Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Ciencias Veterinarias
Programa de Doctorado en Ciencias Veterinarias

Evaluación *In Vitro* De Heno Pretratado Con *Pleurotus ostreatus* Para Utilización En Alimentación De Rumiantes Y *Saccharomyces cerevisiae* Como Aditivo

Tesis para optar al grado de Doctora en Ciencias Veterinarias

RITA GEORGINA ASTUDILLO NEIRA

CHILLÁN-CHILE

2023

Profesor Guía: Jorge Eduardo Ávila Stagno
Dpto. de Ciencia Animal
Facultad de Ciencias Veterinarias
Universidad de Concepción

Esta tesis ha sido realizada en el Departamento de Ciencia Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias Universidad de Concepción

Profesor Guía

Dr. Jorge Eduardo Ávila Stagno
Facultad de Ciencias Veterinarias
Universidad de Concepción

Comisión Evaluadora:

Rodrigo Allende Vargas
Facultad de Ciencias Veterinarias
Universidad de Concepción

Dr. Emilio Mauricio Ungerfeld Moran
Instituto de Investigaciones Agropecuarias
INIA
Ministerio de Agricultura, Chile

Dr. Julio Alarcón Enos
Facultad de Ciencias Básicas
Universidad del Bío Bío

Director de Programa

Dr. Fidel Ovidio Castro Reboredo
Facultad de Ciencias Veterinarias
Universidad de Concepción

AGRADECIMIENTOS

Se agradece y reconoce de manera especial a:

* Comisión Nacional de Investigación Cientifica y Tecnologica (CONICYT), hoy Agencia Nacional de Investigación y Desarrollo (ANID) por su apoyo financiero.
* Laboratorio de Síntesis y Biotransformación de Productos Naturales del Departamento de Ciencias Básicas de la Universidad del Bío-Bío, liderado por el Profesor Julio Alarcón Enos, donde me recibieron y apoyaron técnica y financieramente en el desarrollo de los experimentos de tesis.
* Programa de Doctorado en Ciencias Veterinarias dirigido por el Doctor Fidel Ovidio Castro Reboredo, la secretaria del programa, Clara Amelia Castro Becerra y a todos los docentes y profesionales vinculados.
* Doctor Jorge Ávila Stagno, Doctor Nelson Vera Aguilera, Doctora Sandra Tatiana Suescun, ex Nutrilab todos…gracias por su apoyo, fue un agrado trabajar con ustedes.

DEDICATORIA

Este documento de tesis es el resultado de años de esfuerzo y dedicación, el cual no hubiera llegado a concretarse sin el apoyo constante y extenso de mis padres. Guillermo y Elianita, me han levantado mil veces con amor, fuerza, energía y sobre todo con plena confianza en mi…apoyándome en cada una de mis aventuras. Son lo mejor y los amo; Gracias por ser mi familia en esta vida y en la eternidad.

Francisca Migryk ...hermana chica de la vida, este doctorado tampoco llegaría a su fin, sin ti. Me has cuidado y apoyado; has sido contención y energía. Tu hermosa familia me adoptó y cuidó como una más del clan. (Gracias por soportarme).

A los Doctores Christian Guajardo, Jorge Campos, Valeria Velasco y Hernan Rodríguez, quienes apoyaron esta aventura desde antes de comenzar, sin perder la confianza en mi.

“Familia química” durante años, me escucharon, consolaron, guiaron y sobre todo cuando el barco parecía hundirse…más apoyo me dieron, no hay forma de agradecer tanto; Soledad Quiroz, Evelyn Muñoz…tanta paciencia que tuvieron con esta agrónoma nada química…imposible no sentir que les debo un cuarto vida.

Por último, pero no menos importante, quiero agradecerme
Quiero agradecerme por creer en mí
Quiero agradecerme por hacer todo este trabajo duro
Quiero agradecerme por no tener días libres
Quiero agradecerme por nunca abandonar
Quiero agradecerme por ser una persona que da
Y que intenta dar mas de lo que recibe
Quiero agradecerme por intentar hacer más bien que mal
Quiero agradecerme por ser yo en todo momento.

Adaptado de Snoop Dogg

RESUMEN

Los forrajes y/o subproductos de la industria agrícola, se consideran de menor calidad en la medida que aumenta su contenido de lignina, a pesar de lo cual son usualmente utilizados para la alimentación de rumiantes, principalmente por razones de costos y disponibilidad.
La presencia de lignina es responsable de disminuir la digestibilidad y por ende la utilización de los nutrientes contenidos en estos alimentos. La habilidad de los rumiantes de fermentar los carbohidratos es un proceso que tiene pérdidas energéticas, debido a la producción y liberación de metano (CH_4) que actúa como Gas de Efecto Invernadero (GEI).
Un componente importante de investigación en nutrición de rumiantes se ha centrado en la evaluación de aditivos que aumenten la eficiencia de los rumiantes, y por ende disminuyan la intensidad de emisión de CH_4, principalmente utilizando compuestos químicos que modifiquen los patrones de fermentación, inhibiendo a los metanógenos, o bien mejorando la digestibilidad de los forrajes.
El trabajo reportado por esta tesis se centró en la evaluación de heno de calidad mejorada a través fermentación sólida con *Pleurotus ostreatus* (el cual aportó micelios, enzimas lignoliticas y medio de crecimiento) en combinación con *Saccharomyces cerevisiae* como aditivo, con la finalidad de mejorar los patrones de fermentación ruminal y disminuir la producción de metano (CH_4). El objetivo general fue evaluar en dietas altas en forrajes los efectos del uso de heno pretratado con *Pleurotus ostreatus* en combinación con *Saccharomyces cerevisiae* como aditivo, sobre los parámetros de fermentación ruminal, y desaparición de materia seca, en condiciones *in vitro.*
En el experimento 1 se concluyó que *P. ostreatus* realizó de manera eficiente en 14 días, fermentación de heno de ballica-festuca, disminuyendo las fracciones lignocelulósicas con alta actividad enzimática y presencia de estatinas. En el experimento 2 se evaluó dosis de inclusión de heno pretrarado con *P. ostreatus* (0, 3 y 6%) en dieta baja en fibra detergente ácido (aFDAom) y alta en aFDAom, a través de experimentos *in vitro* en lotes de 24 h de incubación. A partir de este experimento se observó mejora en la desaparición *in vitro* de la materia seca (DIVMS) por efecto de 3 y 6% de heno pretratado y dieta baja en aFDAom, sin diferencias en los ácidos grasos de cadena corta totales, pero con inclusiones de 6% H-PO aumentó la proporción molar de ácido acético y disminuyó la de ácido propionico y, la producción y rendimiento de CH_4, estableciéndose un efecto inhibitorio de las estatinas presentes en el heno pretratado sobre los metanógenos. El experimento 3, Etapa 1 se obtuvo un inóculo de *S. cerevisiae* a partir de cepas panificadoras con un valor promedio

de 1,54 x 10^6 UFC, mientras que la Etapa 2 evaluó dosis contrastantes de H-PO (0 y 6%) en dieta alta en aFDAom (mayor a 30%), y uso combinado *S. cerevisiae* como aditivo, utilizando la cepa comercial Yea Sacc®1026 y la cepa elaborada en el experimento 2, denominada cepa SC-UBB. A partir de los resultados se concluyó que a las 24 h de incubación *in vitro*, el efecto de 6% de H-PO con SC-UBB mejoró la DIVMS sin alterar la producción de gas. La inclusión de H-PO disminuyó la concentración de nitrógeno amoniacal (N-NH_3), proteína microbiana estimada, y producción de ácidos grasos de cadena corta, pero no alteró la proporción molar de acetato (a las 24h), aunque disminuyó la producción y rendimiento de CH_4. De manera similar, a las 48 h, se mantuvo la mejora en la DIVMS, incrementó la proporción molar de ácido acético, pero disminuyo la producción y rendimiento de CH_4.

A partir de los experimentos se puede concluir que el pretratamiento de heno de ballica con festuca utilizando *P. ostreatus* es una alternativa viable de mejora de la calidad nutricional del heno, dada su alta actividad enzimática selectiva, con potenciales beneficios ambientales por la disminución de CH_4.

ABSTRACT

Forages and/or byproducts from the agricultural industry are considered of lower quality as their lignin content increases, despite which they are usually used to feed ruminants, mainly for reasons of cost and availability.

The presence of lignin is responsible for reducing the digestibility and therefore the use of the nutrients contained in these foods. The ability of ruminants to ferment carbohydrates is a process that has energy losses, due to the production and release of methane (CH_4) that acts as a Greenhouse Gas (GHG).

An important component of research in ruminant nutrition has focused on the evaluation of additives that increase the efficiency of ruminants, and therefore decrease the intensity of CH_4 emission, mainly using chemical compounds that modify fermentation patterns, inhibiting methanogens, or improve the digestibility of forages.

The work reported by this thesis focused on the evaluation of improved quality hay through solid fermentation with *Pleurotus ostreatus* (which provided mycelia, lignolytic enzymes, and growth medium) in combination with *Saccharomyces cerevisiae* as an additive, to improve the rumen fermentation patterns and reduce methane (CH_4) production. The general objective was to evaluate diets high in forages and the effects of using hay pretreated with *Pleurotus ostreatus* in combination with *Saccharomyces cerevisiae* as an additive, on the parameters of rumen fermentation, and dry matter disappearance, under *in vitro* conditions. In experiment 1, it was concluded that *P. ostreatus* efficiently fermented ryegrass-fescue hay in 14 days, reducing lignocellulosic fractions with high enzymatic activity and the presence of statins. In experiment 2, inclusion doses of hay pretreated with *P. ostreatus* (0, 3, and 6%) in a diet low in acid detergent fiber (aFDAom) and high in aFDAom were evaluated, through *in vitro* experiments in 24-h batches. incubation. From this experiment, an improvement was observed in the *in vitro* disappearance of dry matter (DIVMS) due to the effect of 3 and 6% of pretreated hay and a diet low in aFDAom, without differences in total short chain fatty acids, but with inclusions of 6% H-PO increased the molar proportion of acetic acid and decreased that of propionic acid and the production and yield of CH_4, establishing an inhibitory effect of the statins present in the pretreated hay on methanogens. Experiment 3, Stage 1, an inoculum of *S. cerevisiae* was obtained from breadmaking strains with an average value of 1.54 x 106 CFU, while Stage 2 evaluated contrasting doses of H-PO (0 and 6%) in diet high in aFDAom (greater than 30%), and combined use of *S. cerevisiae* as an additive, using the commercial strain Yea Sacc®1026 and the strain prepared in experiment 2, called strain SC-UBB. From the results, it was concluded that

after 24 h of *in vitro* incubation, the effect of 6% H-PO with SC-UBB improved the DIVMS without altering gas production. The inclusion of H-PO decreased the concentration of ammoniacal nitrogen ($N\text{-}NH_3$), estimated microbial protein, and production of short-chain fatty acids, but did not alter the molar proportion of acetate (at 24 h), although it decreased the production and CH_4 yield. Similarly, at 48 h, the improvement in DIVMS was maintained, and the molar proportion of acetic acid increased, but the production and yield of CH_4 decreased.

From the experiments it can be concluded that pretreatment of ryegrass hay with fescue using *P. ostreatus* is a viable alternative to improve the nutritional quality of hay, given its high selective enzymatic activity. With potential environmental benefits due to the reduction of CH_4.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN v
ABSTRACT vii
ÍNDICE DE GENERAL ix
ÍNDICE DE TABLAS xi
ÍNDICE DE FIGURAS x
I.- INTRODUCCIÓN 1
II.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA 3
IMPACTO DE RUMIANTES EN LOS GASES DE EFECTO INVERNADERO 3
FERMENTACIÓN RUMINAL Y PRODUCCIÓN DE METANO 3
Metanogénesis ruminal 7
ESTRATEGIAS NUTRICIONALES PARA MEJORAR LA FERMENTACIÓN RUMINAL Y MITIGACIÓN DE EMISIONES DE METANO. 10
Microrganismos como suplementos alimenticios. 12
Microbios de Alimentación Directa (DFM) bacterianos para rumiantes. 13
Microbios de Alimentación Directa (DFM) fúngicos para rumiantes. 13
Saccharomyces cerevisiae 14
Estrategia de biotratamiento de forrajes con hongos 16
III.- HIPÓTESIS 23
IV.- EXPERIMENTOS 24
Experimento 1. Obtención de heno biodegradado con *Pleurotus ostreatus*, para utilización en fermentaciones ruminales *in vitro*. 24
Experimento 2. Evaluación de inclusión de heno biodegradado con *P. ostreatus* en dietas altas y bajas en fibra, en experimentos de fermentación ruminal *in vitro*. 41
Experimento 3. Uso combinado de heno pretratado con *P. ostreatus* en dieta alta en forraje y uso combinado de *Saccharomyces cerevisiae* como aditivo de fermentaciones ruminales *in vitro*. 60

Etapa 1.- Obtención de inoculo de *Saccharomyces cerevisiae*, para utilización como DFM en fermentaciones ruminales *in vitro*. 60

Etapa 2.- Evaluación de uso combinado de heno biodegradado con *P. ostreatus* y *S. ceverisiae*.....63

V.- DISCUSIÓN GENERAL.....91

VI.- CONCLUSIONES 94

VII.- LISTA DE PUBLICACIONES.....95

VIII.- REFERENCIAS.....96

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Tipos de microorganismos ruminales. 4
Tabla 2 Clasificación funcional de las bacterias ruminales. 5
Tabla 3 Características de las bacterias y arqueas predominantes en el rumen. 6
Tabla 4 Sustratos para metanogénesis en el rumen. 9
Tabla 5 Composición química del heno de ballica festuca antes y después de 14 días de SSF. 30
Tabla 6 Ingredientes y composición química de dietas experimentales y heno utilizado. 43
Tabla 7 Efectos del heno biodegradado con *P. ostreatus* y fibra detergente ácido en la dieta, parámetros de fermentación y gases. 48
Tabla 8 Ácidos grasos de cadena corta totales (AGCCt), y porcentaje de los principales AGCCt según la concentración de heno biodegradado de *P. ostreatus* y fibra detergente ácido, a las 24 h de incubación. 51
Tabla 9 Tratamientos evaluados según la inclusión de heno biodegradado con *P. ostreatus* (H-PO) y el tipo de *S. cerevisiae* (SC) en una dieta rica en fibra. 63
Tabla 10 Ingredientes y composición química de la dieta y heno biodegradado utilizados para incubaciones *in vitro*. 64
Tabla 11 Parámetros de fermentación y de cinética de gas de incubación *in vitro*, según inclusión de heno biodegradado con *P. ostreatus* (H-PO) y *S. cerevisiae* (SC) en dieta. 69
Tabla 12 Producción de nitrógeno amoniacal y producción de proteína microbiana, según concentración de Heno biodegradado con *P. ostreatus* (H-PO) y *S. cerevisiae* (SC) en dieta en incubación *in vitro* a las 24 y 48 h. 72
Tabla 13 Principales ácidos grasos de cadena corta (AGCC), según concentración de aditivo Heno biodegradado con *P. ostreatus* (H-PO) y tipo de *S. cerevisiae* (SC) en fermentación *in vitro.* 75
Tabla 14 Ácidos grasos de cadena corta (AGCC) menores y proporción de ácidos grasos glucogénicos y no glucogénicos (NGR), según concentración de heno biodegradado con *P. ostreatus* y tipo de *S. cerevisiae* en dieta, producidos por fermentación *in vitro* 77
Tabla 15 Producción de metano (CH_4) en incubación *in vitro* a las 24 y 48 h, según concentración heno biodegradado con *P. ostreatus* y tipo de *S. cerevisiae* en dieta 80

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Rutas metabólicas implicadas en la fermentación ruminal de carbohidratos 5
Figura 2 Ruta metanogénica a partir de la reducción de CO_2 con H_2.....8
Figura 3. Reacción catalizada por el LiP de escisión C-C.....17
Figura 4. Despolimerización de la lignina con MnP. 18
Figura 5. Reacción de la lacasa en la oxidación de fenoles. 18
Figura 7. Relación entre el metabolismo primario y secundario de hongo *P. ostreatus*. ...20
Figura 8 Diagrama de flujo para la producción de heno biodegradado con *P. ostreatus*....26
Figura 9 Diagrama de procedimientos para determinación de Estatinas.....27
Figura 10 Análisis estructural con microscopio electrónico del heno de festuca antes y después de la SSF con *P. ostreatus* durante 14 días......31
Figura 11 Cromatografía en placa fina, con identificación de estatinas a simple vista y en cámara UV. 32
Figura 12 Actividad enzimática (U/L) de manganeso peroxidasa (MnP), lignina peroxidasa (LiP) y lacasa (Lac) y concentración de proteína total (g/L), en SSF con *P. ostreatus* durante 21 días......33
Figura 13 Actividad enzimática específica (U/g PT) de manganeso peroxidasa (MnP), lignina peroxidasa (LiP) y lacasa (Lac) y concentración de proteína total (g/L), en SSF con *P. ostreatus* durante 21 días.....34
Figura 14 Estructura molecular de lovastatina. 38
Figura 15 Diagrama de flujo para incubación *in vitro*. 44
Figura 16 Metano neto y, producción y rendimiento de metano, según la concentración de heno biodegradado con *P. ostreatus* y fibra detergente ácido en la dieta, a las 24 h de incubación......47
Figure 17 Interacción de fibra detergente ácido (aFDAom) en la dieta × concentración de H-PO (heno biodegradado de *P. ostreatus*) según dieta alta en aFDAom y baja en aFDAom para: (A) producción de metano (mg/g MSi) y (B) rendimiento de metano (mg/g MSd) a las 24 h. 49
Figura 18 Objetivo de inhibición de las estatinas en la vía de síntesis de lípidos de la membrana plasmática de las arqueas.. 54

Figure 19 Diagrama de fermentación de carbohidratos a nivel ruminal, indicando productos finales (AGCCt) y metano, además de algunos de los objetivos potenciales para reducir las emisiones de CH_4 de los rumiantes indicados en cursiva.. 59
Figura 20 Diagrama de realización de dilusiones seriadas para conteo de unidades formadoras de colonia.. 61
Figura 21 Diagrama de obtenición de cultivo de *S. cerevisiae* 61
Figura 22 Diagrama de flujo de evaluaciones realizadas durante y después de incubación *in vitro.* 67
Figura 23 Interacción de la inclusión de *S. cerevisiae* × concentración de H-PO en dieta alta en aFDAom, sobre la desaparición *in vitro* de materia seca a las 24 h. 70
Figura 24 Interacción de la inclusión de *S. cerevisiae* × concentración de H-PO en dieta alta en aFDAom, sobre la desaparición *in vitro* de materia seca a las 48 h. 70
Figura 25 Interacción de la inclusión *de S. cerevisiae* × concentración de H-PO en dieta alta en aFDAom, sobre la producción de proteína microbiana (PPM) a las 24 h. 73
Figura 26 Interacción de la inclusión de *S. cerevisiae* × concentración de H-PO en dieta alta en aFDAom, sobre la producción de proteína microbiana (PPM) a las 48 h. 73
Figura 27 Interacción de la inclusión de *S. cerevisiae* × concentración de H-PO en dieta alta en aFDAom, sobre relación ácido acético:ácido propiónico (A:P) a las 48 h. 76
Figura 28 Interacción de inclusion de *S. cerevisiae* x concentración de H-PO en dieta alta en aFDAom, en proporción de ácidos grasos glucogénicos y no glucogénicos (NGR) a las 24 h. 78
Figura 29 Interacción de inclusión de S. cerevisiae × concentración de H-PO en dieta alta en aFDAom, sobre proporción de ácidos grasos glucogénicos y no glucogénicos (NGR) a las 48 h. 78
Figura 30 Interacción de la inclusión de *S, cerevisiae* × concentración de H-PO en dieta alta en aFDAom, sobre el rendimiento de metano a las 24 h. 81
Figura 31 Hidrólisis de lactona de lovastatina y similitud entre las estructuras químicas del ácido β-hidroxi de lovastatina y la HMG-CoA. b. 92

I.- INTRODUCCIÓN

El rumen juega un papel central en la capacidad de los rumiantes para producir alimentos comestibles para humanos, a partir de recursos que de otro modo no estarían disponibles. Aunque, esta actividad reporta un costo medioambiental, debido a las emisiones de gases de efecto invernadero (en particular, dióxido de carbono (CO_2), metano (CH_4) y óxido nitroso (N_2O) (Oonincx et al., 2010) y la excresión excesiva de nitrógeno (N a la forma de NH_3) en fecas y orina (Ungerfeld and Newbold, 2018). El rumen esta habitado por bacterias, arqueas, protozoos y hongos, los que participan en la degradación de los alimentos consumidos y fermentan los azúcares resultantes a ácidos grasos de cadena corta (AGCC) principalmente ácido acético, ácido propiónico y ácido butírico, que son utilizados por el rumiante, el cual cumple funciones de hospedero de la microbiota ruminal. La presencia de esta microbiota ruminal, permite al animal hospedero, obtener nutrientes y energía de alimentos que no pueden utilizar otras especies. En el proceso de fermentación, las arqueas metanogénicas capturan y utilizan residuos de la fermentación (H_2, formiato, CO_2) liberando al medio, metano (CH_4) (Meller et al., 2019). Los forrajes representan en la dieta de rumiantes entre el 40 y el 100% de la dieta, y son de vital importancia para mantener la productividad y salud animal (Adesogan et al., 2019). Los principales componentes de la fibra de los forrajes, celulosa y hemicelulosa, son carbohidratos intrínsecamente fermentables en el rumen, pero debido a su estrecha relación con moléculas de lignina su completa degradación puede verse limitada (Adesogan et al., 2019), ya que ésta actúa como barrera física para la actividad enzimática de la microbiota ruminal.

