, the factors were type of substrate (corn stubble and mulatto grass), *Pleurotus ostreatus* strain (MR and P15) and solid fermentation time (15 and 30 d) with five repetitions by interaction.

The data were analyzed with the GLM procedure of SAS® (SAS Institute Inc., 2011), and the significant mean values of the factor analysis were compared using the Tukey test (p≤0.05).

RESULTS AND DISCUSSION

The solid ferment with corn stubble presented 24.4% higher PC than the mulatto grass ferment. In contrast, the ferment with mulatto grass showed 8.08% higher hemicellulose than the corn stubble (p≤0.05). The solid ferment inoculated with the MR or P15 strains had no differences in the content of PC or hemicellulose (p>0.05). Regarding the solid fermentation time, the 30-d ferment showed 175.25% higher content of PC and 123% lower content of hemicellulose than the ferment at 15 d

8.08% mayor hemicelulosa que el rastrojo de maíz ($p \leq 0.05$). El fermento sólido inoculado con las cepas MR o P15 no tuvo diferencias en el contenido de PC, ni hemicelulosa ($p > 0.05$). Respecto al tiempo de fermentación sólida, el fermento con 30 d mostró contenido 175.25% mayor de PC y contenido 123% menor de hemicelulosa que el fermento a 15 d ($p \leq 0.05$; Cuadro 2). Esto indicó que el tipo de cepa de *P. ostreatus* no influye en el contenido de PC, ni hemicelulosa, mientras que conforme el tiempo es mayor, el fermento se enriquece de PC y disminuye su fracción de hemicelulosa.

Además, el tipo de sustrato usado influyó en el contenido de PC y hemicelulosa. La disminución de la fracción de hemicelulosa respecto al contenido de los sustratos antes del proceso de fermentación sólida (Cuadro 1) es resultado probable de que *P. ostreatus* es un hongo que degrada carbohidratos estructurales por medio de la acción de enzimas xilanasas que hidrolizan la hemicelulosa dentro de su proceso metabólico (Peláez-Acero *et al.*, 2011; Shrivastava *et al.*, 2011). Además, la hemicelulosa se usa antes que celulosa y lignina como fuente de energía en la etapa de crecimiento del hongo (Okano *et al.*, 2007).

($p \leq 0.05$; Table 2). This indicated that the type of strain of *P. ostreatus* does not influence the content of PC, or hemicellulose, while as the time is longer, the ferment becomes enriched with PC and its fraction of hemicellulose decreases.

Furthermore, the type of substrate used influenced the PC and hemicellulose content. The decrease of the hemicellulose fraction, respect to the content of the substrates before the solid fermentation process (Table 1), is a probable result of the fact that *P. ostreatus* is a fungus that degrades structural carbohydrates through the action of xylanase enzymes that hydrolyze hemicellulose within their metabolic process (Peláez-Acero *et al.*, 2011; Shrivastava *et al.*, 2011). In addition, hemicellulose is used before cellulose and lignin as an energy source in the growth stage of the fungus (Okano *et al.*, 2007).

Regarding the increases in the PC content of the solid ferments evaluated, two explanations can be proposed: the first, that the content increased respect to the mulatto grass or corn stubble before solid fermentation (Table 1) due to the growth of the mycelium of the *P. ostreatus* strains (Olivera-De la Cruz *et al.*, 2019), a fact that contributed microbial

Cuadro 2. Características químicas de valor nutricional y fermentativas *in vitro* de fermentos sólidos que no mostraron tipo de interacción (de primer o segundo orden) por sustrato, cepa de *Pleurotus ostreatus* o tiempo de fermentación sólida.

Table 2. *In vitro* fermentative and nutritional value chemical characteristics of solid ferments that showed no type (first or second order) of interaction by substrate, *Pleurotus ostreatus* strain or solid fermentation time.

Variable	Sustrato		Cepa		Tiempo (d)		EEM
	Pasto mulato	Rastrojo de maíz	MR	P15	15	30	
Hemi	17.64 a	16.32 b	16.61	17.35	23.46 a	10.50 b	1.39
PC	5.00 b	6.22 a	5.42	5.8	2.99 b	8.23 a	0.57
Ce	9.01 b	11.93 a	10.59	10.35	10.91 a	10.03 b	0.37
Biogás	190.28 a	187.98 a	190.68 a	187.58 a	168.49 b	209.77 a	4.50
Metano 24	42.19 a	40.51 a	41.34 a	41.36 a	35.45 b	47.25 a	1.39
Metano 48	9.86 a	8.21 a	8.42 a	9.65 a	7.94 b	10.12 a	0.56
Metano 72	4.55 a	5.27 a	4.99 a	4.83 a	4.93 a	4.89 a	0.23
Metano	56.59 a	53.99 a	54.75 a	55.83 a	48.32 b	62.26 a	1.70
DMS	72.21 b	74.00 a	72.82 a	73.39 a	69.27 b	76.93 a	0.85
DFDN	65.65 b	69.38 a	67.15 a	67.89 a	62.76 b	72.28 a	1.11

a,b: valores medios por fila con letra distinta son diferentes ($p \leq 0.05$). Hemi: hemicelulosa; PC: proteína cruda; Ce: cenizas; Biogás: mL g^{-1} MS de las 0 a 72 h; Metano 24: mL g^{-1} MS de las 0 a 24 h; Metano 48: mL g^{-1} MS de las 24 a 48 h; Metano 72: mL g^{-1} MS de las 48 a 72 h; Metano: mL g^{-1} MS de las 0 a 72 h; DMS: degradación de la materia seca; DFDN: degradación de la fibra detergente neutro; EEM: error estándar de la media. ♦ a,b: mean values per row with different letter are different ($p \leq 0.05$). Hemi: hemicellulose; PC: crude protein; Ce: ash; Biogas: mL g^{-1} MS from 0 to 72 h; Methane 24: mL g^{-1} MS from 0 to 24 h; Methane 48: mL g^{-1} MS from 24 to 48 h; Methane 72: mL g^{-1} MS from 48 to 72 h; Methane: mL g^{-1} MS from 0 to 72 h; DMS: degradation of dry matter; DFDN: degradation of neutral detergent fiber; EEM: standard error of the mean.

Respecto a los aumentos en el contenido de PC de los fermentos sólidos evaluados, pueden proponerse dos explicaciones: la primera, que el contenido incrementó respecto al pasto mulato o rastrojo de maíz antes de la fermentación sólida (Cuadro 1) por el crecimiento del micelio de las cepas de *P. ostreatus* (Olivera-De la Cruz *et al.*, 2019), hecho que aportó proteína microbiana (Luna *et al.*, 2013) a los 15 y 30 d de fermentación sólida. La segunda explicación es que una parte de los carbohidratos se degradó a CO₂ y H₂O como parte del metabolismo de las cepas de *P. ostreatus*, lo cual causó pérdida de estos componentes, pero no del contenido de N₂ en la MO de los sustratos (Tuyen *et al.*, 2013). El aumento de la PC en los fermentos sólidos es una ventaja de los subproductos agrícolas o materiales altamente lignocelulósicos con contenido bajo de PC (Tuyen *et al.*, 2012).