La producción de CH_4 en el rumen, es un proceso indispensable para sostener la dinámica de fermentación del alimento, ya que la captación de [H_2] desde el medioambiente ruminal, disminuye la presión parcial de este, permitiendo así que continue la fermentación de más moléculas de azúcares (Morgavi et al., 2010). Sin embargo, para el hospedero o rumiante, la producción de CH_4 representa una ineficiencia energética de 2 a 12% de la energía bruta consumida por el rumiante y aproximadamente 16 a 26 g/kg del consumo de materia seca diario (Patra, 2012a; Hristov et al., 2013), ya que el CH_4 es liberado al ambiente sin reutilización de la energía contenida en él. Entre los principales factores que determinan las variaciones en la producción de CH_4 entre los rumiantes, se encuentran: el nivel de consumo, tipo y calidad de alimento y condiciones medioambientales, principalmente temperatura (altas temperaturas ambientales disminuyen el consumo de alimento y esto afecta la producción de CH_4) (Shibata and Terada, 2010). Bajo esta línea, las principales

estrategias de mitigación de las emisiones de CH_4 se basan en aumentos de eficiencia de productividad de los sistemas ganaderos y mejoras en el manejo nutricional (Shibata and Terada, 2010). Entre estas estrategias de mitigación se presentan compuestos inhibitorios (bromoclorometano (BCM), 2-bromo-etano sulfonato (BES), cloroformo o 3-nitrooxypropanol), receptores de electrones (ácido fumarico, ácido malico, nitroetano), ionóforos (monensina), compuestos bioactivos de plantas (taninos, saponinas, aceites esenciales), enzimas exógenas, microorganismos de alimentación directa (DFM) (*Saccharomyces cerevisiae*, *Megasphaera elsdenii*), defaunación, manipulación de bacterias y arqueas ruminales (vacunas), adición de lípidos a la dieta (aceites vegetales, subproductos), inclusión de alimentos concentrados, forrajes de calidad mejorada, manejo de pastoreo, procesamiento de alimentos, alimentación de precisión. Estas estrategias o tecnologías de mitigación han presentado resultados variables y no todos pueden ser recomendados para su uso masivo por razones medioambientales o de salud pública, mientras que otras han demostrado ser poco aplicables a nivel de productor (Hristov et al., 2013; Darabighane et al., 2019).

Alternativas de interés nutricional y medioambiental son los microorganismos de alimentación directa (DFM) entre los cuales *Saccharomyces cerevisiae*, ha mostrado respuestas positivas, aunque variables sobre la estimulación de microbiota celulolítica y acetogénica, permitiendo una mayor digestibilidad de las dietas y menores producciones de CH_4 (Chaucheyras-Durand et al., 2008). Por su parte *Pleurotus ostreatus*, pertenece al grupo de hongos de pudrición blanca, el cual ha sido evaluado como posible pretratamiento de forrajes de baja calidad (altos en fibra) o residuos de alimentos para uso posterior en rumiantes, dada su actividad enzimática y tipo de crecimiento vegetativo. A pesar de que, la mayoría de los estudios se ha centrado en largos procesos de pretratamiento (hasta obtención de cuerpos fructíferos) y son escasos los reportes de parámetros de fermentación al ser incluido en dietas para rumiantes.

El presente trabajo de investigación aborda estrategias para minimizar el tiempo de pretratamiento de heno, en función de degradación del complejo lignocelulósico y actividad enzimática, la evaluación de este heno como ingrediente en dietas altas y bajas en fibras y la evaluación nuevamente del heno pretratado, pero en combinación con *S. cerevisiae* sobre parámetros de fermentación (principalmente desaparición *in vitro* de la materia seca, producción de CH_4, ácidos grasos de cadena corta) en condiciones *in vitro*, que acorten la brecha de conocimiento sobre el uso de estos aditivos y generen un punto de partida para estudios con rumiantes durante periodos mayores de tiempo.

II.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

IMPACTO DE RUMIANTES EN LOS GASES DE EFECTO INVERNADERO

El CH_4 es uno de los tres principales gases de efecto invernadero (GEI) que afectan la atmosfera terrestre (junto al dióxido de carbono (CO_2), óxido nitroso (N_2O) y otros) (Martin et al., 2010; Wang et al., 2012; Patra 2012a), con un potencial de calentamiento global 28 veces mayor que el CO_2 (Rooke et al., 2014; McAllister et al., 2015). Los rumiantes son una de las más grandes fuentes de emisiones de CH_4 (Rooke et al., 2014). De las emisiones globales de GEI el ganado vacuno genera 4,6 gigatoneladas de CO_2-eq por año, equivalente al 65% de las emisiones del área pecuaria, de los cuales, la producción de carne bovina tiene el primer lugar en intensidad de emisiones (volumen de GEI emitido por unidad de producto generado), con un promedio de más de 300 kg de CO_2-eq por kg de proteína, en segundo lugar está la producción de carne y leche de pequeños rumiantes, y en tercer lugar la producción de leche de vaca, con una intensidad de emisión promedio de 100 kg de CO_2-eq por kg de proteína comestible (Gerber et al., 2013). Adicionalmente, la producción de CH_4 representa pérdidas del 2 al 15% de la energía bruta consumida por el animal (Johnson and Johnson, 1995), por lo tanto, una disminución de las emisiones de CH_4 también afectará la eficiencia de producción del rumiante (Wang et al., 2012; Rooke et al., 2014).

Las emisiones de CH_4 de los rumiantes provienen principalmente de la fermentación entérica (87% desde el rumen, 13% desde el intestino grueso), pero también de su estiércol (Cobellis et al., 2016). De las emisiones globales de rumiantes el 39,1% lo representa el CH_4 entérico y el 4,3% CH_4 emitido por manejo de estiércol (Gerber et al., 2013). La variación en la producción entérica de CH_4 de los rumiantes depende de los carbohidratos de la dieta fermentados en el rumen y los mecanismos que regulan la disponibilidad de hidrógenos para la producción de CH_4.

FERMENTACIÓN RUMINAL Y PRODUCCIÓN DE METANO

El rumen es un complejo ecosistema donde los nutrientes son digeridos anaeróbicamente por la acción fermentativa de microorganismos (bacterias, protozoos y hongos) (Tabla 1). La clasificación más usual de las poblaciones microbianas es por sustrato empleado y productos finales de su fermentación (Relling y Mattioli, 2003; Cobellis et al., 2016) (Tabla 2). Esta clasificación no es excluyente, sino que una misma especie bacteriana puede cumplir más de una función metabólica, y su actuar depende de las condiciones predominantes del rumen (Tabla 3).

Rumiantes y microorganismos han evolucionado juntos, ocupando un nicho basado en la transformación de carbohidratos complejos de las plantas a energía, beneficiando al rumiante hospedero y a los microorganismos (Knapp et al., 2014), donde el primero aporta nutrientes y condiciones óptimas para fermentación, mientras que los microorganismos aportan energía, a la forma de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) principalmente ácido acético, ácido propiónico y ácido butírico, junto a glucosa, proteínas y vitaminas en esta relación de simbiontes (Mould et al., 2005; Cobellis et al., 2016; Nagaraja, 2016), a lo que se suma la biomasa microbiana propiamentetal, la cual también es utilizada por los rumiantes (Castillo-González et al., 2014) (Figura 1). En el rumen, el 90% de las hexosas consumidas son metabolizadas a piruvato por vía glucolítica, mientras que otras moléculas de pentosas utilizan la ruta de las pentosas (Ungerfeld, 2020). A partir del piruvato se forman metabolitos finales como el acetato, propionato y butirato.

Desde el punto de vista metabólico, la principal fuente energética del rumiante son los AGCC antes mencionados, cuya metabolización incluye gluconeogénesis y el uso de ácido acético y ácido butírico. (Relling y Mattioli, 2003), mientras que el nitrógeno amoniacal (N-NH_3) es la fuente esencial de nitrógeno para la síntesis de proteína microbiana (Khampa and Wanapat, 2007).

Este proceso de digestión fermentativa depende del normal desarrollo de los microorganismos para lo cual se deben conjugar: aporte de nutrientes, anaerobiosis, pH, presión osmótica, temperatura, acceso de los microrganismos al alimento y eliminación de los productos de desecho del sistema (Relling y Mattioli, 2003; Khampa and Wanapat, 2007).

Tabla 1 Tipos de microorganismos ruminales.

Tipo	Dominio	Número	Porcentaje de masa microbiana
Bacteria	Eubacteria	10^9-10^{11}	40-90
Metanógenos	Archaea	10^5-10^8	2-4
Protozoos	Eukarya		0-60
Flagelados		10^2-10^3	
Ciliados		10^4-10^6	
Hongos	Eukarya	-	10
Bacteriófagos	-	10^{11}-10^{12}	-

Fuente: Nagaraja (2016).

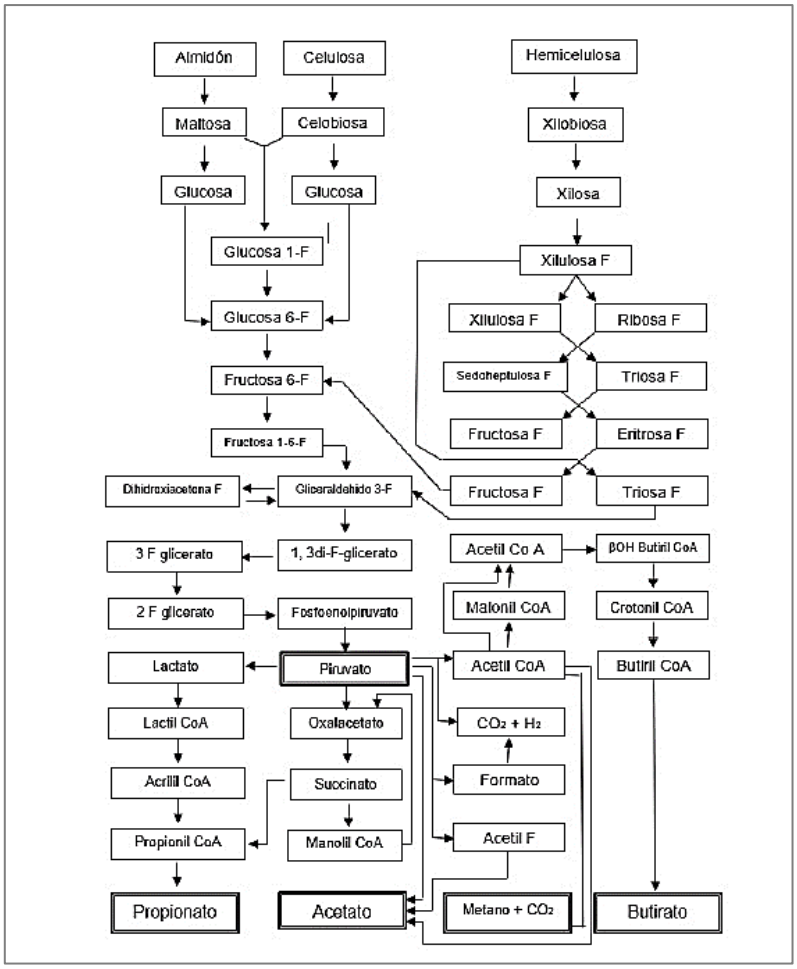


Figura 1. Rutas metabólicas implicadas en la fermentación ruminal de carbohidratos (Fuente: Ábrego-García 2021c).

Tabla 2 Clasificación funcional de las bacterias ruminales.

Grupo	Sustrato	Principales productos finales
Celulolíticas	Fermentan la pared celular	Principalmente Acetato
Amilolíticas	Fermentan Carbohidratos de reserva	Principalmente Propionato
Sacarolíticas	Fermentan Carbohidratos simples	Principalmente Butirato
Lactolíticas	Metabolizan lactato	Principalmente Propionato
Lipolíticas	Metabolizan grasas	Principalmente Propionato
Proteolíticas	Degradan proteínas	AGCC y N-NH_3
Ureolíticas	Hidrolizan urea	CO_2 y NH_3

Fuente: Relling y Mattioli (2003).

Tabla 3 Características de las bacterias y arqueas predominantes en el rumen.

Sustrato primario	Especie	Productos
Celulosa	*Fibrobacter succinogenes*	Succinato, Formiato, Acetato
Celulosa	*Ruminococcus albus*	Acetato, Formiato, Etanol, H_2 y CO_2
Celulosa	*Ruminococcus flavefaciens*	Succinato, Formiato, Acetato, H_2
Celulosa, hemicelulosa, Almidón, pectina, azucares	*Butyrivibrio fibrisolvens*	Acetato, formiato, lactato, butirato, H_2 y CO_2
Almidón	*Ruminobacter amylophilus*	Succinato, Formiato, Acetato
Almidón	*Succinomonas amylolytica*	Succinato, Acetato, Propionato
Almidón, azúcar	*Streptococcus bovis*	Lactato, Acetato, Formiato, Etanol
Almidón, hemicelulosa, pectina, β glucanos, proteína	*Prevotella sp*	Succinato, Aminoácidos, Formiato, Propionato
Maltrodextrinas	*Succinivibrio dextrinosolvens*	Succinato, Acetato, Formiato, Lactato
Azúcares, almidón, lactato	*Selenomonas ruminantium*	Lactato, Acetato, Propionato, Butirato, H_2
Maltrodextrina, azucares	*Eubacterium ruminantium*	Acetato, Formiato, Butirato, Lactato y CO_2
Lactato, maltrodextrina, aminoácidos	*Megasphaera elsdenii*	Propionato, Acetato, Butirato, valerato, coproato, H_2 y CO_2
Pectina, azucares	*Lachnospira multiparus*	Lactato, Acetato, Formiato, H_2 y CO_2
Glicerol, lactato	*Anaerovibrio lipolytica*	Acetato, Succinato, Propionato
Péptidos, aminoácidos	*Peptostreptococcus anaerobius*	Cadena ramificada, Acetato
Aminoácidos, péptidos	*Clostridium aminophilum*	Acetato, Butirato
Péptidos, aminoácidos	*Clostridium sticklandii*	Acetato, Cadena ramificada, Butirato, Propionato
Malato, formiato	*Wolinella succinogenes*	Succinato
H_2, CO_2, formiato	*Methanobrevibacter ruminantium*	CH_4

Fuente: Russel (2002)

Metanogénesis ruminal

Al ser el ambiente ruminal fuertemente anaeróbico, los microorganismos sólo disponen de la vía glucolítica como fuente de piruvato y posteriormente generar AGCC (principalmente acetato, propionato y butirato), ATP y NADH + H^+. El ATP es la fuente energética, mientras que los AGCC representan desechos a eliminar para la microbiota ruminal. Para poder degradar una segunda molécula de glucosa por la vía glucolítica necesitarán que el cofactor que se ha reducido (NADH + H^+) sea nuevamente oxidado (NAD+) (Castillo-González et al., 2014). Debido a que no existe una cadena respiratoria que acepte estos hidrógenos, los microrganismos los transfieren a distintos aceptores de hidrógeno (Ungerfeld, 2020). Estos sumideros corresponden a un producto final reducido de la fermentación, cuya vía de formación implica reacciones que incorporan hidrógeno metabólico [H] (Ungerfeld, 2020). Uno de los más importantes aceptores es el CO_2, originando la formación de metano (CH_4) (Rooke et al., 2014; Castillo-González et al., 2014; Ungerfeld, 2020).

Dependiendo del AGCC producido, cada vía metabólica produce un balance diferente de pares equivalentes reductores, según las siguientes ecuaciones:

a) $\text{Glucosa} \rightarrow 2\ \text{acetatos} + 2\ \text{CO}_2 + 4H_2$
b) $\text{Glucosa} \rightarrow \text{butirato} + 2\ \text{CO}_2 + 2H_2$
c) $\text{Glucosa} + 2H_2 \rightarrow 2\ \text{propionatos} + 2\ \text{H}_2\text{O}$

La producción de acetato a partir del piruvato es la ruta predominante del rumen, pero también se puede formar fosfato de acetilo (como producto intermediario), formiato, H_2 y CO_2. El propionato se puede obtener del piruvato o del lactato, pero es más común del succinato. El butirato es cuantitativamente el AGCC de menor proporción, y se sintetiza del acetato o del piruvato (Van Houtert, 1993).

Por cada 4[2H] producidos (tomados de 4NADH + H^+ que deben oxidarse) se forma una molécula de CH_4. La reacción general de metanogénesis se presenta a continuación (Martin et al., 2010; Patra, 2012a): $4H_2 + CO_2 = CH_{4.} + 2H_2O; \ldots \Delta G^{\circ\prime} = -135{,}6kj/mol.$

Por lo tanto, la metanogénesis es esencial para mantener bajas las concentraciones de hidrógeno (10^{-6}-10^{-7} mol/dm^3) (Martin et al., 2010; Bodas et al., 2012) y como se mencionó anteriormente, permitir que una segunda molecula de glucosa sea degradada.

La ruta metanogénica de reducción de CO_2 a CH_4, requiere la activación de CO_2 mendiante la enzima metanofurano (MF) y oxidación de ferredoxina, mientras que en la última reacción ocurre la reducción del grupo metilo de CH_3-SCoM a CH_4, utilizando HS-CoB como donador de electrones. (Figura 2) (Ferry, 2011; Ábrego-García 2021c).

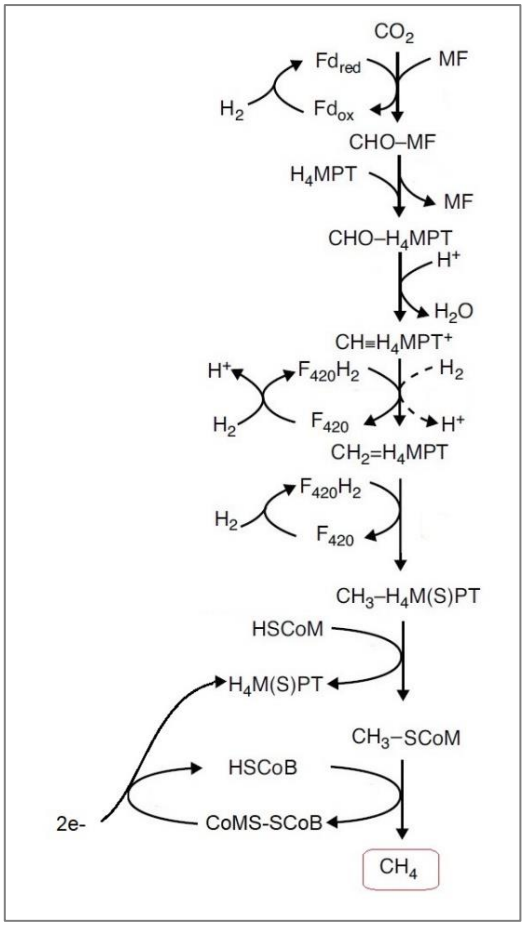


Figura 2 Ruta metanogénica a partir de la reducción de CO_2 con H_2. Fuentes: Ferry (2011); Ábrego-García (2021c). Fd, ferredoxina; MF, metanofurano; CHO-MF, formilmetanofurano; H_4MPT, tetrahidrometanopterina; CH=H_4MPT, metil tetrahidrometanopterina; F420, coenzima F420; CH_2=H_4MPT, metil tetrahidrosarcinopterina deshidrogenasa; CH_3-H_4M(S)PT, metil transferasa; HSCoM, coenzima M; H_4M(S)PT, tetrahidrosarcinopterina; CH_3-SCoM, metil coenzima M; HSCoB, coenzima B; CoMS-SCoB, reducción del disulfuro de la coenzima M y la coenzima B.

Además, son requeridas tres coenzimas claves: Coenzima F420 (involucrada en la transferencia de electrones), Coenzima M (involucrada en la transferencia de grupos metilos) y coenzima B (involucrada en la reacción final de la vía).

La cantidad de CH_4 producido es determinada por varios factores, incluyendo tipo de dieta, abundancia y tipo de bacterias, protozoos y metanógenos presentes, la interacción entre los diferentes grupos y su estatus metabólico (Cobellis et al., 2016).

La formación de CH_4 será mayor con la producción de acetato, menor con la producción de

butirato y en cambio se consumirá hidrógeno metabólico durante la síntesis de propionato (Relling y Mattioli, 2003; Martin et al., 2010). Así es de consenso general, que la formación de propionato compite con la metanogénesis por el hidrógeno. De tal forma, alimentos que favorecen la producción de propionato son usualmente asociados con una disminución de la producción entérica de CH_4 (Moss et al., 2000; Ávila-Stago et al., 2014).

Los microorganismos metanógenos, corresponden al grupo de las arqueas metanogénicas anaeróbicas, los que capturan los hidrógenos producidos por bacterias, hongos y protozoos ciliados durante la fermentación, utilizándolos como fuente de energía para su crecimiento junto al formato y otros sustratos (Tabla 4), usando los electrones para realizar una reducción bioquímica del CO_2 a CH_4 (Bodas et al., 2012; Nagaraja, 2016; Wallace et al., 2017).

Tabla 4 Sustratos para metanogénesis en el rumen.

Sustrato		Reacciones
Principal		
	H_2 y CO_2	$4H_2 + CO_2 \rightarrow CH_4 + 2H_2O$
	Formato	$4HCOOH \rightarrow CH_4 + 3CO_2 + 2H_20$
Menor*		
	Metanol	$4CH_3OH \rightarrow 3CH_4 + CO_2 + 2H_2O$
	Metilamina	$4CH_3NH_2Cl + 2H_2O \rightarrow 3CH_4 + CO_2 + 4NH_4Cl$
	Dimetilamina	$2(CH_3)_2NHCl + 2H_20 \rightarrow 3CH_4 + CO_2 + 2NH_4Cl$
	Trimetilamina	$4(CH_3)_3NHCl + 2H_20 \rightarrow 3CH_4 + CO_2 + 2NH_4Cl$
	Acetato	$CH_3COOH \rightarrow CH_4 + CO_2$

* Sintesis de CH_4 a traves de ruta metilotrófica o a partir de acetato. Fuente: Nagaraja (2016).

En la naturaleza, han sido identificados 28 géneros y 113 especies de metanógenos ruminales, pero solo 6 géneros y 8 especies han sido cultivadas desde el rumen (Cobellis et al., 2016; Patra et al., 2017). En el rumen de animales de producción, la mayoría de los metanógenos pertenecen a los géneros *Methanobrevibacter* y en menor proporción *Methanosaricina* (Tabla 3). Las especies prevalentes encontradas incluyen: *Methanobacterium formicicum, Methanobrevibacter ruminantium, Methanobacterium bryanti, Methanobrevibacter gottschalkii, Methanosaricina barkeri, Methanosaricina mazei, Methanobrevibacter smithii, Methanobrevibacter millerae, Methanobrevibacter olleyae, Methanomicrobium mobile, Methanosarcina barkeri* y *Methanoculleus olentangyi* (Patra, 2012a; Cobellis et al., 2016; Nagaraja, 2016). Las arqueas se encuentran libres en el fluido ruminal, adheridas a partículas de alimento, adheridas a los protozoos o adheridas al

epitelio ruminal (Patra, 2012a). Una pequeña porción de metanogenos ruminales son endo o ectosimbiontes (Patra et al., 2017). Cabe señalar que la mayoría de los metanógenos de "vida libre" en realidad están integrados en la biopelícula en la superficie de las partículas del alimento, donde las bacterias productoras de H_2 lo producen activamente (Leng, 2014). Al estar protegidos por la biopelícula, es posible que estos metanógenos no se inhiban tanto como sus pares de vida libre por acción antimetanogénica de algún compuesto (Patra et al., 2017). La población de arqueas dentro del rumen varía desde 10^7 a 10^9 células/ml de licor ruminal, dependiendo principalmente del contenido de fibra de la dieta (Cobellis et al., 2016).

ESTRATEGIAS NUTRICIONALES PARA MEJORAR LA FERMENTACIÓN RUMINAL Y MITIGACIÓN DE EMISIONES DE METANO.

Desde la perspectiva metabólica hay tres posibles enfoques para reducir la producción de CH_4 de los rumiantes: a) inhibir directamente la metanogénesis, b) reducir la producción de hidrógeno, y c) proporcionar vías alternativas para el uso de hidrógeno en el rumen (Martin et al., 2010; Patra, 2012a), mientras que desde la perspectiva de manejo estas se traducen en: 1) alimentos, manejo de dieta y nutrición, 2) modificadores del funcionamiento del rumen (Knapp et al., 2014).

Un grupo importante de compuestos con potencial efecto sobre las emisiones de metano, son los “Sumideros alternativos de hidrógeno” estos son compuestos con un potencial redox mayor que el CO_2 que pueden superar termodinámicamente al CO_2 para reducir los equivalentes producidos durante la fermentación ruminal. Estos compuestos, por lo tanto, se pueden usar como aceptores de electrones alternativos para redirigir el flujo de estos fuera de la metanogénesis (Patra et al., 2017). Dentro de estos algunos ejemplos son nitratos y sulfatos (son más eficientes que el CO_2 como aceptores de electrones), nitrocompuestos orgánicos (pueden actuar como aceptores de electrones o inhibiendo la via metabolica de reducción de CO_2 a CH_4), potenciadores de propionato y butirato (malato, acrilato, oxaloacetato y fumarato pueden aceptar equivalentes reductores y, por lo tanto, H_2 estequiométricamente más bajo disponible para la producción de CH_4) (Patra et al., 2017), y ácidos orgánicos (por ejemplo ácido propionico, pueden actuar como sumideros de hidrógeno durante la biohidrogenación (Ungerfeld et al., 2003) o ser tóxicos para los metanógenos (Ungerfeld et al., 2004).

Como fue previamente mencionado, debido a que la producción de ácido acético libera hidrógenos y la producción de ácido propiónico los utiliza, las estrategias que aumentan la proporción de ácido propiónico en remplazo de acético están negativamente asociadas a la

producción entérica de CH_4 (Knapp et al., 2014). Por su parte, la biohidrogenación de ácidos grasos es también una alternativa como reservorio de hidrógenos para la metanogénesis (quedando asociada negativamente a CH_4), sin embargo, la síntesis de proteína microbiana desde la proteína de la dieta puede resultar en una incorporación de hidrógenos (Knapp et al., 2014). El uso de suplementos energéticos o proteicos podrían reducir las emisiones de CH_4 como resultado de la mejora en la eficiencia de fermentación. Por ejemplo, la inclusión de concentrados en las dietas aumenta la producción de propionato, que actúa como sumidero de H_2 (Patra, 2012a). Sin embargo, un enfoque integral que considere la microbiota ruminal, el animal y las dietas parece ser el mejor enfoque para encontrar una solución en el largo plazo para reducir las emisiones entéricas de CH_4 por rumiantes (Martin et al., 2010).

Varias estrategias nutricionales han sido evaluadas para mejorar la fermentación ruminal, y disminuir la producción de CH_4, apuntando a mejorar el rendimiento animal y la eficiencia de utilización de alimentos, modulando la fermentación a través de aditivos, dietas o mejorando genéticamente a los rumiantes. Algunos aditivos evaluados han sido probióticos, lípidos, ácidos orgánicos, enzimas, extractos vegetales (taninos, saponinas, aceites esenciales) (Martin et al., 2010; Cobelis et al., 2016), ionóforos (Patra, 2012a) y eliminación de protozoos (Martin et al., 2010).

Entre la mayoría de los aditivos investigados, la suplementación de lípidos es considerada la más efectiva forma de disminuir la metanogénesis ruminal en el corto plazo (Martin et al., 2010; Meale et al., 2012; Patra et al., 2017), siendo su inclusión en la dieta responsable de una menor fermentación de materia orgánica en el rumen y por lo tanto disminución de la producción de CH_4, junto a inhibición de metanógenos (Martin et al., 2010; Beauchemin et al., 2009). La suplementación con grasas hasta un 6% de la dieta (materia seca) puede mejorar la producción de leche y reducir considerablemente las emisiones de CH_4 (15%), pero las concentraciones más altas disminuyen la eficiencia de la producción debido a una reducción de la digestión y fermentación del alimento (Patra 2013). Más en detalle, los ácidos grasos de cadena media y los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) pueden disminuir la abundancia y las actividades metabólicas de los metanógenos del rumen y PUFA puede también inhibir directamente a los protozoos y cumplir funciones de sumidero de hidrógeno, mediante la biohidrogenación (Patra et al., 2017).

Metabolitos secundarios de plantas, tales como saponinas, taninos, flavonoides, compuestos organosulfurados y aceites escenciales, tienen acción antimicrobiana sobre varios tipos de microorganismos, y particularmente taninos y saponinas han mostrado

resultados positivos, aunque altamente variables en disminución de las emisiones de metano (Patra et al., 2017). Los taninos condensados incluidos en dosis bajas a moderadas han demostrado mejorar el rendimiento animal (ganancia de peso, producción de leche, índices reproductivos) y disminución de producción de CH_4, realizando esto último a través de una disminución de la digestión de fibra lo cual implica una disminución de la producción de H_2 (Tiemann et al., 2008) o directa inhibición de metanógenos (Tavendale et al., 2005; Beauchemin et al., 2009; Patra et al., 2017). Sobre el uso de saponinas, se ha propuesto como supresor de la producción de CH_4 entérico, a través de disminución del número de protozoos y modificar los patrones de fermentación en el rumen (Beauchemin et al., 2009; Meale et al., 2012). La adición de aceites esenciales ha demostrado en estudios *in vitro* ser eficiente en mejorar la fermentación ruminal, aunque los estudios *in vivo* han sido cuestionados por las dosis requeridas para disminuir las emisiones de metano (Meale et al., 2012; Wang et al., 2012) y por la variabilidad de los resultados (Patra et al., 2017).
Dentro del grupo de inhibidores de bacterias que producen hidrógeno, los ionóforos (Meale et al., 2012) han sido cuestionados por su impacto en la salud animal, humana y medioambiental (Beauchemin et al., 2009), orientando las líneas de trabajo a aditivos más "amigables", o que representen una solución a otros problemas medioambientales, como los aditivos en base a microorganismos vivos (Paggi et al., 2004).

Microrganismos como suplementos alimenticios.

El uso de microrganismos vivos como aditivos alimenticios para rumiantes no es un concepto nuevo. Su uso se basa en observaciones empíricas que sugieren que algunos tipos de microorganismos en los alimentos pueden ser una influencia beneficiosa para el rendimiento animal en algunos sistemas de producción (Denev et al., 2007; Elghandour et al., 2015). El concepto original de administración de grandes cantidades de microorganismos durante periodos de estrés o enfermedad como probióticos hoy se restringe sólo a aquellos de demostrada capacidad de disminuir la mortalidad o mejorar la producción, mientras que es de acuerdo general el uso del término Microbios de Alimentación Directa (DFM Direct-Fed Microbials) para describir aditivos alimenticios, basados en microorganismos (Ghorbani et al., 2002; Denev et al., 2007; Elghandour et al., 2015; Puniya et al., 2015). Los DFM se definen como "microorganismos vivos y de origen natural que se utilizan para mejorar la función digestiva del ganado". De esta forma los DFM se multiplican en el rumen y modifican beneficiosamente el ecosistema microbiano y/o las características de la fermentación (Elghandour et al., 2015). En general, sus modos de acción se han atribuido a su capacidad de competir directamente con potenciales

patógenos, evitando su establecimiento, por producción de antimicrobianos o sustancias que limitan el crecimiento de patógenos, o a través del metabolismo de compuestos tóxicos (Denev et al., 2007). Diferentes tipos de DFM son usados en la producción animal, siendo clasificados en tres principales categorías: bacterianos, fúngico y la combinación de ambos, siendo los más comunes los bacterianos (Elghandour et al., 2015).

Microbios de Alimentación Directa (DFM) bacterianos para rumiantes.

Los organismos de este grupo pueden ser clasificados como bacterias productoras de ácido láctico (LAB), bacterias consumidoras de ácido láctico (LUB) y otros microrganismos. *Lactobacillus, Propionibacterium, Bifidobacterium, Enterococcus, Streptococcus*, y *Bacillus,* son microorganismos comúnmente usados como DFM para rumiantes, en adición con otras especies de bacterias distintas tales como *Megasphaera elsdenii* y *Prevotella bryantii* (Elghandour et al., 2015). El modo de acción de los DFM bacterianos depende de la dosificación, el momento y frecuencia de alimentación y la cepa utilizada, impactando en el rumen o en el tracto gastrointestinal. En general, los DFM bacterianos actúan a nivel ruminal previniendo la acidosis ruminal, estimulando a los microorganismos adaptados a la presencia de ácido láctico y estimulando a las LUB, y disminuyendo concentraciones de lactato. A nivel gastrointestinal, previenen el establecimiento de *Escherichia coli* y protegen contra *Salmonella* (Elghandour et al., 2015; Puniya et al., 2015). Sus efectos están relacionados a bacteriocina (proteínas o toxinas), exclusión competitiva o estimulación de LUB (McAllister et al., 2011).

Microbios de Alimentación Directa (DFM) fúngicos para rumiantes.

Los DFM fúngicos disponibles de forma más común son productos que contienen cultivos de levaduras vivas (LYC, por las siglas en ingles Live Yeast Cultures) de *Saccharomyces cerevisiare*, producto con *S. cerevisiae* y extractos de cultivos, pero que no garantizan, en la mayoría de los casos, organismos vivos y en base a *Aspergillus niger* y *A. oryzae* que tampoco aseguran el suministro de organismos vivos (Denev et al., 2007).

Sus modos de acción se basan mejoras en el uso de lactato (Puniya et al., 2015), y la consecuente estabilización del pH (Elghandour et al., 2014), remoción de oxígeno de la superficie de alimentos ingeridos (Newbold et al., 1996; Elghandour et al., 2015) y promover la microbiota celulolítica ruminal (Puniya et al., 2015).

En la actividad celulolítica de microorganismos del rumen, los DFM fúngicos, mejoran la digestión de la fibra, reducen la acumulación de lactato, reducen la concentración de oxígeno en el fluido ruminal, mejoran la utilización del almidón suministrado por la dieta y estimulan a las bacterias acetogénicas en presencia de metanógenos, lo cual resultaría en

una más eficiente fermentación ruminal (Denev et al., 2007).

Estos DFM fúngicos han sido usados en dietas de rumiantes para mejorar la productividad y normalizar la fermentación ruminal (Elghandour et al., 2015), con escasa selección de DFM orientados a disminuir la producción de CH_4, estos han sido escasamente evaluados respecto a sus efectos sobre este tema (Chaucheyras-Durand et al., 2008; Martin et al., 2010). Al respecto, los DFM podrían estar asociados con una disminución de las emisiones de CH_4 por alteración del proceso de fermentación (Jayasundara et al., 2016). Wallace and Newbold (1992) y Newbold et al. (1996), señalan que un incremento en el número de bacterias del rumen es el más reproducible efecto de la suplementación dietaria con cultivos fúngicos. Por otro lado, los cultivos suministran nutrientes que estimulan el crecimiento de ciertos microorganismos del rumen, por ejemplo, ácido málico y vitaminas.

Las bases fisiológicas de la mejora en el crecimiento microbiano por acción de cultivos de levaduras adicionales no están completamente descritas. Se han planteado hipótesis bioquímicas que lo explican tales como, suministro de nutrientes y cofactores nutricionales que estimulan la actividad microbiana, control de nivel de oxígeno en rumen, proporcionar sitio para cambios metabólicos y medio ambiente beneficioso para el crecimiento de microorganismos alrededor de los sustratos, liberación de péptidos que estimulan a las bacterias a iniciar el crecimiento. Esta última propuesta de estímulo bioquímico no ha sido asociada con un aminoácido individual y ocurre en concentraciones muy por debajo de las que sugerirían que ese compuesto es un nutriente limitante, en cambio parecen servir de desencadenantes metabólicos que estimulan a las bacterias ruminales beneficiosas a iniciar la fase de crecimiento exponencial. La evidencia sugiere que células de levadura metabólicamente activas, proporcionan una fuente continua de tales péptidos, y así aporta continuamente bajos niveles de estimulación de bacterias ruminales beneficiosas (Denev et al., 2007).