Luna *et al.* (2013) registraron 4% de PC en fermentos de paja de cebada por 30 d con *P. ostreatus*, valor inferior a los fermentos de 30 d de nuestro estudio. Okano *et al.* (2006) encontraron 19% de hemicelulosa en fermentos de bagazo de caña de azúcar inoculado con *P. eryngii* por 35 d, lo cual es inferior al contenido de hemicelulosa de los fermentos con 30 d de nuestro estudio. Además, Okano *et al.* (2007) y Tuyen *et al.* (2012) observaron valores superiores en hemicelulosa e inferiores en PC, respecto a los fermentos de 30 d de nuestro estudio en paja de trigo tratada con *P. ostreatus* por 30 d (Okano *et al.*, 2007) y 49 d (Tuyen *et al.*, 2012).

El fermento sólido del sustrato rastrojo de maíz inoculado con la cepa P15 o MR de *P. ostreatus* mostró contenido mayor ($p \leq 0.05$) de MS y Ce, sin diferencias entre la inoculación por tipo de cepa ($p > 0.05$; Cuadro 3). Cabe destacar, el fermento de pasto mulato inoculado con la cepa P15 mostró el contenido menor de Ce ($p \leq 0.05$). Lo anterior indicó que cualquiera de las cepas de *P. ostreatus* no modificó el contenido de MS en los sustratos usados en nuestra investigación, y el tipo de sustrato es responsable del contenido de la MS del fermento sólido. Además, el fermento de 15 d tenía Ce 8.78% mayor que el fermento a los 30 d ($p \leq 0.05$; Cuadro 4).

El fermento de 30 d mostró contenido mayor de MS en cada sustrato evaluado en nuestro estudio ($p \leq 0.05$), pero el fermento de 30 d con rastrojo de maíz tenía MS 16.46% mayor que el fermento de 30 d con pasto mulato ($p \leq 0.05$; Cuadro 4). Esto muestra que los fermentos de 30 d tienen más

proteína (Luna *et al.*, 2013) at 15 and 30 d of solid fermentation. The second explanation is that a part of the carbohydrates was degraded to CO₂ and H₂O as part of the metabolism of *P. ostreatus* strains, which caused a loss of these components, but not of the N₂ content in the MO of the substrates (Tuyen *et al.*, 2013). The PC increase in solid ferments is an advantage of agricultural by-products or highly lignocellulosic materials with low PC content (Tuyen *et al.*, 2012).

Luna *et al.* (2013) recorded 4% PC in barley straw ferments for 30 d with *P. ostreatus*, a lower value than the 30 d ferments in our study. Okano *et al.* (2006) found 19% hemicellulose in sugarcane bagasse ferments inoculated with *P. eryngii* for 35 d, which is lower than the hemicellulose content of the 30 d ferments of our study. Also, Okano *et al.* (2007) and Tuyen *et al.* (2012) observed higher values in hemicellulose and lower in PC than those 30 d ferments of our study in wheat straw treated with *P. ostreatus* for 30 d (Okano *et al.*, 2007) and 49 d (Tuyen *et al.*, 2012).

The solid ferment of the maize stubble substrate inoculated with *P. ostreatus* strain P15 or MR showed a higher content ($p \leq 0.05$) of MS and Ce (ash), without differences between inoculation by type of strain ($p > 0.05$; Table 3). It should be noted that the mulatto grass ferment inoculated with the P15 strain showed the lowest ash content ($p \leq 0.05$). The aforementioned indicated that any of the *P. ostreatus* strains did not modify the MS content in the substrates used in our research, and the type of substrate is responsible for the MS content of the solid ferment. Furthermore, the ferment of 15 d had 8.78% higher ash than the 30-d ferment ($p \leq 0.05$; Table 4).

The 30-day ferment showed a higher MS content in each substrate evaluated in our study ($p \leq 0.05$), but the 30-day ferment with corn stubble had 16.46% MS higher than the 30-day ferment with mulatto grass ($p \leq 0.05$; Table 4). This shows that the 30-d ferments have more MS content, of which more than half is cellulose and lignin in the evaluated substrates. The MS content of the solid ferments increased due to the loss of moisture during solid fermentation, and the ash content was similar to the initial content of the substrates used in the study (Table 1). Tuyen *et al.* (2013) reported that MS and MO contents decreased in solid maize stubble

Cuadro 3. Materia seca, fibra detergente ácido, cenizas y biogás[†] en fermentos sólidos de rastrojo de maíz y pasto mulato inoculados con la cepa MR o P15 de *Pleurotus ostreatus*.
Table 3. Dry matter, acid detergent fiber, ash and biogas[†] in solid ferments of corn stubble and mulatto grass inoculated with the MR or P15 strain of *Pleurotus ostreatus*.

Variable	Pasto mulato		Rastrojo de maíz		EEM
	MR	P15	MR	P15	
MS	24.45 bc	22.67 c	26.17 ab	27.24 a	0.81
FDA	52.37 ab	52.20 ab	54.39 a	49.88 b	1.08
Ce	9.64 b	8.38 c	11.54 a	12.33 a	0.37
Biogás 24	140.43 a	124.07 bc	120.78 c	130.54 b	3.64
Biogás 48	42.37 b	45.74 ab	52.05 a	47.33 ab	1.44
Biogás	195.23 a	185.33 b	186.14 b	189.82 ab	4.50

[†]Las variables presentaron interacción sustrato cepa ($p \leq 0.05$). a,b,c: valores medios por fila con letra distinta son diferentes ($p \leq 0.05$). MS: materia seca; FDA: fibra detergente ácido; Ce: cenizas; Biogás 24: mL g⁻¹ MS de las 0 a 24 h; Biogás 48: mL g⁻¹ MS de las 24 a 48 h; Biogás: mL g⁻¹ MS de las 0 a 72 h; EEM: error estándar de la media. ♦ [†]Variables presented strain substrate interaction ($p \leq 0.05$). a,b,c: mean values per row with different letter are different ($p \leq 0.05$). MS: dry matter; FDA: acid detergent fiber; Ce: ash; Biogas 24: mL g⁻¹ MS from 0 to 24 h; Biogas 48: mL g⁻¹ MS from 24 to 48 h; Biogas: mL g⁻¹ MS from 0 to 72 h; EEM: standard error of the mean.

Cuadro 4. Materia seca, biogás y metano *in vitro*[†] de los fermentos obtenidos de rastrojo de maíz y pasto mulato en 15 y 30 días de fermentación sólida.
Table 4. Dry matter, biogas and *in vitro* methane[†] of the ferments obtained from corn stubble and mulatto grass at 15-d and 30-d of solid fermentation.

Variable	Pasto mulato		Rastrojo de maíz		EEM
	15 d	30 d	15 d	30 d	
MS	20.93 c	26.19 b	22.91 c	30.50 a	0.81
FDA	46.92 b	57.65 a	48.49 b	55.78 a	1.08
Biogás 48	44.54 b	43.57 b	46.05 b	53.33 a	1.44
Metano 24	37.86 b	46.52 a	33.04 b	47.98 a	1.39
Metano 48	7.71 b	12.01 a	8.18 b	8.24 ab	0.56

[†]Las variables presentaron interacción sustrato tiempo ($p \leq 0.05$). a,b,c: valores medios por fila con letra distinta son diferentes ($p \leq 0.05$). MS: materia seca; FDA: fibra detergente ácido; Biogás 48: mL g⁻¹ MS de las 24 a 48 h; Metano 24: mL g⁻¹ MS de las 0 a 24 h; Metano 48: mL g⁻¹ MS de las 24 a 48 h; EEM: error estándar de la media. ♦ [†]The variables showed substrate time interaction ($p \leq 0.05$). a,b,c: mean values per row with different letter are different ($p \leq 0.05$). MS: dry matter; FDA: acid detergent fiber; Biogas 48: mL g⁻¹ MS from 24 to 48 h; Methane 24: mL g⁻¹ MS from 0 to 24 h; Methane 48: mL g⁻¹ MS from 24 to 48 h; EEM: standard error of the mean.

contenido de MS, de la cual más de la mitad es celulosa y lignina en los sustratos evaluados. El contenido de MS de los fermentos sólidos aumentó por la pérdida de humedad durante la fermentación sólida y el contenido de Ce fue similar al contenido inicial de los sustratos usados en el estudio (Cuadro 1). Tuyen *et al.* (2013) documentaron que el contenido de MS y MO disminuyó en fermentos sólidos de rastrojo de maíz inoculados con *P. ostreatus*. Además, Tuyen *et*

ferments inoculated with *P. ostreatus*. Also, Tuyen *et al.* (2012) found 10.05% of ash in solid ferment of wheat straw treated with *P. ostreatus* for 49 d, values similar to those of our study. Okano *et al.* (2007) recorded values (3.9% of ash) lower than those of our experiment in sugarcane bagasse treated with *P. eryngii* for 35 d.

The solid ferment of corn stubble with the P15 strain reduced the FDA content by 9.04% ($p \leq 0.05$)

al. (2012) encontraron 10.05% de Ce en fermento sólido de paja de trigo tratada con *P. ostreatus* por 49 d, valores similares a los nuestros. Okano *et al.* (2007) registraron valores (3.9% de Ce) inferiores a nuestro experimento, en bagazo de caña de azúcar tratado con *P. eryngii* por 35 d.

El fermento sólido de rastrojo de maíz con la cepa P15 redujo 9.04% el contenido de FDA ($p \leq 0.05$) respecto al fermento del mismo sustrato con la cepa MR (Cuadro 3), sin diferencias con las otras interacciones ($p > 0.05$). El fermento sólido de 30 d tuvo más FDA en cada sustrato evaluado en nuestro experimento ($p \leq 0.05$). Sin embargo, el fermento de 30 d con rastrojo de maíz tenía 3.35% menos FDA que el fermento de 30 d con pasto mulato ($p \leq 0.05$). Además, los fermentos de 15 d no mostraron diferencias por el tipo de sustrato usado ($p > 0.05$; Cuadro 4).

Los fermentos sólidos inoculados con la cepa MR de *P. ostreatus* aumentaron 23.02% el contenido de FDA de los 15 a los 30 d de fermentación sólida, mientras que la cepa P15 incrementó 14.77% el contenido de FDA en el mismo periodo de fermentación ($p \leq 0.05$). El fermento con la cepa MR mostró 7.96% más FDA que la cepa P15 a los 30 d de incubación ($p \leq 0.05$). Esto mostró que la cepa P15 de *P. ostreatus* tiene capacidad mayor de degradación de celulosa que la cepa MR entre los 15 y 30 d de fermentación sólida (Cuadro 5). La fracción FDA

comparado to the ferment of the same substrate with the MR strain (Table 3), without differences in the other interactions ($p > 0.05$). The 30-d solid ferment had more FDA in each substrate evaluated in our experiment ($p \leq 0.05$). However, the 30-d ferment with corn stubble had 3.35% less FDA than the 30-d ferment with mulatto grass ($p \leq 0.05$). In addition, the 15-d ferments showed no differences due to the type of substrate used ($p > 0.05$; Table 4).

The solid ferments inoculated with *P. ostreatus* MR strain increased FDA content by 23.02% from 15 to 30 d of solid fermentation. While the P15 strain increased by 14.77% the FDA content in the same fermentation period ($p \leq 0.05$). The ferment with the MR strain produced 7.96% more FDA than the P15 strain at 30 d of incubation ($p \leq 0.05$). This showed that the P15 strain of *P. ostreatus* has a greater capacity for cellulose degradation than the MR strain between 15 and 30 d of solid fermentation (Table 5). The FDA fraction increased in the ferments evaluated in our study compared to the initial content of mulatto grass and corn stubble (Table 1).

The FDA is composed of cellulose and lignin, so *P. ostreatus* showed little metabolic activity for the use of cellulose, and this carbohydrate remained intact for its hydrolysis into fermentable sugars (Méndez-Hernández *et al.*, 2019; Olivera-De la Cruz *et al.*, 2019). In addition, the content of lignocellulosic

Cuadro 5. Fibra detergente ácido, biogás, degradación de materia seca y degradación de fibra detergente neutro[†] de fermentos inoculados con la cepa MR o P15 de *Pleurotus ostreatus* en 15 y 30 días de fermentación sólida.

Table 5. Acid detergent fiber, biogas, degradation of dry matter and degradation of neutral detergent fiber[†] of ferments inoculated with *Pleurotus ostreatus* strain MR or P15 at 15 and 30 days of solid fermentation.

Variable	MR		P15		EEM
	15 d	30 d	15 d	30 d	
FDA	47.87 c	58.89 a	47.53 c	54.55b	1.08
Biogás 24	118.23 b	142.98 a	109.52 c	145.1a	3.64
Biogás 48	41.68 c	52.74 a	48.92ab	44.16bc	1.44
DMS	68.25 c	77.38 a	70.30b	76.49a	0.85
DFDN	61.33 c	72.97 a	64.20b	71.58a	1.11

[†]Las variables presentaron interacción cepa tiempo ($p \leq 0.05$). a,b,c: valores medios por fila con letra distinta son diferentes ($p \leq 0.05$). FDA: fibra detergente ácido; Biogás 24: mL g⁻¹ MS de 0 a 24 h; Biogás 48: mL g⁻¹ MS de 24 a 48 h; DMS: degradación de la materia seca; DFDN: degradación de la fibra detergente neutro; EEM: error estándar de la media. ♦ [†]The variables presented strain time interaction ($p \leq 0.05$). a,b,c: mean values per row with different letter are different ($p \leq 0.05$). FDA: acid detergent fiber; Biogas 24: mL g⁻¹ MS from 0 to 24 h; Biogas 48: mL g⁻¹ MS from 24 to 48 h; DMS: degradation of dry matter; DFDN: degradation of neutral detergent fiber; EEM: standard error of the mean.

aumentó en los fermentos evaluados en el nuestro estudio comparados con el contenido inicial del pasto mulato y rastrojo de maíz (Cuadro 1).