***Saccharomyces cerevisiae*.**

S. cerevisiae es una levadura anaeróbico facultativo, el cual puede metabolizar ácido láctico, alterando la población microbiana del rumen debido a su habilidad única para utilizar el oxígeno, tornando el medioambiente más adecuado para el crecimiento de bacterias anaeróbicas y aumentando las bacterias fibrolíticas (McAllister et al., 2011; Shurson, 2018).

En caso de presentar crecimiento aeróbico, la levadura obtiene 686 kcal de energía libre gracias a la siguiente reacción: 1 Glucosa + 6 O_2 = 6 CO_2 + 6 H_2O, mientras que realizando fermentación anaeróbica obtiene 54 kcal de energía libre con la siguiente

reacción: 1 Glucosa = 2 CO_2 + 2 Etanol (Curia et al., 2010). Durante la respiración aeróbica, el consumo oxidativo de la glucosa sigue tres grandes vías metabólicas: glucólisis, descarboxilación oxidativa del Piruvato y ciclo de Krebs, acoplados a fosforilación oxidativa implicará una generación neta de 32 ATP; 1 glucosa + 6 O_2 + 32 (ADP + Pi) → 6 CO_2 + 6 H_2O + 32 ATP. En ausencia de oxígeno, la glucosa sigue la vía glucolítica, pero el piruvato generado sufre reducción y posterior descarboxilación. Se generan 4 ATP, en glicolísis de los cuales 2 son utilizados en sinterizar dos moléculas de etanol; 1 Glucosa → 2 etanol + 2 ATP + 2 CO_2 (Cárcamo Behrens 20013).

Las "levaduras viables" más comunmente utilizada en la industria de alimentos para animales es la levadura seca activa (AAFCO - 96.2 Active Dry Yeast; IFN 7-05-524 - Yeast active dehydrated), que contiene aproximadamente un 95% de materia seca, la cual es considerada Microorganismo de Alimentación Directa (DFM, por sus siglas en ingles). Por otro lado, levadura seca (AAFCO – 96.1 Primary Dried Yeast or Dried Yeast; IFN 7-05-533 Yeast primary dehydrated), levadura seca de cerveza (AAFCO – 96.4 Brewers Dried Yeast; IFN 7-05-527 Yeast brewers dehydrated), levadura líquida de cerveza (AAFCO – 96.10 Brewers Liquid Yeast; IFN 7-20-878 Yeast brewers liquid), levadura seca Torula (AAFCO – 96.7 Torula Dried Yeast or Candida Dried Yeast; IFN 7-05-534 Yeast torula dehydrated) y levadura de suero, se consideran "productos nutricionales de levadura" porque consisten en biomasa de células muertas de levadura y se utilizan por su valor nutricional. En cambio "cultivos de levaduras" (AAFCO – 96.8 Yeast Culture; IFN 7-05-520 Yeast culture dehydrated) contienen una combinación de biomasa de levadura y metabolitos de fermentación y si bien contienen algunas células de levadura viables residuales, no son una fuente sustancial de biomasa de levadura (Shurson, 2018).

Las levaduras son una importante fuente de productos con actividad probiotica, ya sea como células vivas o productos derivados de sus paredes celulares (Suarez and Guevara, 2018). Mientras que, hay estudios en fermentación ruminal y rendimiento animal (Newbold et al., 1996; Newbold and Rode 2006; Bruno et al., 2009) la información sobre el efecto de cultivos probióticos de *S. cerevisiae* en la producción de CH_4 es escasa (Patra, 2012b), junto con presentar resultados dispares, desde la supresión o disminución de la formación de CH_4 (Mutsvangwa et al., 1992; Lynch and Martin, 2002), al incremento de este (Martin et al., 1989; Martin and Nisbet, 1990). Se ha demostrado en condiciones *in vivo,* que varios productos de levadura a base de *S. cerevisiae* afectan el consumo de materia seca, pH ruminal y digestibilidad de nutrientes (Bruno et al., 2009). Utilizando la cepa Yea-Sacc®1026 se ha demostrado que la suplementación ocasiona una mayor actividad celulolítica,

independiente de las proporciones forraje:concentrado de las dietas (Galip, 2006).

Estos resultados en la producción de CH_4 podrían ser debido a las diferencias de cepas entre cultivos de levaduras, la cepa, la dosis empleada, el tipo de dieta evaluada y las condiciones fisiológicas de los animales utilizados (Newbold and Rode, 2006; Patra 2012b; Jeyanathan et al., 2014), pero también a la falta de selección de cepas de *S. cerevisiaae* para disminuir las emisiones de CH_4. Patra (2012a) y Jeyanathan et al. (2014) indican que entre las líneas de investigación con *S. cerevisaie*, es de interés la selección de cepas probióticas para el efecto supresor de CH_4 en rumiantes.

Estrategia de biotratamiento de forrajes con hongos

1. **Hongos xilófagos.**

Hay dos principales divisiones de hongos xilófagos, la división Basidiomicota, (basidiomicetos) y Ascomiceta (ascomicetos). A partir de estos, existen tres tipos de básicos de pudrición, según la forma de ataque enzimático que realicen los hongos. Estas son: blanca, parda (marrón) y blanda (Madadi and Abbas, 2017). Los hongos causantes de pudrición blanca remueven la lignina antes o al mismo tiempo que la celulosa, dejando el residuo vegetal de color blanco, ya que la lignina es de color oscuro. La pudrición parda o marrón implica la eliminación de los componentes celulósicos, mientras que, en la pudrición blanda, los hongos realizan un ataque similar a la que ocurre en la pudrición parda, degradando preferentemente la celulosa, pero además se forman cavidades microscópicas en la pared secundaria celular (Luley, 2006; Sharma and Arora 2015; Madadi and Abbas, 2017).

Entre los medios biológicos para degradar la lignina, los hongos de pudrición blanca son considerados una alternativa económicamente factible y aceptable desde el punto de vista medioambiental (Khan et al., 2015). Estos hongos presentan como especial característica la capacidad de degradar lignina hasta su mineralización a CO_2 y agua gracias a la excreción de óxido reductasas, junto con transformar sustancias no fenólicas en fenólicas para su fácil degradación y obtención de sustancias de menor tamaño que la lignina. Estos hongos también degradan celulosa y hemicelulosa (Montoya et al., 2014). De esta forma tienen el potencial de descomponer los complejos de ligno-celulosa, y por lo tanto aumentar la disponibilidad de nutrientes para la fermentación microbiana en el rumen (Khan et al., 2015; Sharma and Arora, 2015).

Entre los hongos de pudrición blanca como potentes agentes productores de enzimas lignocelulolíticas, se encuentran especies de los géneros *Auricularia, Schizophyllum,*

Lentinus, Polyporus, Pycnoporus y *Trametes*. Especies de estos géneros como *Coriolus versicolor, Ganoderma lucidum, Ganoderma applanatum, Schizophyllum commune, Pycnoporus sanguieus, Pleurotus ostreatus, Grifola frondosa, Auricularia delicata, Trametes trogii* y *Lentinula edodes*, en la actualidad son reconocidas por su capacidad de degradación de celulosa y lignina (Montoya et al., 2014). Los hongos de pudrición blanca como *Pleurotus ostreatus* producen setas en los complejos de ligno- celulosa, modificando de esta forma los sustratos (Khan et al., 2015).

El metabolismo lignolítico, generalmente denominado sistema de degradación de lignina (SDL) es de acción estrictamente extracelular y en él interviene un grupo de hemoproteínas extracelulares denominadas enzimas peroxidasas, conocidas como ligno peroxidasas (LIP) (degrada las unidades no fenólicas de la lignina, Figura 3), manganeso peroxidasas (MnP) (oxidan las unidades fenólicas y no fenólicas de la lignina, Figura 4 (Martínez et al., 2005; Madadi and Abbas, 2017)), y peroxidasa versátil, un grupo enzimas productoras de H_2O_2 (glioxal oxidasa, aryl alcohol oxidasa, entre otras), un grupo de oxidasas (lacasas, Figura 5), alcohol veratrílico, manganeso y ácidos orgánicos como oxálico o malónico (Quintero 2011; Madadi and Abbas, 2017). El mecanismo del sistema degradador de lignina está basado en la producción de radicales libres (Dávila y Vázquez-Duhalt, 2006; Madadi and Abbas, 2017). Es importante mencionar que el alcohol, manganeso, alcohol veratrilico y los ácidos orgánicos cumplen la función de cofactores en el sistema de degradación de lignina, y son considerados esenciales para su actividad (Dávila y Vázquez-Duhalt, 2006) (Figura 6).

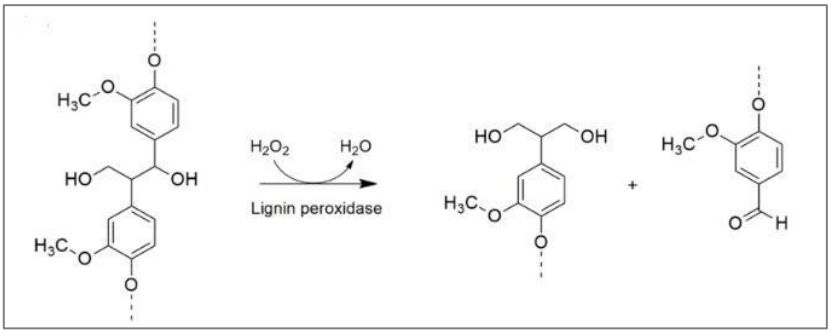


Figura 3. Reacción catalizada por el LiP de escisión C-C. Fuente: Kumla et al. (2020)

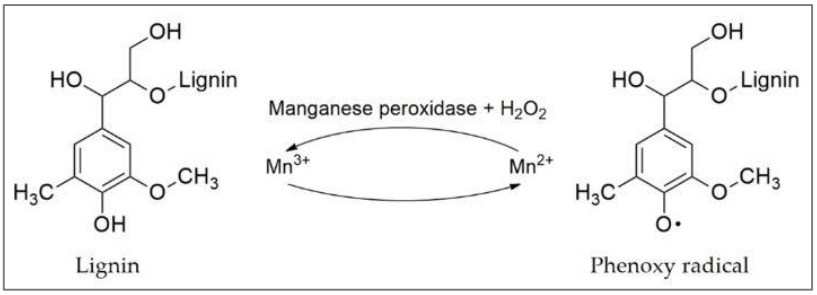


Figura 4. Despolimerización de la lignina con MnP. Fuente: Kumla et al. (2020)

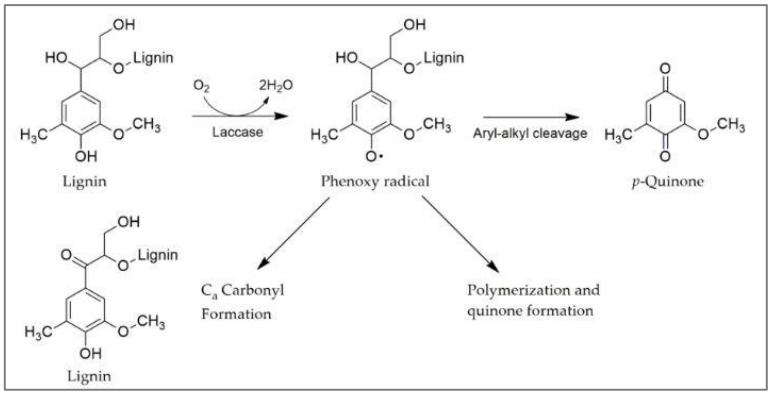


Figura 5. Reacción de la lacasa en la oxidación de fenoles. Fuente: Kumla et al. (2020)

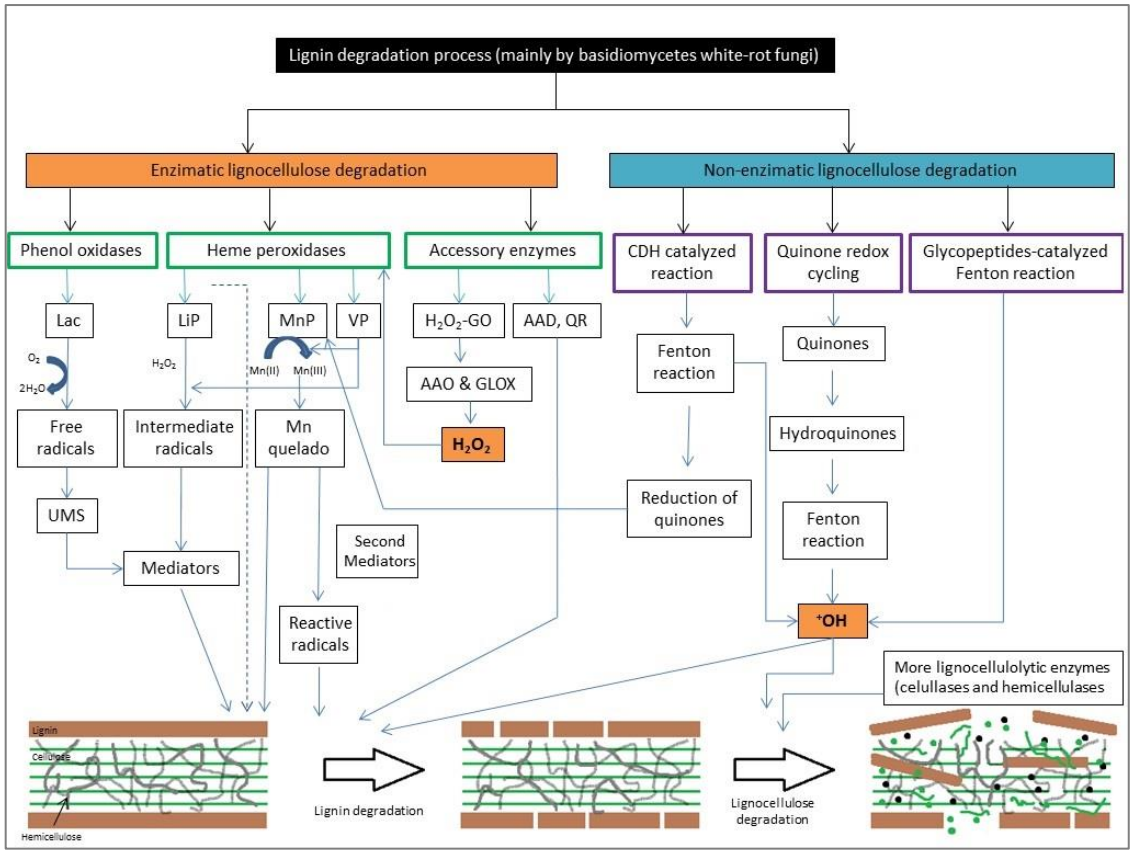


Figura 6. Diagrama de degradación de lignina mediante hongos blancos basidiomicetes. Fuente: Adaptado de Adebayo and Martínez-Carrera (2015). Lac: lacasa, LIP: lignina peroxidasa, MnP: Manganeso peroxidasa, VP: peroxidasa versátil, H_2O_2: generadora de H_2O_2 oxidasa, AAO: alcohol-aryl oxidasa, GLOX: glioxal oxidasa, H_2O_2: peróxido de hidrógeno, AAD: alcohol aryl deshidrogenasa, QR: quinona reductasa y $OH^{\cdot}$: radicales hidroxilos libres.

Estos hongos producen enzimas que degradan o modifican la lignina (Bugg et al., 2011) sólo durante su estado de crecimiento vegetativo, mientras que en estado de fructificación o reproductivo el complejo enzimático cambia a degradación de hemicelulosa, siendo importante en su uso como pretratamiento de alimentos para rumiantes, detener el proceso antes de la fase reproductiva. Por lo tanto, la efectividad del tratamiento con hongos depende de las características bioquímicas del sustrato, la cepa de hongo utilizada y la duración del tratamiento (Khan et al., 2015).

2. Pleurotus ostreatus

El género *Pleurotus* (Familia Pleurotaceae, Basidiomycetes) es uno de los hongos comestibles mas estudiados debido a sus propiedades nutricionales, antiinflamatorias,

antioxidantes, antidiabéticas, antitumorales e inmunoestimuladoras. Estas propiedades están moduladas por polisacáridos y proteínas del hongo, así como metabolitos del mismo. Bajo condiciones ambientales naturales o en cultivo, los hongos toman nutrientes que se destinan al metabolismo primario del hongo (fuente de energía para producir proteínas, lípidos y ácidos nucleicos), que permite el continuo crecimiento y producción de biomasa. Mientras que, los metabolitos secundarios son estructuralmente heterogéneos, con bajo peso molecular y no garantizan el crecimiento del hongo (Figura 7).

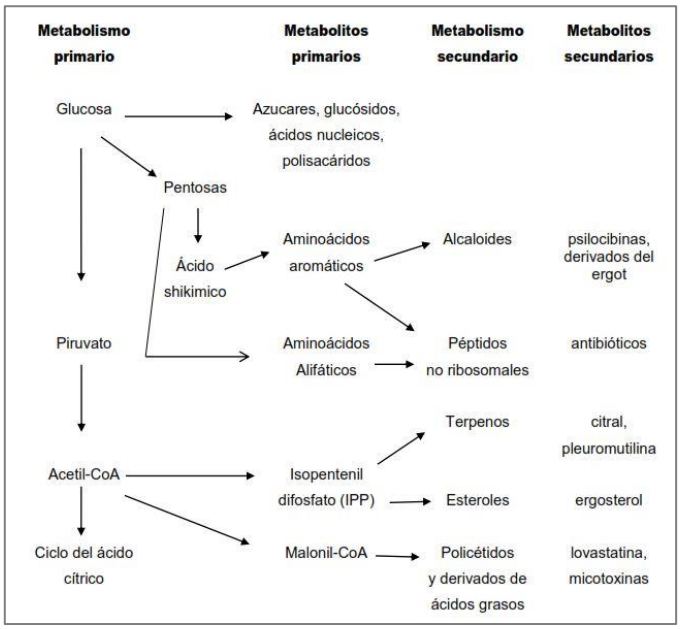


Figura 7. Relación entre el metabolismo primario y secundario de hongo *P. ostreatus*. Fuente: Juárez-Pacheco (2013).

La característica más importante de los metabolitos secundarios es su restringida distribución en la naturaleza, en algunos casos limitándose a especies o subespecies únicas (Juárez-Pacheco, 2013).

De distribución mundial, se estima que el género incluye más de 200 especies (Rodrigues-Barbosa et al., 2020). *Pleurotus spp*. puede colonizar una amplia variedad de sustratos lignocelulósicos (Martinez et al., 2015), sin comprometer la celulosa y hemicelulosa (como otros hongos (Tuyen et al., 2013)) debido a la producción de enzimas lacasas (EC 1.10.3.2), manganeso peroxidasa (EC 1.11.1.13), amilasa, celulasa, pectinasa, proteasas y peroxidasa (Bugg et al., 2011), especialmente lignina peroxidasa (EC 1.11.10.14) (Adebayo and Martínez-Carrera, 2015), realizando así una bioconversión que mejora el aporte nutricional de estos materiales cuando se incluyen en las dietas de los rumiantes, lo que los

convierte en los hongos preferidos para mejorar la calidad de los piensos (Shrivastava et al., 2011). En este sentido, la bioconversión de residuos lignocelulósicos utilizando *Pleurotus ostreatus* (Jacq. ex Fr.) P. Kumm, ha generado resultados positivos en subproductos destinados a la alimentación animal (Have and Teunissen 2001; Martinez et al., 2015). A diferencia de la aplicación directa de enzimas lignolíticas, que tienen un precio elevado, lo que descarta su uso masivo como estrategia para la degradación de la lignina en productos de alimentación animal (Janusz et al., 2017). Ábrego-Garcia et al. (2021a) señala que, en Estados Unidos, el precio de venta de la enzima pura puede alcanzar los 7,5 dólares por gramo de lovastatina de grado industrial (Sigma-Aldrich, Toluca, México). En este aspecto, la fermentación en estado sólido (SSF) de los residuos agrícolas puede ser una alternativa atractiva para la producción de lovastatina porque el precio equivalente podría ser tan bajo como 1/20 de la lovastatina comercial.