La FDA está compuesta por celulosa y lignina, por lo que *P. ostreatus* pudo mostrar poca actividad metabólica para el uso de celulosa, y este carbohidrato quedó intacto para su hidrólisis en azúcares fermentables (Méndez-Hernández *et al.*, 2019; Olivera-De la Cruz *et al.*, 2019). Además, el contenido de enlaces lignocelulósicos de los sustratos y el tiempo de exposición a las cepas MR y P15 de *P. ostreatus* se reflejaron en el contenido de FDA. La degradación de la pared celular inicia en la pared secundaria y lámina media por acción de las enzimas lacasas (Olivera-De la Cruz *et al.*, 2019), así como un aumento en la síntesis de ácidos orgánicos y consumo de carbohidratos solubles por el hongo durante la fermentación sólida (Peláez-Acero *et al.*, 2011).

El contenido menor de FDN se presentó en los fermentos de rastrojo de maíz inoculados con la cepa P15 y 30 d de fermentación ($p \leq 0.05$). En contraste, todos los fermentos de 15 d mostraron contenidos mayores de FDN ($p > 0.05$). Cabe destacar que la cepa P15 en ambos sustratos y la cepa MR en pasto mulato redujeron el contenido de FDN de los 15 a los 30 d de fermentación sólida, lo cual indica que el hongo consumió pared celular para su crecimiento (Cuadro 6). Los fermentos tuvieron menor FDN en comparación a los sustratos iniciales (Cuadro 1) por acción de las cepas de *P. ostreatus* porque usaron la hemicelulosa como fuente de energía para su crecimiento, antes de degradar la lignina (Olivera-De la Cruz *et al.*, 2019).

La variación en el contenido de FDN y FDA de los fermentos evaluados en nuestro estudio se pueden suponer producto de la composición de la pared celular del pasto mulato y rastrojo de maíz. Así como a la estructura química de la lignina y del complejo lignina-carbohidrato de los sustratos. Además, los niveles de degradación de las fibras detergentes son consecuencia de los complejos enzimáticos activos en los diferentes tiempos de incubación (Okano *et al.*, 2007). Según Luna *et al.* (2013), una fracción de estos componentes forma un complejo lignina-carbohidrato que resiste la hidrólisis enzimática.

Tuyen *et al.* (2013) encontraron valores inferiores en FDN (64.68%) y FDA (48.52 %) a los nuestros, en rastrojo de maíz tratado con *P. ostreatus* por 42 d. Con el mismo hongo *P. ostreatus* y 16 d de fermentación

bonds of the substrates and the exposure time to the MR and P15 strains of *P. ostreatus* were expressed in the FDA content. Degradation of the cell wall begins in the secondary wall and middle lamina due to the action of laccase enzymes (Olivera-De la Cruz *et al.*, 2019); and there is an increase in the synthesis of organic acids and consumption of soluble carbohydrates by the fungus during solid fermentation (Peláez-Acero *et al.*, 2011).

The lower content of FDN was recorded in the corn stubble ferments inoculated with the P15 strain and 30 d of fermentation ($p \leq 0.05$). In contrast, all the 15-d ferments showed the highest FDN content ($p > 0.05$). It is worth mentioning that the P15 strain in both substrates and the MR strain in mulatto grass reduced the FDN content from 15 to 30 d of solid fermentation, which indicates that the fungus consumed cell wall for its growth (Table 6).

The ferments had lower FDN compared to the initial substrates (Table 1) due to the action of the *P. ostreatus* strains because they used hemicellulose as an energy source for their growth, before degrading the lignin (Olivera-De la Cruz *et al.*, 2019).

The variation in the contents of FDN and FDA of the ferments evaluated in our study can be assumed as a product of the composition of the cell wall of mulatto grass and corn stubble. As well as the chemical structure of lignin and the lignin-carbohydrate complex of the substrates. Also, the levels of degradation of the detergent fibers are a consequence of the active enzyme complexes at the different incubation times (Okano *et al.*, 2007). According to Luna *et al.* (2013), a fraction of these components forms a lignin-carbohydrate complex that resists enzymatic hydrolysis.

Tuyen *et al.* (2013) found lower values in FDN (64.68%) and FDA (48.52%) than ours in corn stubble treated with *P. ostreatus* for 42 d. With the same *P. ostreatus* fungus and 16 d of solid fermentation, Soto-Sánchez *et al.* (2015) documented higher values in FDN (81.59%) and similar values of FDA (47.43%) in barley straw ferments, compared to our study in 15 d. Okano *et al.* (2007) published lower values of FDN (31.83%) and FDA (48.76%) in wheat straw ferments with *P. ostreatus* for 30 d compared to the *P. ostreatus* ferments for 30 d in any substrate of our experiment.

The former values are attributed to the enzymatic specificity of the substrate, moisture content of the

sólida, Soto-Sánchez *et al.* (2015) documentaron valores superiores en FDN (81.59%) y similares de FDA (47.43%) en fermentos de paja de cebada, comparados con nuestro estudio a los 15 d. Okano *et al.* (2007) publicaron valores inferiores de FDN (31.83%) y FDA (48.76%) en fermentos de paja de trigo con *P. ostreatus* por 30 d comparados con los fermentos de *P. ostreatus* por 30 d en cualquier sustrato de nuestro experimento.

Los valores anteriores se atribuyen a la especificidad enzimática por el sustrato, contenido de humedad de los sustratos al inicio de la fermentación sólida (Peláez-Acero *et al.*, 2011), especie de hongo usada (Tuyen *et al.*, 2012; Soto-Sánchez *et al.*, 2015), tiempo de fermentación (Soto-Sánchez *et al.*, 2015), tipo y composición de sustrato (Peláez-Acero *et al.*, 2011; Tuyen *et al.*, 2012; Soto-Sánchez *et al.*, 2015), patrón de degradación de los carbohidratos estructurales del sustrato (Tuyen *et al.*, 2013) y temperatura (Okano *et al.*, 2006). Estos factores son determinantes en la composición química con valor nutricional del fermento sólido (Tuyen *et al.*, 2013; Soto-Sánchez *et al.*, 2015). Por lo tanto, la selección de las cepas o especies de hongos es fundamental como tratamiento previo óptimo de residuos agrícolas o altamente lignocelulósicos (Nayan *et al.*, 2018) para una degradación selectiva de lignina sin consumo relevante de celulosa (Méndez-Hernández *et al.*, 2019) y hemicelulosa.

La mayor producción parcial de biogás a las 24 h fue del fermento obtenido de la cepa MR en pasto mulato ($p \leq 0.05$), 16.27% más biogás que el fermento obtenido con la misma cepa, al usar rastrojo de maíz como sustrato. El fermento de la cepa P15 no presentó diferencias entre sustratos ($p > 0.05$; Cuadro 3). En la misma variable no hubo diferencias entre los fermentos obtenidos de las cepas de *P. ostreatus* durante 30 d de fermentación sólida ($p > 0.05$); pero a los 15 d el fermento de la cepa MR produjo 7.95% más biogás parcial a las 24 h que la cepa P15 ($p \leq 0.05$; Cuadro 5).

Respecto a la producción parcial de biogás a 48 h, la cepa MR de *P. ostreatus* produjo 22.85% más biogás cuando se inoculó en rastrojo de maíz que en pasto mulato ($p \leq 0.05$); mientras, el fermento inoculado con la cepa P15 de *P. ostreatus* no presentó diferencias con la cepa MR en cualquiera de los dos sustratos evaluados ($p > 0.05$; Cuadro 3). Además, entre los tiempos de fermentación sólida, en el pasto mulato

sustratos at the beginning of solid fermentation (Peláez-Acero *et al.*, 2011); species of fungus (Tuyen *et al.*, 2012; Soto-Sánchez *et al.*, 2015); fermentation time (Soto-Sánchez *et al.*, 2015); type and composition of substrate (Peláez-Acero *et al.*, 2011; Tuyen *et al.*, 2012; Soto-Sánchez *et al.*, 2015); degradation pattern of substrate structural carbohydrates (Tuyen *et al.*, 2013) and temperature (Okano *et al.*, 2006). These factors are determinant in the chemical composition with nutritional value of the solid ferment (Tuyen *et al.*, 2013; Soto-Sánchez *et al.*, 2015). Therefore, the selection of fungal strains or species is essential as an optimal pre-treatment of agricultural or highly lignocellulosic residues (Nayan *et al.*, 2018) for a selective degradation of lignin without a relevant consumption of cellulose (Méndez-Hernández *et al.*, 2019) and hemicellulose.

The highest partial biogas production at 24 h was from the ferment obtained from the MR strain in mulatto grass ($p \leq 0.05$), 16.27% more biogas than the ferment obtained with the same strain, when using corn stubble as substrate. The ferment of strain P15 showed no differences between substrates ($p > 0.05$; Table 3). In the same variable, there were no differences between the ferments obtained from the *P. ostreatus* strains during 30 d of solid fermentation ($p > 0.05$), but at 15 d the ferment of the MR strain produced 7.95% more partial biogas at 24 h than the P15 strain ($p \leq 0.05$; Table 5).

Regarding the partial production of biogas at 48 h, the MR strain of *P. ostreatus* produced 22.85% more biogas when it was inoculated in corn stubble than in mulatto grass ($p \leq 0.05$); whereas the ferment inoculated with the P15 strain of *P. ostreatus* did not show differences with the MR strain in any of the two substrates evaluated ($p > 0.05$; Table 3). In addition, between the solid fermentation times, in the mulatto grass there were no differences ($p > 0.05$), and when the substrate was corn stubble the biogas production increased 15.81% from 15 to 30 d ($p \leq 0.05$; Table 4). Both solid fermentation periods did not show differences when inoculating the substrates with the P15 strain of *P. ostreatus* ($p > 0.05$), but when the MR strain of *P. ostreatus* was used, the biogas production was 26.54% higher in the ferments with 30 d than in those of 15 d ($p \leq 0.05$; Table 5).

The highest partial biogas production at 72 h was from the ferment obtained from mulatto grass inoculated with the P15 strain of *P. ostreatus* for 30 d ($p \leq 0.05$), showing no differences with the ferments

no hubo diferencias ($p > 0.05$), y cuando el sustrato fue rastrojo de maíz, la producción de biogás aumentó 15.81% de los 15 a los 30 d ($p \leq 0.05$; Cuadro 4). Ambos tiempos de fermentación sólida no mostraron diferencias al inocular los sustratos con la cepa P15 de *P. ostreatus* ($p > 0.05$), pero cuando se usó la cepa MR de *P. ostreatus* la producción de biogás fue 26.54% mayor en los fermentos con 30 d que de 15 d ($p \leq 0.05$; Cuadro 5).

La mayor producción parcial de biogás a 72 h fue del fermento obtenido de pasto mulato inoculado con la cepa P15 de *P. ostreatus* por 30 d ($p \leq 0.05$), sin diferencias con los fermentos obtenidos con cualquiera de los sustratos inoculados con la cepa MR de *P. ostreatus* por 30 d ($p > 0.05$; Cuadro 6). La producción de biogás acumulado es una relación indirecta de la disponibilidad de los carbohidratos durante la fermentación ruminal (Sánchez-Santillán *et al.*, 2015a). Cuando se usó pasto mulato como sustrato, la cepa MR produjo 5.34% más biogás ($p \leq 0.05$) que la cepa P15, pero con rastrojo de maíz como sustrato las cepas de *P. ostreatus* no mostraron diferencias en la producción de biogás acumulado ($p > 0.05$; Cuadro 3). Cabe destacar, los fermentos con 30 d produjeron 24.50% más biogás acumulado que los fermentos con 15 d ($p \leq 0.05$; Cuadro 2).

obtained with any of the substrates inoculated with the MR strain of *P. ostreatus* for 30 d ($p > 0.05$; Table 6). Production of accumulated biogas is an indirect relationship of the availability of carbohydrates during ruminal fermentation (Sánchez-Santillán *et al.*, 2015a). When mulatto grass was used as a substrate, the MR strain produced 5.34% more biogas ($p \leq 0.05$) than the P15 strain, but with corn stubble as a substrate, the *P. ostreatus* strains showed no differences in the production of accumulated biogas ($p > 0.05$; Table 3). It should be noticed that 30-d ferments produced 24.50% more accumulated biogas than 15-d ferments ($p \leq 0.05$; Table 2).

The partial production of biogas makes it possible to indirectly estimate the availability of carbohydrates from solid ferments during fermentation by ruminal microorganisms, because during the first 24 h non-structural carbohydrates are fermented (Herrera-Pérez *et al.*, 2018; Torres-Salado *et al.*, 2019; Texta *et al.*, 2019) of the cellular content (Herrera-Pérez *et al.*, 2018); and of the protein fraction (Torres-Salado *et al.*, 2019). From 48 h of incubation, the production of biogas would be the product of the capacity of the inoculated ruminal microorganisms to degrade structural carbohydrates (Sánchez-Santillán *et al.*, 2015a; Torres-Salado *et al.*, 2019).

Cuadro 6. Fibra detergente neutro y biogás *in vitro*† de fermentos obtenidos de rastrojo de maíz y pasto mulato inoculado con la cepa MR o P15 de *Pleurotus ostreatus* en 15 y 30 días de fermentación sólida.
Table 6. Neutral detergent fiber and *in vitro* biogas† of fermentos obtained from corn stubble and mulatto grass inoculated with the MR or P15 strain of *Pleurotus ostreatus* in 15 and 30 days of solid fermentation.

Sustrato	Cepa	Tiempo	FDN	Biogás 72
Pasto mulato	MR	15 d	70.92 abc	8.73 cd
		30 d	67.69 d	16.12 abc
	P15	15 d	72.18 a	9.52 cd
		30 d	68.9 cd	21.52 a
Rastrojo de maíz	MR	15 d	71.77 ab	8.01 d
		30 d	69.57 bcd	18.61 ab
	P15	15 d	69.78 abcd	11.01 cd
		30 d	62.68	12.89 bcd
EEM			0.61	1.07

†Las variables presentaron interacción sustrato cepa tiempo ($p \leq 0.05$). a,b,c: valores medios por columna con letra distinta son diferentes ($p \leq 0.05$). FDN = fibra detergente neutro; Biogás 72 = mL g⁻¹ MS de las 48 a 72 h; EEM = error estándar de la media. ♦ †The variables showed substrate strain time interaction ($p \leq 0.05$). a,b,c: mean values per column with different letter are different ($p \leq 0.05$). FDA = neutral detergent fiber; Biogas 72: mL g⁻¹ MS from 48 to 72 h; EEM: standard error of the mean.