Van Kuijk et al. (2015) en un metanálisis, resumen las especies de hongos y los sustratos usados para degradar lignina en la biomasa para la nutrición animal, señalando el uso de *Pleurotus sp.* sobre sustratos de: hojas de palma aceitera, trigo, arroz, maíz, caña de azúcar, abedul, jacinto de agua, coco y picea.

Evaluaciones del potencial de *P. ostreatus* para descomponer lignina y mejorar la degradabilidad ruminal de rastrojos (paja de trigo, paja de arroz, rastrojo de maíz y mezclas de estos residuos) con incubaciones por periodos de 0 a 42 días, han aumentado significativamente la disponibilidad de proteína cruda y disminución de FDN, FDA, lignina detergente ácido, hemicelulosa y celulosa en todos los residuos evaluados, contribuyendo a mayor degradabilidad ruminal, pero también pérdidas de materia seca y carbohidratos (Khan et al., 2015; Zuo et al., 2018). Chen et al. (2017), evaluaron la aptitud de *P. ostreatus* para deslignificar rastrojo de maíz, realizando una incubación de 30 días, determinando que finalizado ese periodo un 57,05% de la lignina ácido soluble había sido degradada. El uso de extracto enzimático de *P. ostreatus* en ensayos *in vivo* en cabras de lechería por 45 días experimentales han demostrado aumentos de ganancias de peso y producción, sin alteraciones del consumo de dieta (Trejo-López et al., 2017).

Los estudios revisados contemplan la realización de largas incubaciones, llegando a realizar una o dos cosechas de cuerpos fructuferos antes de evaluar el sustrato para alimentación de rumiantes, implicando en tales casos, un agotamiento de los sustratos por parte del hongo, el cual, durante su etapa de fructificación, cambia el patrón de producción de enzimas, aumentando la producción de celulasas y hemicelulasas, no planteando el uso del sustrato con micelios de *Pleurotus* sp. en fase de producción de enzimas activa, lo cual

podría suponer acortar las incubaciones con sustratos.

Dentro de los metabolitos secundarios generados por *P. ostreatus* destacan las "Estatinas", grupo de moléculas detectadas en los cuerpos fructíferos del hongo, así como en productos de sus procesos fermentativos (Alarcón et al., 2003). Las estatinas, en conjunto realizan inhibición de 3-hidroxi-3-metil glutaril coenzima A (HMG-CoA) redutasa. Estos compuestos son fuente de lovastatina, la cual estimula los receptores del hígado para reducir el nivel de colesterol en la sangre (Ayala Sánchez et al., 2016). La lovastatina es también efectiva para prevenir la inflamación asociada a la pancreatitis y detener la evolución de la fibrogénesis (Talukdar &Tandon 2008). Las arqueas del rumen, los principales microorganismos responsables de la producción de CH_4 tienen membranas lipídicas con moléculas de glicerol unidas a alcoholes isoprenoides de cadena larga a través de enlaces éter (Miller and Wolin, 2001; Wolin and Miller, 2006; Jain et al., 2014; Ábrego-García et al., 2021b). Estas membranas requieren para su síntesis mevalonato, que se forma a través de la reducción del hidroximetilglutaril - Coenzima A (HMG - CoA), mediada por la acción de la enzima HMG - CoA reductasa (Miller and Wolin 2001; Wolin and Miller 2006; Jahromi et al., 2013; Ábrego-García et al., 2021b). La actividad de esta enzima es inhibida por las estatinas, como la lovastatina que es metabolito secundario de hongos como *Aspergillus terreus*, *Monascus ruber*, *Penicillum brevicumpactum* y *Pleurotus ostreatus* (Alarcón et al., 2006; Alarcón and Águila, 2006). Por lo tanto, la presencia de lovastatina en los medios de crecimiento de *P. ostreatus* podría inhibir la formación de membranas de las arqueas metanogénicas sin afectar a las eubacterias del rumen, ya que la mayoría de sus lípidos son ésteres de glicerol de ácidos grasos de cadena larga (Smit and Mushegian, 2000; Wolin and Miller, 2006; Faseleh-Jahromi et al., 2013). Esto abre la posibilidad de disminuir las emisiones de CH_4, alterando la actividad de la comunidad de arqueas metanogenicas.

Los antecedentes expuestos establecen interrogantes sobre los posibles efectos de la incorporación de hongos de pudrición blanca como *Pleurotus* sp. (o sus enzimas) en la dinámica de fermentación ruminal como medio de liberación de nutrientes, en conjunto con *Saccharomyces* sp. con efecto modulador positivo del funcionamiento ruminal. Además, la inclusión del medio de crecimiento de *P. ostreatus* representaría una alternativa para incorporar estatinas al rumen, afectando la producción de CH_4. La inclusión de aditivos para mejorar la fermentación ruminal, que desarrollen distintas funciones a distintos tiempos en el rumen, se enmarcaría dentro de las líneas de nutrición de precisión, manteniendo los ingredientes dietarios y la selección animal como factores constantes para la ganadería.

III.- HIPÓTESIS

El uso combinado de heno pretratado con *Pleurotus ostreatus* en combinación con *Saccharomyces cerevisiae* mejora la desaparición *in vitro* de materia seca incubada y disminuir las emisiones de metano.

Objetivo general

Evaluar en dietas altas en forrajes los efectos del uso de heno pretratado con *Pleurotus ostreatus* en combinación con *Saccharomyces cerevisiae* como aditivo, sobre los parámetros de fermentación ruminal, y desaparición de materia seca, en condiciones *in vitro*.

Objetivos específicos

1. Desarrollar procedimiento para pretratamiento de heno de ballica-festuca con *P. ostreatus* para mejorar su calidad nutricional como alimento de rumiantes
2. Determinar dosis de inclusión de heno pretratado en dietas altas y bajas en fibra y, evaluar su efecto en parámetros de fermentación ruminal *in vitro.*
3. Evaluar parámetros de fermentación ruminal *in vitro* de dieta alta en fibra con inclusión de heno pretratado y dos tipos de cepas de *S. cerevisiae*.

IV.- EXPERIMENTOS

No existen referencias respecto a las concentraciones de heno pretratado con *P. ostreatus*, en la dinámica de fermentación ruminal en dietas, y los efectos de *S. cerevisiae* son variables dependiendo de las dosis, las dietas, y el sistema de incubación. Por estas razones se planteó el objetivo de establecer las concentraciones más idóneas para el uso de estos, a través de actividades de incubación en sistema batch, de los cuales se desprenda información de las modificaciones de los parámetros de fermentación ruminal.

Experimento 1. Obtención de heno biodegradado con *Pleurotus ostreatus*, para utilización en fermentaciones ruminales *in vitro*.

Todas las fases del experimento se realizaron en el Laboratorio de Síntesis y Biotransformación de Productos Naturales, Dpto. Ciencias Básicas, Universidad del Bío-Bío, Chillán, Chile.

a) Materiales y Métodos

Material biológico.

Se seleccionó una cepa de *P. ostreatus* 136UBB, perteneciente a la colección de Macromicetos de la Universidad del Bío-Bío (Chillán, Chile) por su alta estabilidad. El origen de estas cepas son cuerpos fructíferos recolectados en el año 2001, sobre arboles del género *Nothofagus* sp., ubicados en bosques de las regiones de la Araucanía, Bío Bío, Ñuble y Maule (zona sur y central de Chile). La cepa se mantuvo bajo refrigeración (4 °C), en un sistema de siembra en tubo inclinado con agar papa dextrosa (Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Alemania).

Activación del crecimiento de *P. ostreatus*

Los tubos de cepas representativas se incubaron durante 24 h a 30 °C en la oscuridad (incubadora de calentamiento DHP-9052), para promover la activación del micelio (Hoa and Wang, 2015).

Cultivo en placas

Se tomó una muestra de micelio (1 cm^2) y se colocó en el centro de placas Petri con medio de cultivo PDA (en condiciones asépticas, bajo campana de flujo de aire laminar), y posteriormente se incubó a 30 °C en la oscuridad, hasta el crecimiento completo del micelio dentro de la placa (Hoa and Wang, 2015; Alarcón et al., 2003).

Fermentación sumergida

Las muestras de micelio en crecimiento activo se extrajeron de placas Petri, para ser sembradas en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 150 mL de medio de cultivo Hagen, que contiene (g/L) $CaCl_2$ 0,044, KH_2PO_4 0,025, $(NH_4)_2HPO_4$ 0,25, $MgSO_4$ x $7H_2O$ 0,15, $FeCl_2$ x 6 H_2O 0,022, extracto de malta 3,0 y glucosa 10,0 (Alarcón et al., 2003). La fermentación se realizó bajo agitación (150 rpm) y a temperatura ambiente, durante 25 días (Hong et al., 2012), hasta la completa colonización de los frascos por la biomasa fúngica (González-Caloch et al., 2015).

Sustrato para la fermentación en estado sólido

El heno de ryegrass (*Lolium perenne*) con festuca (*Festuca arundinacea*) cosechado en la temporada 2016, fue molido con un tamiz de 2 mm (Grain Mill, Breuer, Temuco, Chile). Luego, el heno molido fue esterilizado en autoclave (Esterilizador de vapor tipo vertical, modelo HL-340) a una temperatura de 121 °C, presión de 120 W/KA, en un ciclo de 15 minutos (Rahman et al., 2011). Posteriormente, el heno se secó a 50 °C durante 48 h.

Fermentación en estado sólido (SSF)

Esta etapa se llevó a cabo en 48 matraces Erlenmeyer (250 mL) con 50 ml de medio de Hagen, sustrato vegetal (5%) y el trozo de micelio (1,15 ± 0,20 g de peso seco, contenido en 100 mL de medio de Hagen de la fermentación sumergida). Los frascos se incubaron inmediatamente a 30 °C en la oscuridad durante 21 días, en condiciones estacionarias (Akpinar and Urek, 2012; Akinfemi and Ogunwole, 2012). Se ha establecido que en estas condiciones *P. ostreatus* alcanza la plena colonización del sustrato (Ardón, 2007) (Figura 8).

Obtención de crudo enzimático (CE) a partir de la fermentación sumergida

Las muestras de la biomasa contenida en los frascos procedentes de la fermentación sumergida, se analizaron de acuerdo con la siguiente metodología. Brevemente, 1 g de la mezcla de biomasa (micelio y medio de Hagen) se molió con 10 mL de tampón acetato (pH 4,5) en arena, se filtró (papel de filtro Whatman N° 1) y centrifugó a 5000 rpm a 4 °C durante 20 minutos. El sobrenadante se retiró y almacenó a -80 °C hasta la determinación de la actividad enzimática (entre 3 y 5 días) (Chan-Cupul et al., 2016; Akpinar and Urek, 2012; Ardón, 2007).

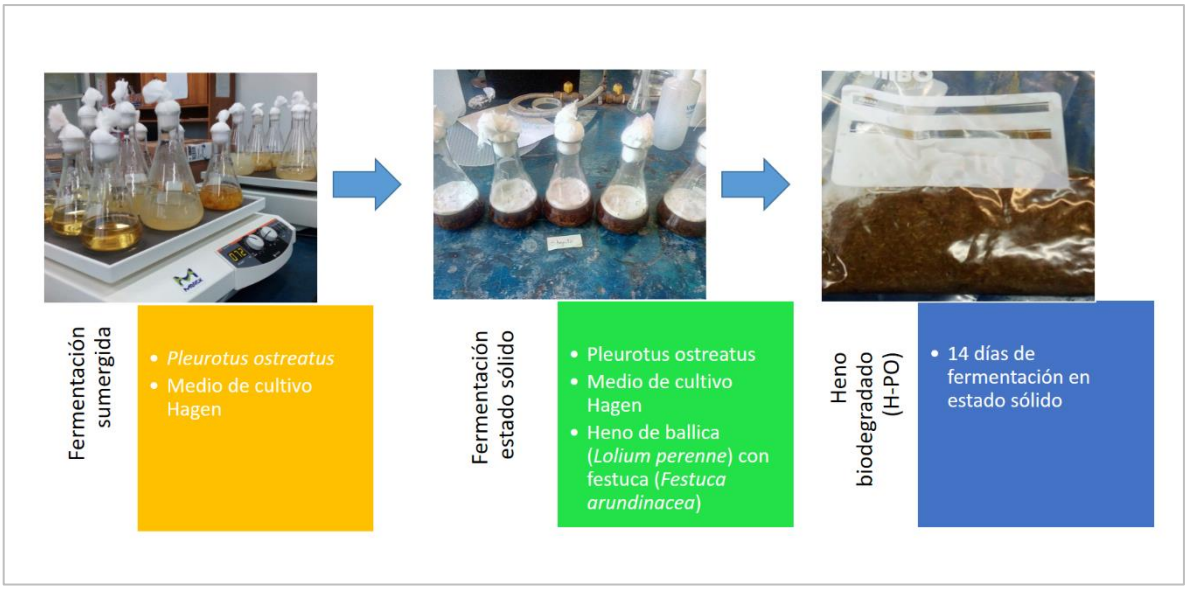


Figura 8 Diagrama de flujo para la producción de heno biodegradado con *P. ostreatus*

Identificación de estatinas en fermentación sumergida

Fue determinada la presencia de estatinas de la fracción liquida y sólida de matraces de fermentación sumergida, realizando separación de estas por filtración. La fracción sólida fue mezclada con acetato de etilo ($C_4H_8O_2$) y a través de sonicación, filtración y concentración se obtuvo el concentrado de compuestos provenientes de los micelios de *P. ostreatus*. La fracción liquida, fue lavada con acetato de etilo ($C_4H_8O_2$), para obtener una solución orgánica que a través de secado con sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4) y concentrado con rotovapor, permite obtener el concentrado de compuestos provenientes de la fracción liquida de la fermentación sumergida (Figura 9). La identificación de estatinas en los dos concentrados se realizó por revelado en placas de cromatografía en placa fina comparativa cámara cromatografía y cámara UV (254 nm) con atorvastatina, lovastatina y simvastatina comerciales (Alarcón et al., 2003).

Obtención de crudo enzimático (CE) a partir de fermentación en estado sólido (SSF)

Se tomaron muestras seleccionadas al azar (3 unidades, correspondientes a matraces Erlenmeyer) a 1, 7, 14 y 21 días para obtener diferentes tiempos de fermentación. Un gramo de la mezcla de biomasa (heno, micelio y medio de Hagen) se trituró con 10 mL de tampón acetato (pH 4,5) en arena, se agitó a 150 rpm durante 2 h a temperatura ambiente, se filtró y centrifugó como se ha descrito anteriormente. Los sobrenadantes se almacenaron a -80 °C (Ergun and Urek, 2017).

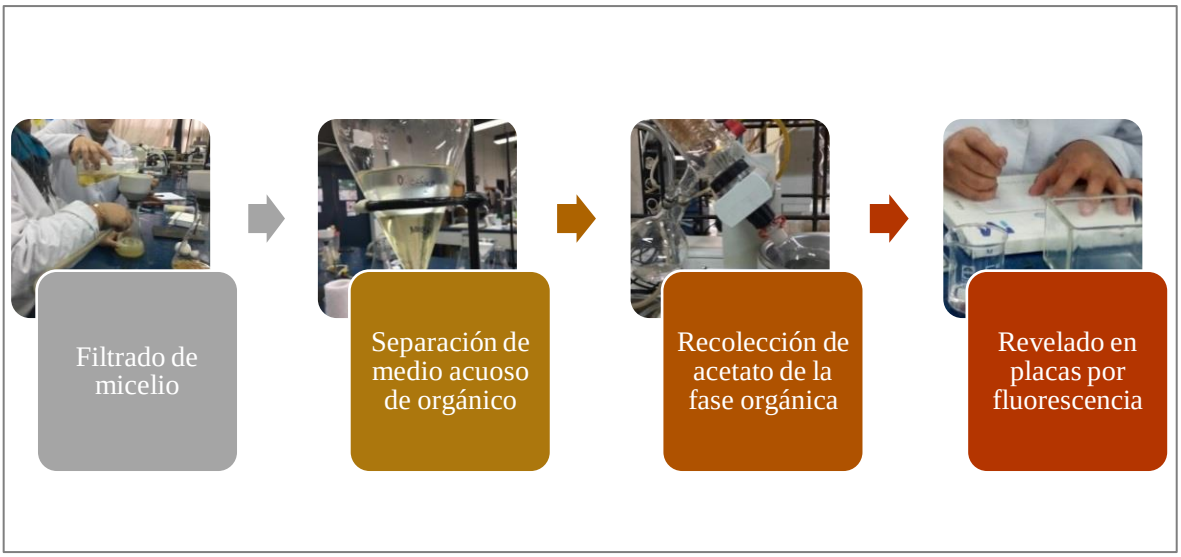


Figura 9 Diagrama de procedimientos para determinación de Estatinas

Actividad enzimática de la lacasa (Lac EC 1.10.3.2)

La actividad de la lacasa se midió monitorizando el cambio de absorbancia a 436 nm debido a la oxidación del ácido 2,2'-Azino-bis[3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico] (ABTS) utilizando un espectrofotómetro (Epoch Microplate Spectrophotometer, Biotek Instruments, Highland Park, USA). La mezcla de reacción incluyó 0,5 mM de ABTS en tampón de acetato (0,1 M, pH 5,0) (0,712 mL) y crudo enzimático (0,0375 mL). El crudo enzimático sustituido por tampón de acetato se consideró como muestra en blanco. El control se consideró como la mezcla sin reacción (Páez, 2012).

Actividad enzimática de manganeso peroxidasa (MnP EC 1.11.1.13)

La actividad de manganeso peroxidasa se determinó según el siguiente método modificado utilizando una mezcla de reacción de rojo de fenol (0,01%) (100 µL), fosfato de sodio (250 nM) (100 µL), albúmina de suero (0,5%) (200 µL), sulfato de manganeso (2 mM) (50 µL), peróxido de hidrógeno (2 mM) en tampón de acetato (0,1 M, pH 5,0) (50 µL) y crudo enzimático (500 µL). Después de incubaciones de 5 minutos a 30 °C, se tomaron lecturas de absorbancia a 610 nm en un espectrofotómetro (Epoch Microplate Spectrophotometer, Biotek Instruments, Highland Park, USA). La mezcla del control contenía todos los reactivos, excepto el crudo enzimático y el acetato tampón; mientras que el control blanco contenía todos los reactivos, excepto la albúmina de suero, el crudo enzimático y el peróxido de hidrógeno, que fueron sustituidos por tampón fosfato. La muestra en blanco era el crudo enzimático y el tampón acetato (Chan-Cupul et al., 2016).