La producción parcial de biogás permite estimar indirectamente la disponibilidad de los carbohidratos de los fermentos sólidos durante la fermentación por microorganismos ruminales, porque durante las primeras 24 h se fermentan los carbohidratos no estructurales (Herrera-Pérez *et al.*, 2018; Torres-Salado *et al.*, 2019; Texta *et al.*, 2019) del contenido celular (Herrera-Pérez *et al.*, 2018) y la fracción proteica (Torres-Salado *et al.*, 2019). Desde las 48 h de incubación, la producción de biogás sería producto de la capacidad de los microorganismos ruminales inoculados para degradar los carbohidratos estructurales (Sanchez-Santillán *et al.*, 2015a; Torres-Salado *et al.*, 2019).

Herrera-Pérez *et al.* (2018) documentaron una producción acumulada de 133.0 y 232.9 mL de biogás g^{-1} MS a las 24 y 72 h en rastrojo de maíz, valores superiores a los fermentos obtenidos en nuestro estudio con el rastrojo de maíz como sustrato. Almaraz-Buendía *et al.* (2019) registraron un volumen máximo de biogás para el pasto mulato de 82.10 mL g^{-1} MS, valor menor al de nuestro estudio con los fermentos de pasto mulato. Mientras que Herrera-Pérez *et al.* (2018) encontraron 247 mL de biogás g^{-1} MS en pasto cobra con 56 d de rebrote, lo cual es mayor al de nuestro experimento en los fermentos del pasto mulato.

Estas diferencias en la producción de biogás se atribuyen a que los fermentos provienen de un proceso fermentativo donde *P. ostreatus* consumió carbohidratos solubles y hemicelulosa para su crecimiento (Sánchez-Santillán *et al.*, 2015a; Olivera-De la Cruz *et al.*, 2019). Esto redujo la disponibilidad de carbohidratos para la fermentación ruminal. Okano *et al.* (2006) informaron valores similares a la producción de biogás de los fermentos de 30 d de nuestro estudio en bagazo de caña de azúcar tratado con *P. eryngii* por 35 d, pero la producción de biogás de los fermentos de 15 d de nuestro estudio es superior a la publicada por Soto-Sánchez *et al.* (2015) en fermentos de paja de cebada por 16 d con *P. ostreatus*.

La producción de CH_4 parcial a las 24 h aumentó en el fermento con 30 d respecto al de 15 d, porque la producción de CH_4 fue 22.87% mayor en el sustrato pasto mulato y 45.22% más alta en el rastrojo de maíz, respectivamente ($p \leq 0.05$; Cuadro 2). La producción parcial de CH_4 a 48 h no mostró diferencias en los fermentos obtenidos de rastrojo de maíz a los 15 o 30 d ($p > 0.05$), mientras el fermento con

Herrera-Pérez *et al.* (2018) reported a cumulative production of 133.0 and 232.9 mL of biogas g^{-1} MS at 24 and 72 h in corn stubble, values higher than the ferments obtained in our study with corn stubble as substrate. Almaraz-Buendía *et al.* (2019) reported a maximum biogas volume for mulatto grass of 82.10 mL g^{-1} MS, which is lower than that recorded in our study of ferments with mulatto grass. Whilst Herrera-Pérez *et al.* (2018) found 247 mL of biogas g^{-1} MS in cobra grass with 56 d of regrowth, which is a greater value than that of our experiment in ferments of mulatto grass.

These differences in biogas production are attributed to the fact that the ferments come from a fermentative process where *P. ostreatus* consumed soluble carbohydrates and hemicellulose for growing (Sánchez-Santillán *et al.*, 2015a; Olivera-De la Cruz *et al.*, 2019). This fact reduced the availability of carbohydrates for ruminal fermentation. Okano *et al.* (2006) reported similar values to the biogas production of the 30-d ferments of our study, in sugarcane bagasse treated with *P. eryngii* for 35 d, but the biogas production of the 15-d ferments of our study is higher than that reported by Soto-Sánchez *et al.* (2015) in barley straw ferments for 16 d with *P. ostreatus*.

The partial CH_4 production at 24 h increased in the ferment of 30 d compared to that of 15 d because the production of CH_4 was 22.87% higher in the mulatto grass substrate and 45.22% higher in the corn stubble, respectively ($p \leq 0.05$; Table 2). The partial production of CH_4 at 48 h showed no differences in the ferments obtained from corn stubble with 15 or 30 d ($p > 0.05$), while the ferment with mulatto grass for 30 d produced 55.77% more partial CH_4 at 48 h than the ferment with mulatto grass for 15 d ($p \leq 0.05$; Table 4). The partial CH_4 production at 24 h and 48 h of the ferments with the MR or P15 strain of *P. ostreatus* showed no differences ($p > 0.05$) with means of 41.35 and 9.04 mL g^{-1} of MS, respectively (Table 2).

The partial production of CH_4 at 72 h and accumulated CH_4 showed no differences between the mulatto grass and corn stubble substrates, nor between the MR and P15 strains of *P. ostreatus* ($p > 0.05$; Table 2). In the factor time of solid fermentation, the partial production of CH_4 at 72 h was not different between 15 and 30 d ($p > 0.05$), but in accumulated CH_4 the ferment with 30 d produced

pasto mulato por 30 d produjo 55.77% más CH₄ parcial a 48 h que el fermento con pasto mulato por 15 d ($p \leq 0.05$; Cuadro 4). La producción de CH₄ parcial a las 24 h y 48 h de los fermentos con la cepa MR o P15 de *P. ostreatus* no presentaron diferencias ($p > 0.05$), con promedios de 41.35 y 9.04 mL g⁻¹ de MS, respectivamente (Cuadro 2).

La producción parcial de CH₄ a 72 h y CH₄ acumulado no mostró diferencias entre los sustratos pasto mulato y rastrojo de maíz, ni entre las cepas MR y P15 de *P. ostreatus* ($p > 0.05$; Cuadro 2). En el factor tiempo de fermentación sólida la producción parcial de CH₄ a 72 h no fue diferente entre 15 y 30 d ($p > 0.05$), pero en CH₄ acumulado el fermento con 30 d produjo 28.85% más CH₄ que 15 d ($p \leq 0.05$; Cuadro 2). En promedio, la producción de CH₄ de los fermentos de pasto mulato y rastrojo de maíz representó 29.74 y 28.72% del total de biogás producido. En los fermentos con 15 d, el CH₄ fue 28.68% del total de biogás, con un aumento de un punto porcentual en los fermentos con 30 d. Herrera-Pérez *et al.* (2018) publicaron que el CH₄ representó 18.12 y 21.71% del total de biogás en rastrojo de maíz y pasto cobra con 56 d de rebrote.

Todo lo anterior permite afirmar que la disponibilidad de carbohidratos estructurales en nuestro estudio mejoró con el tratamiento de los sustratos con *P. ostreatus*, ya que la fermentación de carbohidratos estructurales por bacterias celulolíticas genera producción mayor de CH₄ porque sus productos finales de fermentación son acetato e H₂ (Vanegas *et al.*, 2017; Torres-Salado *et al.*, 2019). Esto propicia una relación sintrópica con las arqueas metanogénicas del rumen, las cuales usan el H₂ y CO₂ como sustrato para producir CH₄ como parte de su metabolismo (Torres-Salado *et al.*, 2019). Según Tuyen *et al.* (2013), la producción de CH₄ representó 20% de total de biogás en fermentos de rastrojo de maíz con *P. ostreatus*, valores inferiores a nuestro estudio.

La degradación mayor de MS (DMS) y degradación de la FDN (DFDN) mayor ocurrieron en los fermentos con 30 d de fermentación sólida con cualquiera de las cepas de *P. ostreatus* ($p \leq 0.05$), en promedios de 76.94 y 72.28%, respectivamente. En los fermentos de 15 d, la cepa P15 de *P. ostreatus* presentó 3.0 y 4.68% mayores DMS y DFDN que la cepa MR de *P. ostreatus* ($p \leq 0.05$; Cuadro 5). Estos resultados concuerdan con Olivera-De la Cruz *et al.* (2019), quienes mencionaron que el tiempo de

28.85% more CH₄ than that of 15 d ($p \leq 0.05$; Table 2). On average, CH₄ production from mulatto grass and corn stubble ferments represented 29.74 and 28.72% of the total biogas produced. In the 15-d ferments, CH₄ was 28.68% of the total biogas, with an increase of one percentage point in the 30-d ferments. Herrera-Pérez *et al.* (2018) reported that CH₄ represented 18.12 and 21.71% of the total biogas in corn stubble and cobra grass with 56 d of regrowth.

The former allows us to affirm that the availability of structural carbohydrates in our study improved with the treatment of substrates with *P. ostreatus* since the fermentation of structural carbohydrates by cellulolytic bacteria generates greater production of CH₄ because their final fermentation products are acetate and H₂ (Vanegas *et al.*, 2017; Torres-Salado *et al.*, 2019). This favors a syntropic relationship with the methanogenic archaea in the rumen, which use H₂ and CO₂ as a substrate to produce CH₄ as part of their metabolism (Torres-Salado *et al.*, 2019). According to Tuyen *et al.* (2013), CH₄ production represented 20% of total biogas in corn stubble ferments with *P. ostreatus*, values lower than those reported in our study.

The greatest degradation of dry matter (DMS) and degradation of neutral detergent fiber (DFDN) occurred in the ferments with 30 d of solid fermentation with any of the *P. ostreatus* strains ($p \leq 0.05$) with an average of 76.94 and 72.28%, respectively. In the 15-d ferments, the P15 strain of *P. ostreatus* presented 3.0 and 4.68% higher DMS and DFDN than the MR strain of *P. ostreatus* ($p \leq 0.05$; Table 5). These results agree with those reported by Olivera-De la Cruz *et al.* (2019), who mentioned that the exposure time of the fungus in the substrate increases the degradation of the cell wall. Likewise, the ferment with corn stubble presented 2.48 and 5.68% higher DMS and DFDN than the mulatto grass ($p \leq 0.05$; Table 2). Herrera-Pérez *et al.* (2018) reported 60.84 and 51.32% of DMS and DFDN, values lower than those recorded in our study. Almaraz-Buendía *et al.* (2019) found 45.20 and 47.42% in mulatto grass with 60 d of regrowth, lower than those of our study.

Comparisons allow us to assume that the incorporation of ligninolytic fungi into forages with high fiber content, as in our experiment, favors fiber degradation due to enzymatic action. This is because

exposición del hongo en el sustrato aumenta la degradación de la pared celular. Así mismo, el fermento con rastrojo de maíz presentó 2.48 y 5.68% mayores DMS y DFDN que el pasto mulato ($p \leq 0.05$; Cuadro 2). Herrera-Pérez *et al.* (2018) informaron 60.84 y 51.32% de DMS y DFDN, valores inferiores a los de nuestro estudio. Almaraz-Buendía *et al.* (2019) encontraron 45.20 y 47.42% en pasto mulato con 60 d de rebrote, inferiores a los de nuestro estudio.

Las comparaciones permiten suponer que la incorporación de hongos ligninolíticos a forrajes con alto contenido de fibra, como en nuestro experimento, favorece la degradación de la fibra por acción enzimática. Esto porque *P. ostreatus* es un degradador eficaz de lignina (Tuyen *et al.*, 2013) y aumenta las fracciones digeribles de los sustratos (Okano *et al.*, 2007) durante su fermentación en rumen (Tuyen *et al.*, 2012). El uso potencial de *P. ostreatus* como mejorador de la degradación de los sustratos lignocelulósicos se determina por el tipo y condición de estos durante el proceso de fermentación sólida (Nayan *et al.*, 2018).

CONCLUSIONES

El uso de las cepas MR y P15 de *Pleurotus ostreatus* como pretratamiento del rastrojo de maíz y pasto mulato por 30 días redujo el contenido de fibra detergente neutro e incrementó la proteína cruda. Estas mejoras se reflejaron en la producción de biogás, metano y degradaciones *in vitro*; lo cual indicó que el tratamiento de estos sustratos con *P. ostreatus* mejoró la disponibilidad de nutrientes en la fermentación con microorganismos en el rumen.

AGRADECIMIENTOS

Al Cuerpo Académico UAGro-CA-183 de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia No. 2 de la Universidad Autónoma de Guerrero, vía el proyecto "Producción sustentable de rumiantes en el trópico" por el financiamiento de esta investigación.

LITERATURA CITADA

Almaraz-Buendía, I., A. M. García, P. Sánchez-Santillán, N. Torres-Salado, J. Herrera-Pérez, M. B. Bottini-Luzardo, y A. R. Rojas-García. 2019. Análisis bromatológico y producción de gas *in vitro* de forrajes utilizados en el trópico seco mexicano. Arch. Zootec. 68: 260-266.

P. ostreatus is an effective lignin degrader (Tuyen *et al.*, 2013) and increases the digestible fractions of substrates (Okano *et al.*, 2007) during fermentation in the rumen (Tuyen *et al.*, 2012). The potential use of *P. ostreatus* as an enhancer of the degradation of lignocellulosic substrates is determined by the type and condition of these during the solid fermentation process (Nayan *et al.*, 2018).

CONCLUSIONS

The use of *Pleurotus ostreatus* strains MR and P15 as a pretreatment of maize stubble and mulatto grass for 30 days reduced the content of neutral detergent fiber and increased crude protein. These improvements were expressed in the production of biogas, methane and *in vitro* degradations; which indicated that the treatment of these substrates with *P. ostreatus* improved the availability of nutrients in the fermentation with the microorganisms in rumen.