Actividad enzimática de lignina peroxidasa (LiP EC 1.11.1.14)

La actividad de la lignina peroxidasa se determinó utilizando la mezcla de reacción de tampón acetato (0,1 M, pH 3,0) (0,427 mL), ABTS (10 mM) (0,107 mL), peróxido de hidrógeno (0,1M) (0,107 mL) y crudo enzimático (0,107 mL). Los cambios en la absorbancia se determinaron a 420 nm, después de 1 h de incubación a 30 °C por espectrofotometría. El control contenía todos los reactivos, menos el crudo enzimático. El blanco de control contenía todos los reactivos excepto el CE y el peróxido de hidrógeno (Usnayo, 2007).

Las tres enzimas aquí medidas se expresaron como una unidad enzimática (U), definida como la cantidad de enzima que provoca el aumento de 1 unidad de absorbancia por minuto. La actividad específica se informó como unidad por gramo de proteína extracelular total (U/g TP) (Téllez-Téllez et al., 2008; García-Oduardo et al., 2017). El contenido total de proteínas en CE se determinó empleando kit de ensayo de proteínas con ácido bicincho-nínico (BCA) de Pierce (Thermo Scientific®, Rockford, USA).

Composición química del heno antes y después de fermentación en estado sólido (SSF)

Se analizó una muestra de heno (compuesta por 3 submuestras) según la metodología descrita a continuación: materia seca (MS) (método AOAC #934.01) (AOAC 1997), cenizas totales (AT) (método AOAC #942.05) (AOAC 1997), proteína bruta (PC) (método AOAC #954.01) (AOAC 1997), extracto etéreo (EE) (AOAC #920.39) (AOAC 1997), energía metabolizable teórica para rumiantes (EM) (AOAC 1997), fibra detergente ácido (aADFom) (método AOAC #973.18) (AOAC 1997) y lignina detergente ácido, fibra detergente neutro (aNDFom) (Mertens, 2002). Asimismo, una vez que la SSF de cada frasco alcanzó los 14 días, considerado este como tiempo mínimo de colonización del sustrato, y actividad enzimática, se tomó una muestra para formar una muestra compuesta que se analizó con la misma metodología utilizada para analizar el heno.

Análisis estructural del heno de ballica con festuca.

Se tomaron muestras de heno antes y después de 14 días de fermentación y se secaron en un horno de secado (modelo UNB 500, memmet GmbH+Co.KG, Schwabach, Alemania) (50°C) hasta peso constante, para observar los cambios estructurales microscópicos. Las muestras se observaron con un microscopio electrónico (JEOL, JSM840A, Tokio, Japón).

Análisis estadístico

En el experimento de fermentación sumergida, se consideraron 54 matraces Erlenmeyer como unidades experimentales, mientras que las unidades de muestreo fueron 3 matraces de 21 días de incubación, comparados con estadísticas descriptivas de medias y

desviaciones estándar. Por otra parte, en el experimento de fermentación en estado sólido, la unidad experimental fueron 48 matraces y las unidades de muestreo 12 matraces Erlenmeyer. Se utilizó un ANOVA para el análisis de los resultados en un diseño de modelo completamente aleatorio, del modelo $Yij = \mu + \alpha i + \varepsilon ij$, donde Yij es cada una de las observaciones de la unidad de muestreo (actividad enzimática y actividad enzimática específica de cada enzima), μ es la media general, αi es el tiempo de fermentación y εij es el error experimental. Cuando lo indicó el ANOVA, se realizó una prueba de comparación de medias de Tukey (nivel de significación 0,05). Se utilizó el software estadístico InfoStat (InfoStat, 2017).

b) Resultados

La utilización de *P. ostreatus* en fermentación sumergida y posteriormente en sólido, con ryegrass-fescue como sustrato, se realizó como se esperaba, con aparición esporádica de contaminación ambiental. La fermentación en estado sólido generó la biodegradación del sustrato vegetal utilizado, debido a la actividad enzimática del hongo y como consecuencia su bioconversión para su uso en la alimentación de rumiantes.

Composición química del heno de ballica-festuca antes y después de SSF de 14 días por acción de *P. ostreatus*

La composición química del heno después de SSF resultó en un leve incremento en la PC, y CNF, reducciones en las cenizas totales, EE y una marcada reducción (66,3%) en la lignina detergente ácido (Tabla 5). También se registró una disminución de la aFDNom, sin alterar los aportes teóricos de EM para los rumiantes.

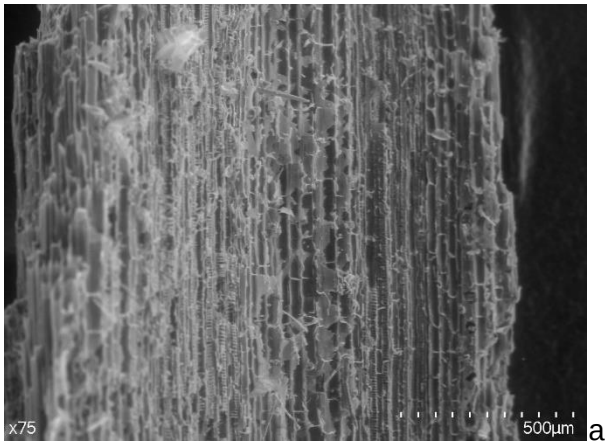
Tabla 5 Composición química del heno de ballica festuca antes y después de 14 días de SSF**.**

Determinaciones*	**Unidades**	**Heno Ballica-Festuca**	**Residuo Fermentación**
Análisis proximal			
Materia seca (MS)	g/100g	91,29	14,52
Cenizas totales (CT)	g/100g	4,41	3,83
Proteína cruda (PC)[a]	g/100g	4,73	5,16
Extracto etéreo (EE)	g/100g	1,30	1,10
Carbohidratos no fibrosos (CNF)[b]	g/100g	20,84	25,04
Energía metabolizable (EM)[c]	Mcal/kg MS	1,94	1,95
Análisis Van Soests			
Fibra detergente neutro (aFDNom)	g/100g	68,72	64,87
Fibra detergente ácido (aFDAom)	g/100g	42,45	42,05
Lignina detergente ácido[d]	g/100g	5,88	1,98

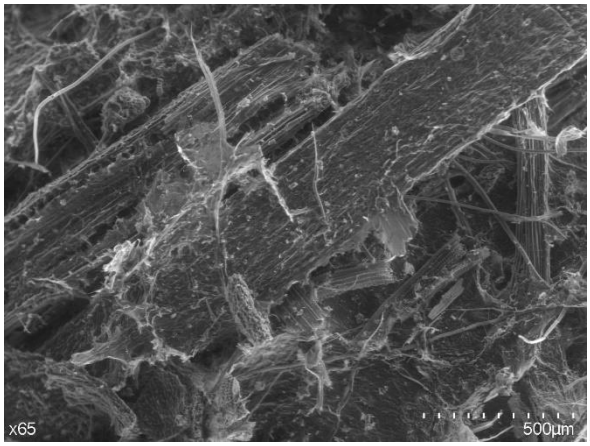
* Excepto para el valor de la materia seca, los valores de los nutrientes se informan sobre la base de la materia seca. [a]PC: Proteína bruta aplicando factor 6,25, [b]CNF: 100 – (aFDNom + PC + EE + CT) (NRC, 2001). [c]Energía metabolizable, expresada como Mcal/kg MS, calculada después según Bath and Marble (1989) y Khalil et al. (1986), [d] Lignina detergente acida expresada en lignina como se ofrece.

Análisis estructural.

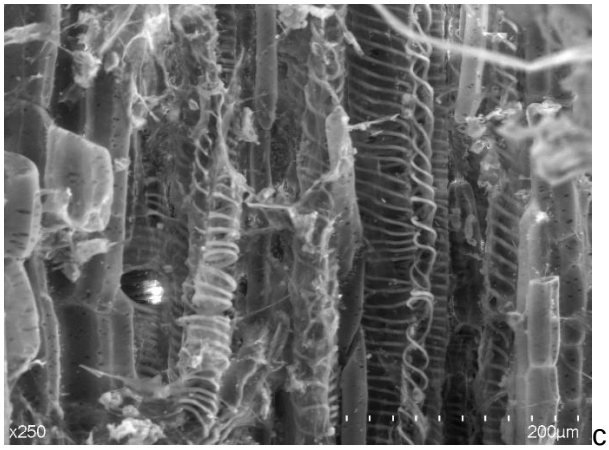
Los cambios en el material vegetal antes y después de la SSF con *P. ostreatus* se muestran en la Figura 10. En la Figura 10a, la estructura superficial del heno en su estado natural muestra un bajo grado de daño, posiblemente ocasionado por el corte, prensado, manipulación del material original durante el enfardado. Mientras que después de la SSF y la molienda mecánica del material resultante, se observa desorganización, fragmentación y daños en la integridad de la estructura (Figura 10b), y un acercamiento mayor revela que el daño es mayor (Figura 10c).



a



b



c

Figura 10 Análisis estructural con microscopio electrónico del heno de festuca antes y después de la SSF con *P. ostreatus* durante 14 días. (a) material vegetal antes de SSF; (b, c) material vegetal después de SSF, x65 y x250**.**

Actividad enzimática de *P. ostreatus* en fermentación sumergida

La evaluación de la proteína total en la fermentación sumergida tuvo un valor de 0,02 ±

0,005 g/L. Las actividades enzimáticas expresadas en U/L fueron de 4,38 ± 0,35; 9,39 ± 5,14 y 10,60 ± 5,71 para MnP, LiP y Lac, respectivamente, mientras que expresadas como actividad enzimática específica (U/g PT), para las mismas enzimas fue de 175,48 ± 19,94; 380,05 ± 140,49 y 477,98 ± 334,24, respectivamente.

Identificación de estatinas en fermentación sumergida. La observación del revelado en placa mostró presencia de atorvastatina, lovastatina y simvastatina en el concentrado de micelio (2M) y de la fracción liquida (1M) (Figura 11).

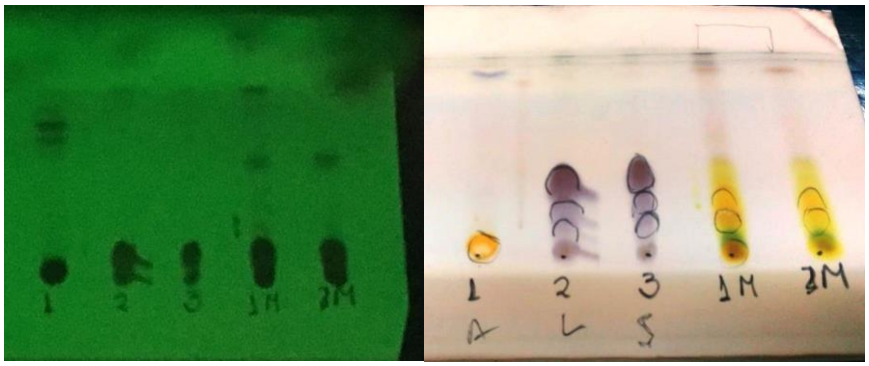


Figura 11 Cromatografía en placa fina, con identificación de estatinas a simple vista y en cámara UV. 2M: concentrado de micelio de *P. ostreatus*, 1M: concentrado de fracción liquida de fermentación sumergida de *P. ostreatus*. 1: concentrado de atorvastatina, 2: concentrado de lovastatina, 3: concentrado de simvastatina.

Actividad enzimática de *P. ostreatus* en SSF

La actividad enzimática (U/L) (Figura 12) varió según el tipo de enzima y el tiempo. La MnP fue estable entre (6,54 y 7,75 U/L) los días 1, 7, 14 y 21, lo que indica una alta estabilidad hasta los 21 días de fermentación. La actividad de LiP el día 1 fue de 14,61; 10,82 el día 7, 19,51 el día 14 y 13,43 U/L el día 21, siendo estadísticamente superior la actividad del día 14. La actividad enzimática de Lac fue más alta ($p<0,05$) el día 14, correspondiendo a 34,17, disminuyendo posteriormente a 30,55 el día 21. La concentración de proteína total, no difirió en los días 1, 7 y 14 (variando entre 1,1 y 1,2 g/L), y luego disminuyó a 0,760 g/L en el día 21 de SSF.

La actividad enzimática específica (U/g PT), considera la proteína total presente en el crudo enzimático, para MnP, el valor más alto se alcanzó en el día 21 (10,99 U/g PT), duplicando la actividad medida en los días 1, 7 y 14 (variando entre 5,83 y 6,55). Del mismo modo, LiP y Lac alcanzaron los valores más altos a los 21 días de SSF (18,28 y 40,60 respectivamente), con fluctuaciones a lo largo de los días evaluados (Figura 13).

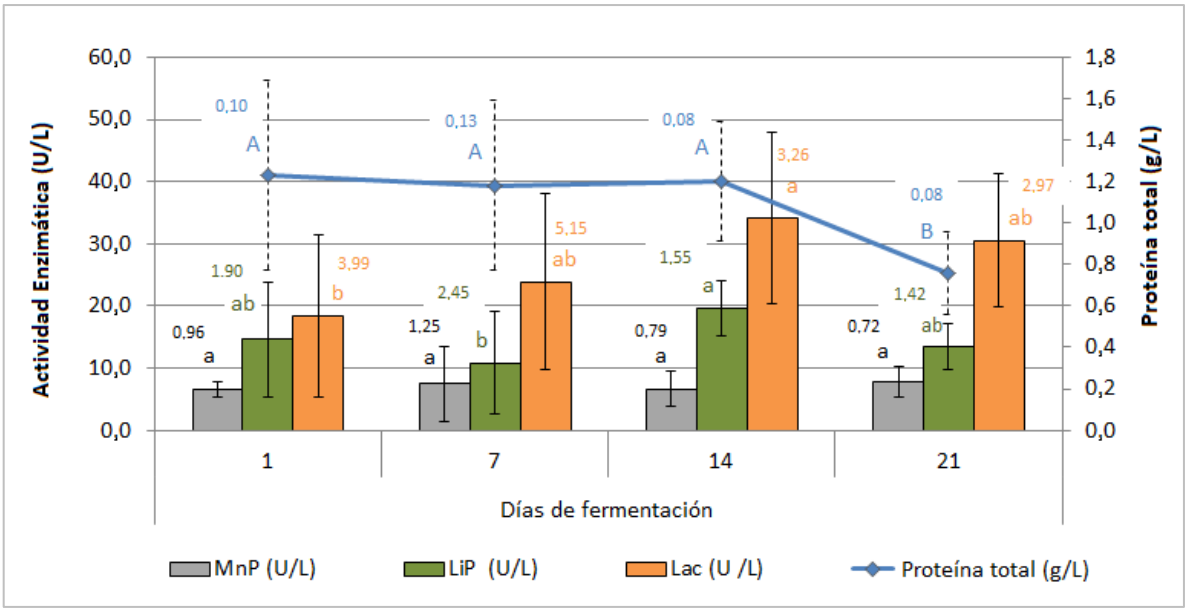


Figura 12 Actividad enzimática (U/L) de manganeso peroxidasa (MnP), lignina peroxidasa (LiP) y lacasa (Lac) y concentración de proteína total (g/L), en SSF con *P. ostreatus* durante 21 días. [1]Las diferencias se evaluaron mediante ANOVA con la prueba de comparación de medias de Tukey. Las barras del gráfico con diferentes superíndices (a, b, c, d) indican diferencias significativas entre los días de fermentación (p<0,05). Las letras mayúsculas en el eje secundario de la proteína total indican diferencias significativas entre los días de fermentación (p<0,05). Sobre los superíndices de las barras y las letras mayúsculas del eje secundario se indica el error estándar de la media.

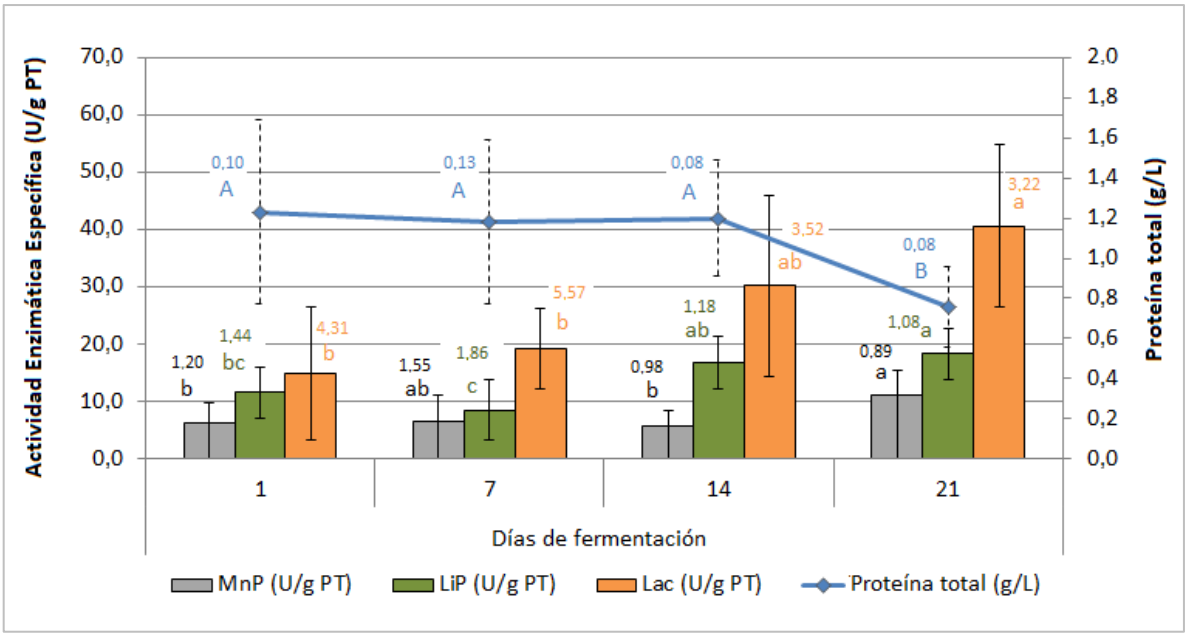


Figura 13 Actividad enzimática específica (U/g PT) de manganeso peroxidasa (MnP), lignina peroxidasa (LiP) y lacasa (Lac) y concentración de proteína total (g/L), en SSF con *P. ostreatus* durante 21 días. [1]Las diferencias se evaluaron mediante ANOVA con la prueba de comparación de medias de Tukey. Las barras del gráfico con diferentes superíndices (a, b, c, d) indican diferencias significativas entre los días de fermentación (p<0,05). Las letras mayúsculas en el eje secundario de la proteína total indican diferencias significativas entre los días de fermentación (p<0,05). Sobre los superíndices de las barras y las letras mayúsculas del eje secundario se indica el error estándar de la media.

c) Discusión

Bioconversión del heno por la acción de *P. ostreatus* y análisis estructural

Teniendo en cuenta las características del heno como alimento para rumiantes, utilizado en este estudio (Tabla 5), éste se clasifica como un forraje con bajo valor de PC (4,73%) considerando el valor promedio indicado para el heno de ballica (8,21%; Van Soest et al., 1991). La estimación de EM teórica para rumiantes del heno utilizado en este estudio fue baja (1,94 Mcal/kg MS), en comparación a valores de literatura de heno de ballica (2,15 Mcal/kg MS) y el heno de pradera (2,17 Mcal/kg MS) (Anrique, 2014). Considerando la PC y la EM como nutrientes principales, el heno utilizado en este estudio se consideró de calidad “inferior” para su uso en la alimentación de rumiantes. Esta situación podría deberse a un momento de corte tardío, en relación con el estado de maduración de la pradera. La

SSF de heno de ballica con festuca durante 14 días utilizando *P. ostreatus* modificó su composición nutricional. Estos cambios pueden atribuirse a la contribución del propio micelio, al medio de Hagen y a la acción enzimática del micelio sobre el forraje, como consecuencia de su crecimiento (Jonathan et al., 2012). La disponibilidad de nutrientes en los alimentos para rumiantes puede estimarse por su composición química, vinculada a los componentes disponibles como proteínas, lípidos, minerales, ácidos orgánicos y carbohidratos alfa-ligados (glucosa, fructosa, sacarosa, fructanos y almidón), y los menos disponibles (celulosa, hemicelulosa) a los factores que pueden limitar la disponibilidad de dichos componentes (Shabtay et al., 2009), que en el caso de los forrajes está representado por la lignina (Shrivastava et al., 2011). Así, el valor nutricional está condicionado por la proporción relativa del contenido celular, la pared celular y el grado de lignificación.

En este estudio, tras 14 días de fermentación (Tabla 1), el valor de PC aumentó levemente, mientras que la aFDNom, que representa la pared celular, disminuyó. Esto indica probablemente la ruptura de la unión del complejo lignocelulósico (celulosa-hemicelulosa-lignina). La lignina detergente ácida se redujo considerablemente (66,03%) mientras que el contenido de carbohidratos no fibrosos (NFC), representado principalmente por el almidón, los azúcares libres y las pectinas, entre otros aumentó. Este valor final de NFC está por encima del contenido del heno de alfalfa medio (22,0%) y del heno mixto medio (16%) (NRC 2001). Aunque la concentración óptima de NFC en las dietas de las vacas lecheras en lactación no está bien definida, se recomienda valores entre del 30 al 40% de la dieta base seca para evitar la acidosis y otros problemas metabólicos (NRC, 2001). La correcta formulación de las raciones debe buscar un equilibrio entre la máxima ingesta energética (reduciendo la ingesta de FDN y aumentando los carbohidratos no fibrosos) y el mantenimiento de las funciones ruminales, lo que debe ser considerado al utilizar este heno biodegradado por la actividad de *P. ostreatus*. Estas características del heno tras 14 días de SSF muestran un alimento que a nivel ruminal presentaría una mayor degradabilidad microbiana, con una más rápida adhesión de los microorganismos a la pared vegetal debido al menor grado de lignificación de la misma (Calsamiglia, 1997). La fermentación ruminal de dietas ricas en carbohidratos estructurales genera una mayor cantidad de metano por unidad de alimento ingerido, en comparación con la fermentación de dietas ricas en carbohidratos no estructurales (Carro-Travieso et al., 2018). Por tanto, la bioconversión y alteración de la proporción de carbohidratos estructurales frente a los no estructurales disminuiría la producción de metano en la fermentación ruminal (Bonilla-Cárdenas and Lemus-Flores, 2012).

La SSF empleando *P. ostreatus* en tres tipos de residuos sólidos de molienda de la aceituna mezclados con paja de trigo, mostró que la fracción FDN disminuyó para los tres tipos de residuos y la fracción FDA se mantuvo sin cambios o disminuyó, concluyendo que la bioconversión con *P. ostreatus* causa una degradación selectiva de la fracción de fibra y mejora el potencial nutricional de los residuos lignocelulósicos para la alimentación de rumiantes debido al aumento de la digestibilidad (Shabtay et al., 2009). Efectos similares se han obtenido con paja de trigo, tras 15 días de SSF (Shrivastava et al., 2012), y con paja de arroz tras 21 días (Akinfemi and Ogunwole, 2012). El aumento de PC después de 14 días de SSF en este estudio es consistente con los resultados de la fermentación en los residuos de la molienda de aceitunas (Shabtay et al., 2009), en paja de trigo (Fazaeli et al., 2006), en rastrojo de sorgo (Bonilla-Cárdenas and Lemus-Flores, 2012; Akinfemi et al., 2010), y en paja de arroz (Akinfemi and Ogunwole, 2012). Este aumento es atribuido al crecimiento del micelio y Akinfemi and Ogunwole (2012) sugirieron que el aumento de la biomasa fúngica es proporcional al aumento de PC. Otra razón para este aumento de la proteína bruta podría ser la liberación de proteínas unidas a polisacáridos (Jonathan et al., 2012). Aunque los residuos agrícolas son abundantes, su uso en la alimentación animal debe tener en cuenta su valor nutricional, el cual puede ser bajo si presenta alto contenido de fibra y bajos niveles de proteína.

Un estudio de recopilación de análisis bromatológicos de 5 años realizados en muestras de forrajes conservados en el Laboratorio de Nutrición Animal de INIA Quilamapu, de las Región del Maule y Bío Bío, Chile (Cofré y Velasco, 2007) indican que el heno de *Lolium perenne* tiene una concentración promedio de PC de 8,5%, con un máximo de 13,2% y un mínimo de 3,7%, observándose además que más del 36% de las muestras está por debajo del promedio, lo que implica que éstas se encuentran en los valores mínimos inferiores a los requeridos para una producción de leche mediana a alta. Los valores mínimos suelen estar asociados a estados fenológicos avanzados de las plantas, que también afectan a la degradabilidad ruminal de los nutrientes restantes. En esta situación, realizar un pretratamiento de forrajes, como la bioconversión realizada por *P. ostreatus*, que mejora la calidad nutricional, la degradabilidad y además en un corto periodo de tiempo, debería tener un impacto positivo tanto en los costos de producción de leche y carne, en la salud ruminal, como en el uso de especies forrajeras más rústicas, menos competitivas con la alimentación humana o subproductos de cultivos. A través de estudios de biodegradación de la lignina en paja de trigo, y su posterior digestibilidad *in vitro*, se estableció una correlación positiva entre la pérdida de lignina y la digestibilidad *in vitro* (Arora and Sharma, 2009; Arora et al.,

2011). Los cambios en la estructura del material vegetal se evidenciaron mediante análisis de microscopía electrónica. La SSF con *P. ostreatus* desorganiza la estructura, provoca la ruptura de la misma y aparecen pequeñas cavidades donde podría tener lugar el posterior ataque microbiano. Estos resultados coinciden con el estudio del efecto de *P. ostreatus* sobre rastrojo de maíz de Zuo et al. (2018) en el cual, el pretratamiento con este hongo ocasionó que los haces vasculares perdieran su estructura altamente compacta y fueran destruidos en diferentes grados.

Actividad enzimática de *P. ostreatus* en fermentación sumergida

La proteína total tuvo un valor de 0,02 ± 0,005 g/L. Este valor es muy inferior al reportado con *P. ostreatus* en fermentación sumergida, durante 25 días (Díaz, 2009). Este autor reportó un pico de concentración de proteína total de 0,17 g/L a los 18 días. Del mismo modo, la utilización de *Oxyporus latamerginatus* resultó en un aumento de la proteína soluble hasta 22,72 g/L, en el día 14 y luego una reducción en el día 17 (González-Caloch et al., 2015). Otros reportes de actividad enzimática de *P. ostreatus* evaluados después del día 3 de fermentación sumergida fueron 300 U/L para Lac y 0,41 U/L para MnP, sin embargo, no se detectó actividad LiP (Guillén-Navarro et al., 1998). Estos valores contrastan con los resultados aquí reportados, probablemente debido a las diferencias en los tiempos de fermentación y el medio de crecimiento empleado en este estudio. Las lacasas extracelulares pueden ser producidas de forma consistente en pequeñas cantidades; sin embargo, su producción puede ser incrementada por diferentes sustratos, concretamente compuestos aromáticos o fenólicos relacionados con la lignina (García-Oduardo et al., 2017). La evaluación de la actividad enzimática en fermentación sumergida en medio con turba, indicó que el mayor valor enzimático de Lac fue el día 15, correspondiendo a 67 U/L, mientras que la MnP fue inferior a 2 U/L y la actividad de LiP no se detectó en cantidades significativas (Hong et al., 2012). Estos autores afirmaron que la producción de LiP de *P. ostreatus* es muy baja, y difícil de detectar, por lo que no suele estudiarse. En contraste, en este trabajo la actividad de LiP en fermentación sumergida fue de 9,39 U/L. Esta situación también se ha descrito en cultivos de *P. ostreatus* en fermentación sumergida (Vyas and Molitois et al., 1995; Muñoz-Duarte, 2012) y en fermentación sólida con paja de trigo (Guillén-Navarro et al., 1998).

Identificación de estatinas en fermentación sumergida

Estudios previos de *P. ostreatus* de las cepas PL124UBB, PL127UBB, PL136UBB y PL143UBB establecieron que el desarrollo de micelio en cultivos líquidos genera una concentración de lovastatina entre 5 y 70 mg /l, dependiendo del tipo de cepa analizada, y

específicamente reportan 70 mg/L en PL136UBB (Alarcón et al., 2003). Todas las estatinas naturales tienen una estructura molecular común, un sistema hexahidro-naftaleno y α-hidroxilactona, pero se diferencian entre sí debido a cadenas laterales y un grupo metilo alrededor del anillo (Figura 14). Las estatinas están presentes bajo dos tipos de formas estructurales, dependiendo del pH. Una de ellas es que la forma β-hidroxiácido está en solución alcalina, mientras que la forma de hidroxiácido y β-hidroxilactona está en equilibrio en condición ácida. Independiente de la forma estructural, se ha establecido que las estatinas son un inhibidor de la enzima hidroximetilglutaril coenzima A (HMGCoA) reductasa que cataliza la reducción de HMG-CoA a mevalonato durante la síntesis de colesterol (Alarcón et al., 2003). La biosíntesis de lovastatina, puede ser mejorada a través de modificaciones del medio liquido de crecimiento de *P. ostreatus* en composición, agitación, pH entre otros factores. Por ejemplo, Alarcón and Águila (2006) pasaron de 4,15 mg/L de lovastatina con *P. ostreatus* cepa PL127UBB en medio Hagen a 254 mg/L al aumentar el extracto de malta y agregar peptona. Estos compuestos añaden acido glutámico, histidina, glicina y otros aminoácidos al medio, los cuales favorecen la síntesis de lovastatina (Alarcón and Águila, 2006). Chen et al. (2012) realizó una serie de evaluaciones en hongos tanto en micelios como en cuerpos fructíferos, cuantificando para *P. eryngii* 44,5 mg/kg peso seco de lovastatina en micelio, mientras que en cuerpos fructíferos de *P. ostreatus* cosechados en Korea 165,3 mg/kg peso seco y 216,4 mg/kg peso seco de aquellas muestras cosechadas en Taiwan.

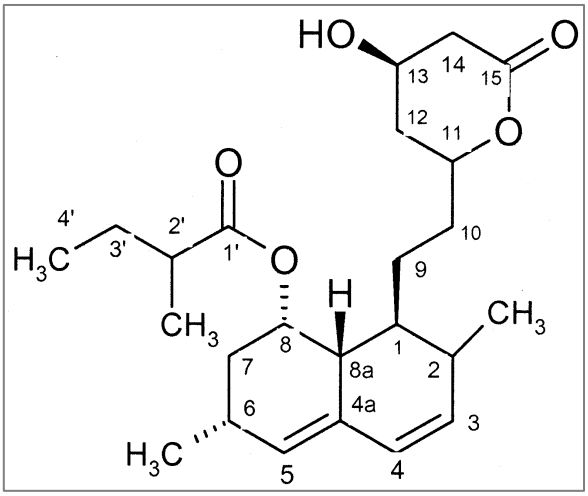


Figura 14 Estructura molecular de lovastatina. Fuente Alarcón et al. (2003).

Actividad enzimática de *P. ostreatus* en fermentación en estado sólido (SSF)

La transición de la actividad enzimática de la biomasa micelial a la SSF con heno implicó un aumento en los valores de tres enzimas. Se detectaron aumentos en MnP (153%), LiP (176%) y Lac (207%) después de las primeras 24 h de fermentación, en comparación con las actividades enzimáticas de la fermentación sumergida. Este cambio en la actividad enzimática puede atribuirse al sustrato sólido utilizado, que contribuyó al desarrollo fúngico (Hong et al., 2012; Téllez-Téllez et al., 2008). Anteriormente, la fermentación sólida de *P. ostreatus* sobre pulpa de café (García-Oduardo et al., 2017), presentó valores de actividad Lac de 7,10, 11,70 y 12,38 U/L en los días 7, 14 y 21 de fermentación, respectivamente. Estos autores reportaron valores menores o similares para sorgo y maíz, atribuibles a los contenidos de polifenoles en la pulpa de café y el sorgo. De manera similar, se evaluaron los residuos de piel seca de papa (patata) en SSF, con *P. ostreatus* hasta 23 días (Ergun and Urek, 2017) mostraron valores de actividad enzimática para Lac, MnP y LiP de 6708,30; 2503,60 y 231,20 U/L, respectivamente en el día 17 de la fermentación. Estos valores son mucho más altos que los reportados en nuestro estudio. Probablemente el sustrato juega el papel más importante, ya que las cáscaras de papa son altamente hidrofóbicas y la carga superficial más la capacidad del hongo para metabolizar azúcares, y en consecuencia mejorar la actividad enzimática de *P. ostreatus* puede haber contribuido a los valores más altos. La variación de la actividad enzimática a los 21 días de fermentación, concretamente en LiP y Lac, puede atribuirse a que el hongo degrada preferentemente lignina y sólo una vez agotado este sustrato, comienza a producir enzimas para la degradación de celulosa y hemicelulosa.

d) Aplicaciones a nivel de productor.

El Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA) de Chile presentó un boletín sobre la producción del hongo ostra (*Pleurotus ostreatus*) para consumo humano (France et al., 2000). Está dirigido a los pequeños y medianos productores agrícolas, ya que en opinión del INIA; se trata de un cultivo de baja inversión y más fácil de cultivar que otros hongos. Los autores proponen como medio de pasteurización en campo la inmersión del material vegetal en agua hirviendo durante unos minutos y la incubación en bolsas. Esta metodología podría ser adecuada para los objetivos de nuestra investigación, con incubaciones de 14 días, en la oscuridad, para mejorar los sustratos lignolíticos para consumo animal, pero para pequeños volúmenes de material vegetal inicial. Una alternativa para aumentar la producción de material vegetal fermentado por *P. ostreatus* sería el uso de granos de cereales inoculados con el hongo, como aditivo al heno de pradera (u otro

producto destinado al consumo animal con alto contenido en lignocelulosa), para su almacenamiento en ensilado. En estas condiciones, la actividad lignolítica del micelio actuaría sobre el material ensilado, siempre que el oxígeno permanezca disponible en el ensilado, mejorando la calidad nutricional del producto final a consumir por los rumiantes. Esta posible forma de producción abre nuevas líneas de investigación para estudiar las interacciones entre el micelio del hongo y las bacterias del material ensilado, la duración del material ensilado, pruebas de consumo animal y pruebas de rendimiento animal.

e) Conclusión

Pleurotus ostreatus llevó a cabo activamente la fermentación en estado sólido de ballica - festuca en 14 días debido a la alta actividad enzimática y la disponibilidad de nutrientes. Esta bioconversión dio lugar a una disminución de las fracciones lignocelulósicas y a un aumento de la proteína y de los carbohidratos no fibrosos, lo que implica una bioconversión positiva, con un posible aumento de la degradabilidad de los nutrientes en la fermentación ruminal, así como un mayor suministro de nutrientes y energía para los microorganismos ruminales. En consecuencia, el uso de *P. ostreatus* nativo en forrajes de baja calidad mejoró la calidad del pienso mediante la biodegradación del material lignocelulósico, en un periodo de sólo 14 días.

Experimento 2. Evaluación de inclusión de heno biodegradado con *P. ostreatus* en dietas altas y bajas en fibra, en experimentos de fermentación ruminal *in vitro*.

a) Materiales y Métodos

Este experimento se realizó en el Laboratorio de Sistemas Ganaderos y Nutrición de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Concepción, Chillán, Chile. El cuidado y manejo de las vacas fue certificado por el comité de ética y bienestar animal de la UdeC.

Diseño experimental y tratamientos

Se consideró un diseño experimental completamente aleatorizado con arreglo factorial 2x3, con dos niveles de fibra detergente ácido (aFDAom) (dietas) y tres niveles de reemplazo de dieta con heno biodegradado con *P. ostreatus* (H-PO). El nivel de aFDAom en las dietas fue: alta (35,30%) y baja (23,45%), mientras que el reemplazo de dieta con H-PO fue: 0, 3, 6 % MS. Por lo tanto, el ensayo implicó 6 tratamientos de la siguiente manera: T1 (dieta baja en aFDAom sin H-PO), T2 (dieta baja en aFDAom con 3% H-PO), T3 (dieta baja en aFDAom con 6% H-PO), T4 (dieta alta en aFDAom sin H-PO), T5 (dieta alta en aFDAom con 3% H-PO) y T6 (dieta alta en aFDAom con 6% H-PO) (Tabla 6) se obtuvo a partir de la fermentación sólida de heno de ryegrass-festuca (*Lolium perenme- Festuca arundinacea*) de baja calidad durante 14 días con *Pleurotus ostreatus* (cepa 136UBB). El heno de ballica-festuca fue molido con criba de 2 mm (Molino de Granos, Breuer, Temuco, Chile), esterilizado en autoclave (Esterilizador a vapor de tipo vertical, modelo HL-340) a una temperatura de 121 °C, presión de 120 W/KA, en un ciclo de 15 min (Rahman et al., 2011) y finalmente secado a 50°C por 48 h. La fermentación en estado sólido se llevo a cabo en matraces Erlenmeyer (250 mL) con 50 mL de medio Hagen, sustrato vegetal (5%) y micelio. Los matraces fueron incubados a 30° C en oscuridad por 14 días, bajo condiciones estacionarias (Akpinar and Urek, 2012; Akinfemi and Ogunwole, 2012) (Figura 15). Una vez que la colonización del material vegetal fue completa, el contenido total del matraz fue molido en mortero, y muestras fueron colectadas para evaluar actividad enzimática, antes de incluir el producto en las dietas experimentales. La actividad enzimática de este heno biodegradado fue de 19,51 U/L para la lignina peroxidasa, 6,68 U/L para manganeso peroxidasa y 34,17 U/L para la lacasa (Astudillo-Neira et al., 2022).

Los tratamientos fueron diseñados para determinar el efecto de la inclusión del heno biodegradado con *P. ostreatus* (H-PO) en dietas para rumiantes con contenidos

contrastados de aFDAom. Los sustratos de incubación fueron mezclados en diferentes proporciones dependiendo de si la dieta fue alta o baja en aFDAom (Tabla 6). Todos los ingredientes fueron molidos a 2mm usando molino martillo (Molino de Granos, Breuer, Temuco, Chile) antes de ser mezclado con H-PO en concentraciones de 0, 3 y 6% MS.

Incubaciones *in vitro* por lotes

Se obtuvo líquido ruminal de dos vacas Aberdeen Angus adultas, no lactantes, canuladas, alimentadas dos veces al día con una dieta de forraje:concentrado de 70:30 durante dos semanas antes del experimento. En cada día del experimento, dos horas después de la alimentación matutina, se recogió el contenido del rumen y se filtró a través de 4 capas de gasa, y transportado inmediatamente al laboratorio en contenedores térmicos precalentados (39°C). El inóculo para la fermentación se preparó mezclando el líquido ruminal con solución tampón de incubación (Menke et al., 1979) en una proporción de 1:3 v/v, respectivamente. El inóculo (25 mL) se transfirió a frascos de suero (50 ml) de color ámbar, que fueron gaseados con CO_2, sellados con tapones de goma e incubados a 39°C (Forma Series II 3110 Water-Jacketed CO_2 Incubator, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) en un agitador orbital (Heidolph Unimax 2010, Schwabach, Alemania) a 90 oscilaciones/minuto. Los frascos de suero contenían bolsas de filtro ANKOM$^{(R)}$ -F57 con 500 mg de cada tratamiento experimental. Se incluyeron frascos con blancos para estimar la producción neta de gas (Ávila et al., 2011). Tres réplicas fueron incluidas por cada tratamiento y tiempo de muestreo (24 h) y la incubación completa de 24 h se repitió tres veces en semanas consecutivas. El periodo de incubación de 24 h fue usado de acuerdo a la técnica de producción de gas descrita por Menke and Steingass (1988) y ha sido además validado por multiples autores (Getachew et al., 2002; Purcell et al., 2011; Forggi et al., 2022; Suescún-Ospina et al., 2022). El número total de botellas incubadas por corrida fue de 20 [(6 tratamientos x 3 réplicas + 2 blancos).

Tabla 6 Ingredientes y composición química de dietas experimentales y heno utilizado.

Ingredientes, % de MS		**Dieta baja aFDAom[2]**	**Dieta alta en aFDAom[2]**
Forrajes	Ensilaje de maíz	38,00	32,00
	Heno trébol/ballica	18,00	15,00
	Paja de trigo	2,00	25,00
	Vinaza de achicoria	1,00	6,00
Concentrados	Maíz grano molido	16,00	5,00
	Maíz grano húmedo	7,00	5,00
	Harina de soya	6,00	1,00
	Concentrado comercial[6]	11,00	10,00
	Mezcla Vitaminas y minerales	1,00	1,00

Composición quimica, % en MS	**Dieta baja aFDAom[2]**	**Dieta alta aFDAom[2]**	**H-PO[4]**	**Heno antes de fermentación estado solida[5]**
Materia seca (MS)	94,37	91,43	14,52	91,29
Ceniza total (CT)	5,63	8,57	3,83	4,41
Proteína cruda (PC)	12,20	12,73	5,16	4,73
Extracto etéreo (EE)	2,01	1,84	1,10	1,30
Energía metabolizable (EM)[7]	2,21	2,02	2,02	2,01
aFDNom[1]	35,19	42,38	64,87	68,72
aFDAom[2]	23,45	35,30	42,05	42,45
LDA[3]	2,82	3,82	1,98	5,88

[1]aFDNom: Fibra detergente neutro, [2]aFDAom: Fibra detergente ácido sin ceniza residual, [3]LDA: Lignina detergente ácido, [4]H-PO: Heno biodegradado con *P. ostreatus*, [5]Heno de ballica-festuca antes de fermentación estado sólida con *P. ostreatus*, [6]Concentrado Cosetán® vaca lechera No.15 (MS 88,7%, PC 19,0%, EM 2,93 Mcal/kg MS, EE 1,7%, aFDNom 32,5%), [7]EM expresada como Mcal/kg MS, calculada después según Bath and Marble (1989) y Khalil et al. (1986). Todos los ingredientes, excepto H-PO fueron liofilizados antes de moler y mezclar.

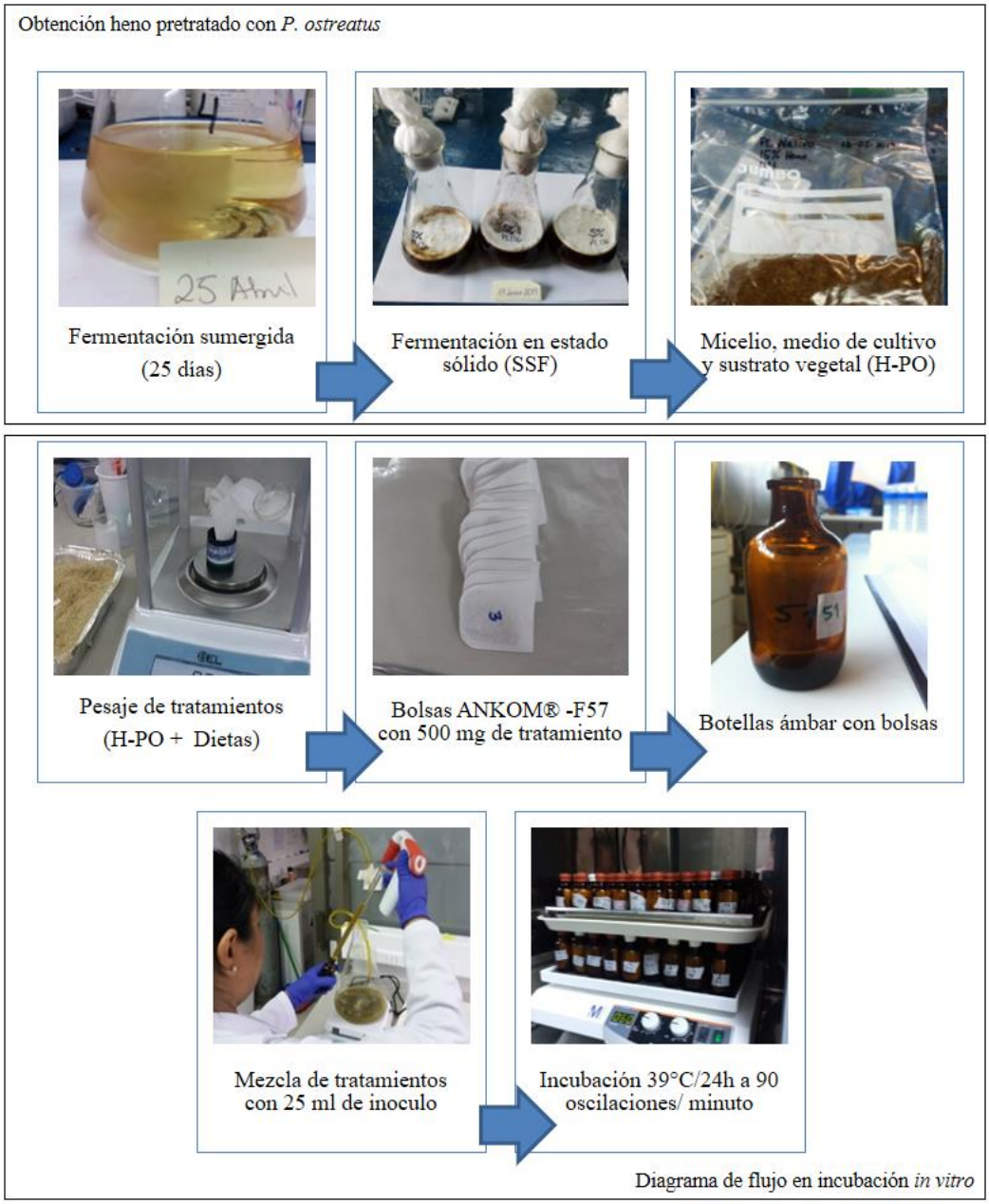


Figura 15 Diagrama de flujo para incubación *in vitro*.

Estimación de la producción de gas ruminal, CH_4 y desaparición de materia seca

La producción de gas de cada botella se midió a las 6, 12 y 24 h de incubación por desplazamiento de agua (Fedorah and Hrudey 1983), antes de cada medición de producción de gas, se recogió una muestra de 15 mL de gas con una jeringa y se transfirió a un Exetainer de 5,9 mL (Labco Ltd., High Wycombe, Buckinghamshire, Reino Unido), para la determinación de la concentración de CH_4 por cromatografía de gases. El cromatógrafo

de gases (GC; Agilent 7890B, Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA) fue equipado con un detector de conductividad térmica (TCD) y una columna de 30 m x 0,32 mm x 3 µm (GS-CarbonPLOT, Agilent Technologies, Italia). Se utilizó helio como gas portador con un flujo de 1,33 mL/min, y una temperatura de horno isotérmica de 35°C. La temperatura del inyector y del detector se ajustó a 185 °C y 150 °C, respectivamente (Vera et al., 2021). Se utilizó gas CH_4 de calidad analítica (99,99%) para preparar los estándares (Linde®, Santiago, Chile). Los estándares de CH_4 (15, 10, 7,5, 5,0, 2,5 y 1,0%) se prepararon diluyendo el gas CH_4 con gas N_2 a temperatura ambiente. Tras el muestreo de gas, se abrieron las botellas para medir el pH (Thermo Scientific, medidor portátil de pH Orion Star A121, EE.UU.) y retirar las bolsas ANKOM®-F57. Las bolsas se lavaron hasta que el agua salió clara y se secaron a 60 °C durante 24 h para determinar la desaparición *in vitro* de la materia seca (IVDMD) (Vera et al., 2018). Se calculó el Factor de Partición (FP) para 24 h de incubación, siendo esta la relación entre la MS degradada (MSd; mg) y el volumen neto de gas (mL), y representa una medida de la eficiencia de la fermentación (Blümmel et al., 1997).

Determinación de los ácidos grasos de cadena corta (AGCC)

Tras la incubación, se recogieron muestras de 1,5 mL de cada frasco, se transfirieron a viales de 2 mL (Biologix Research Co., EE.UU.) y se mezclaron con 300 µL de ácido metafosfórico (0,25; p/v), se centrifugaron, filtraron (ClarinertTM, 22 µm, Agela Technologies, China) y almacenaron a -20ºC hasta su análisis. La determinación de AGCC se realizó mediante cromatografía de gases (Agilent 7890B; Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, EE.UU.) utilizando una columna de acero inoxidable de 30 m × 0,250 mm × 0,25 µm (DB-FFAP, Agilent Technologies, Milán, Italia) y un detector de ionización de llama (Ávila-Stagno et al., 2014). La temperatura inicial del horno fue de 150° C, y se incrementó en 5°C/min hasta 195°C, por 5 min y se mantuvo durante 8 min. Las temperaturas del inyector y del detector fueron de 225°C y 250ºC, y el gas portador fue helio. Las concentraciones se determinaron comparando el tiempo de retención y el área de pico con un estándar de AGCC Supelco® mediante el software ChemStation v. 3.2 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE.UU.).

Análisis químico

Las muestras de la dieta y del heno biodegradado se analizaron según los procedimientos de la AOAC (1997) para determinar la materia seca (MS) (método #934.01), ceniza total (método #942.05), proteína bruta (método #954.01), fibra detergente ácido (método #973.18; aFDA), lignina detergente ácido (método #973.18) y fibra detergente neutro

(aFDNom) se determinó según Mertens (2002).

Análisis estadístico

Los datos se analizaron con STATA 14 (StataCorp LP, College Station, Texas, EE.UU.) (StataCorp., 2015) utilizando el modelo Yjk = μ + δ + αj + βk + (αβ)jk +εijk, donde Yjk: es cada observación; μ: media global (de producción de gas, pH, CH_4, DIVMS y AGCCt), δ efecto corrida (aleatorio), αj: efecto del factor 1 (aFDAom, efecto fijo), βk: efecto del factor 2 (H-PO, efecto fijo), (αβ)jk: interacción entre factores y εijk: error. Cuando se detectaron diferencias significativas entre tratamientos ($p<0,05$), se realizó una comparación de medias con el test de Tukey, considerando el mismo nivel de significación. De manera adicional, fue determinada la existencia de tendencia cuando el valor $p > o = 0,05$ y $< 0,1$. De manera adicional, contrastes polonimiales fueron usados para identificar efectos lineales y cuadráticos por efecto del aumento de las concentraciones de aFDAom.

b) Resultados

Desaparición *in vitro* de la materia seca (DIVMS), producción de gas y CH_4

La DIVMS se vio afectada por el contenido de aFDAom ($p<0,001$) y el porcentaje de inclusión de H-PO ($p<0,001$). La inclusión de H-PO a concentraciones del 3 y 6% resultó en un aumento lineal de DIVMS en 5 y 7% respectivamente, mientras que concentración alta de aFDAom redujo DIVMS en 6% en comparación con la dieta baja en aFDAom (Tabla 7). La producción de gas total fue reducida en 19% en la dieta alta en aFDAom en comparación a la dieta baja en aFDAom ($p<0,001$), pero no fue afectada por las concentraciones de H-PO en la dieta ($p=0,957$). La más alta producción de gas fue 124,0 mL/g MSi en la dieta baja en aFDAom, mientras que en la dieta alta en aFDAom se alcanzó una producción de 100,6 ml/MSi (Tabla 7). El factor de partición no fue afectado por la concentración de H-PO, aunque se observa una tendencia a ser afectado por H-PO ($p = 0,062$), pero la concentración de aFDAom lo aumentó linealmente ($p=0,023$). El aumento de las concentraciones de aFDAom y de H-PO dio lugar a importantes reducciones de CH_4 neto (mg; $p<0,001$) (Figura 16). La producción de CH_4 metano (mg/g MSi) y el rendimiento de CH_4 (mg/g MSd) se redujeron al aumentar las concentraciones de aFDAom y H-PO en las dietas ($p<0,001$). Significativas interacciones entre aFDAom x H-PO fueron registradas para estos dos parámetros (Figura 17a y b). En producción de CH_4, se observa que las pendientes de 0, 3, y 6% son positivas al pasar de aFDAom alta a baja, siendo mayor el efecto sobre 6% H-PO. En 0 y 3% H-PO las rectas son prácticamente paralelas. Las

interacciones para rendimiento de CH_4 se muestran en la figura 17b, mostrando también marcado efecto al pasar de dieta alta a a baja de FDAom sobre la variable rendimiento, en especial con 6% H-PO.

La producción de CH_4 y el rendimiento disminuyeron de manera lineal ($p<0,001$); la producción de CH_4 varió entre 18,4 y 12,6 mg/g MSd.

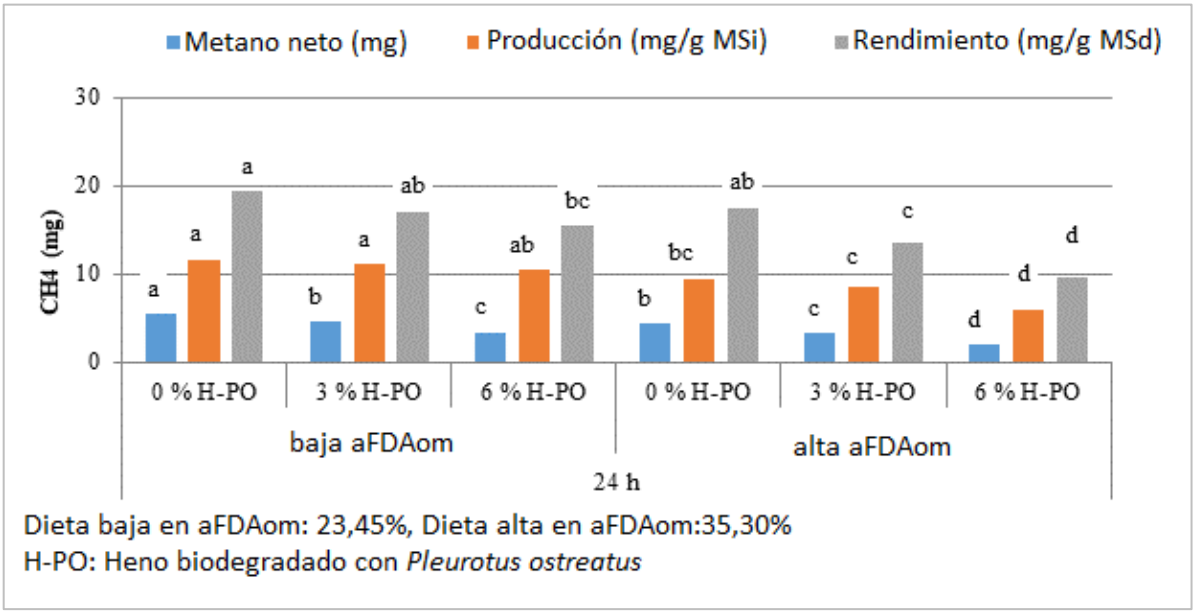


Figura 16 Metano neto y, producción y rendimiento de metano, según la concentración de heno biodegradado con *P. ostreatus* y aFDAom a las 24 h de incubación. Letras diferentes entre las barras para el CH_4 neto, la producción de CH_4 y el rendimiento de CH_4 indican diferencias significativas ($p<0,05$), según la inclusión de heno biodegradado, dentro de un nivel de aFDAom.

.

Tabla 7 Efectos del heno biodegradado con *P. ostreatus* y fibra detergente ácido en la dieta, parámetros de fermentación y gases.

Items			DIVMS[B], %	pH	PG[C], mL/g MSi[D]	FP[D], mg/mL	CH_4 Neto, mg	Producción CH_4, mg/g MSi	Rendimiento CH_4, mg/g MSd
Fibra detergente ácido (aFDAom)		Baja	60,0 [A]	6,67 [B]	124,0 [A]	4,92 [B]	4,41 [A]	11,04 [A]	17,32 [A]
		Alta	54,0 [B]	6,83 [A]	100,6 [B]	5,50 [A]	3,19 [B]	7,98 [B]	13,55 [B]
		EEM[A]	0,01	0,01	2,83	0,18	0,09	0,23	0,35
		Valor-*p*	<0,001	<0,001	<0,001	0,023	<0,001	<0,001	<0,001
Heno biodegradado con *P. ostreatus* (H-PO)		0%	53,0 [B]	6,62 [C]	111,6	4,83	4,86 [A]	10,52 [A]	18,44 [A]
		3%	58,0 [A]	6,75 [B]	112,3	5,24	3,87 [B]	9,83 [A]	15,29 [B]
		6%	60,0 [A]	6,86 [A]	113,1	5,56	2,87 [C]	8,19 [B]	12,56 [C]
		EEM[A]	0,01	0,02	3,50	0,22	0,11	0,29	0,43
		Valor-*p*	<0,001	<0,001	0,957	0,062	<0,001	<0,001	<0,001
Interacción aFDAom y H-PO		Baja-0%	56,0	6,52	120,9	4,70	5,41	11,63 [a]	19,37 [a]
		Baja-3%	61,0	6,67	124,0	4,98	4,49	11,12 [a]	17,08 [ab]
		Baja-6%	63,0	6,81	127,2	5,09	3,33	10,30 [ab]	15,49 [bc]
		Alta-0%	50,0	6,73	102,3	4,96	4,32	9,42 [bc]	17,51 [ab]
		Alta-3%	55,0	6,83	100,6	5,51	3,24	8,53 [c]	13,49 [c]
		Alta-6%	58,0	6,92	98,9	6,04	2,02	6,00 [d]	9,64 [d]
		EEM[A]	0,01	0,02	4,8	0,30	0,15	0,41	0,59
		Valor-*p*	0,901	0,064	0,614	0,523	0,747	0,020	0,006
Contrastes Polinomiales	Baja aFDAom	