—End of the English version—



- AOAC (Association of Official Analytic Chemists). 2005. Official methods of analysis. 18th ed. Association of Official Analytic Chemists, Washington, D.C., USA. 1094 p.
- Hernández-Morales, J., P. Sánchez-Santillán, N. Torres-Salado, J. Herrera-Pérez, A. R. Rojas-García, I. Reyes-Vázquez, y M. A. Mendoza-Núñez. 2018. Composición química y degradaciones *in vitro* de vainas y hojas de leguminosas arbóreas del trópico seco de México. Rev. Mex. Cienc. Pec. 9: 105-120.
- Herrera-Pérez, J., L. G. Vélez-Regino, P. Sánchez-Santillán, N. Torres-Salado, A. R. Rojas-García, y M. A. Maldonado-Peralta MA. 2018. *In vitro* fermentation of fibrous substrates by water buffalo ruminal cellulolytic bacteria consortia. MVZ Cordoba. 23: 6860-6870.
- INEGI (Instituto Nacional de Estadística y Geografía). 2018. Anuario estadístico y geográfico de los Estados Unidos Mexicanos. www.beta.inegi.org.mx/app/areasgeograficas/?ag=12023 (Acceso: octubre 2018).
- Luna, L., M. Meneses, G. Mendoza, C. Montalvo, y O. Loera. 2013. Efecto y actividad enzimática de *Pleurotus ostreatus* en pared celular de rastrojo de cebada. LRRD. 25: 1-13.
- Méndez-Hernández, J. E., O. Loera, E. M. Méndez-Hernández, E. Herrera, O. Arce-Cervantes, and N. O. Soto-Cruz. 2019. Fungal pretreatment of corn stover by *Fomes* sp. EUM1: simultaneous production of readily hydrolysable biomass and useful biocatalysts. Waste Biomass Valorization. 10: 2637-2650.

- Nayan, N., J. W. Cone, A. S. M. Sonnenberg, and W. H. Hendriks. 2018. Screening of white-rot fungi for bioprocessing of wheat straw into ruminant feed. *J. Appl. Microbiol.* 125: 468-479.
- Okano, K., Y. Iida, M. Samsuri, B. Prasetya, T. Usagawa, and T. Watanabe. 2006. Comparison of *in vitro* digestibility and chemical composition among sugarcane bagasses treated by four white-rot fungi. *Anim. Sci. J.* 77: 308-313.
- Okano K., S. Fukui, R. Kitao, and T. Usagawa. 2007. Effects of culture length of *Pleurotus eryngii* grown on sugarcane bagasse on *in vitro* digestibility and chemical composition. *Anim. Feed Sci. Technol.* 136: 240-247.
- Olivera-De la Cruz, A. R., E. Ortega-Jiménez, P. Díaz-Rivera, E. Aranda-Ibáñez, J. Ramos-Juárez, y G. Mendoza-Martínez. 2019. Efecto de *Pleurotus ostreatus* en la degradación de los residuos agrícolas. *Agrociencia.* 53: 25-33.
- Peláez-Acero A., M. Meneses-Mayo, L. A. Miranda-Romero, M. Ayala-Martínez, M. M. Crosby-Galván, O. Loera-Corral, y M. D. Megías-Rivas. 2011. Enzimas fibrolíticas producidas por fermentación en estado sólido para mejorar los ensilajes de caña de azúcar. *Agrociencia.* 45: 675-685.
- Prada-Matiz, A., y C.E. Cortés-Castillo. 2011. Experiencias en la captura de los gases de combustión de la cascarilla de arroz con soluciones alcalinas. *Orinoquia.* 15:16-30.
- Sánchez-Santillán, P., M. Meneses-Mayo, L. A. Miranda-Romero, E. Santellano-Estrada, y B. Alarcón-Zúñiga. 2015a. Actividad fibrolítica y producción de gas por *Pleurotus ostreatus*-IE8 y *Fomes fomentarius*-EUM1 en bagazo de caña. *MVZ Córdoba* 20: 4907-4916.
- Sánchez-Santillán, P., M. M. Meneses, and N. Torres-Salado. 2015b. Production of lignocellulolytic enzymes with *Pleurotus ostreatus*-IE8 by solid fermentation and its effect on the chemical composition of sugarcane bagasse. *Life Sci. J.* 12:37-41.
- Sánchez-Santillán, P., M. A. Cobos-Peralta, D. Hernández-Sánchez, A. I. Alvarado, D. Espinosa-Victoria, y J. G. Herrera-Haro. 2016. Uso de carbón activado para conservar bacterias celulolíticas liofilizadas. *Agrociencia* 50: 575-582.
- Sánchez-Santillán, P., J. Herrera-Pérez, N. Torres-Salado, I. Almaraz-Buendía, I. Reyes-Vázquez, A. R. Rojas-García, M. Gómez-Trinidad M, E. O. Contreras-Ramírez, M. A. Maldonado-Peralta, and F. Magadan-Olmedo. 2019. Chemical composition, and *in vitro* fermentation of ripe mango silage with molasses. *Agroforest. Syst.* <https://doi.org/10.1007/s10457-019-00442-z>
- SAS Institute, Inc. 2011. Statistical Analysis Software (SAS/STAT). Version 9.33 Ed. Cary, NC. USA. 528 pp.
- Shrivastava, B., S. Thakur, Y. P. Khasa, A. Gupte, A. P. Kumar, and R. K. Chander. 2011. White-rot fungal conversion of wheat straw to energy rich cattle feed. *Biodegradation.* 22: 823-831.
- Soto-Sánchez, A., J. E. Ramírez-Briebesca, M. Meneses-Mayo, O. Loera-Corral, L. A. Miranda-Romero, and R. Bárcena-Gama. 2015. Effects of *Pleurotus sapidus* (Schulzer) Sacc. treatment on nutrient composition and ruminal fermentability of barley straw, barley rootless, and a mixture of the two. *Chilean J. Agric. Research.* 75: 313-319.
- Texta, N. J., P. Sánchez-Santillán, D. S. Hernández, N. Torres-Salado, M. G. Crosby, A. R. Rojas-García, J. P. Herrera, and M. A. P. Maldonado. 2019. Use of disaccharides and activated carbon to preserve cellulolytic ruminal bacterial consortiums lyophilized. *MVZ Córdoba.* 24: 7305-7313.
- Torres-Salado, N., P. Sánchez-Santillán, A. R. Rojas-García, I. Almaraz-Buendía, J. Herrera-Pérez, I. Reyes-Vázquez, y F. J. Mayren-Mendoza. 2019. *In vitro* gas production and fermentative characteristics of ruminal cellulolytic bacterial consortia of water buffalo (*Bubalus bubalis*) and Suiz-bu cow. *Agrociencia.* 53: 145-159.
- Tuyen, V. D., J. W. Cone, J. J. P. Baars, A. S. M. Sonnenberg, and W. H. Hendriks. 2012. Fungal strain and incubation period affect chemical composition and nutrient availability of wheat straw for rumen fermentation. *Bioresour Technol.* 111: 336-342.
- Tuyen, V. D., H. N. Phuong, J. W. Cone, J. J. P. Baars, A. S. M. Sonnenberg, and W. H. Hendriks. 2013. Effect of fungal treatments of fibrous agricultural by-products on chemical composition and *in vitro* rumen fermentation and methane production. *Bioresour Technol.* 129: 256-263.
- Van Soest, P. J., J. B. Robertson, and B. A. Lewis. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J Dairy Sci.* 74: 3583-3597.
- Vanegas, J. L., J. González, and M. D. Carro. 2017. Influence of protein fermentation and carbohydrate source on *in vitro* methane production. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 101: e288-e296.

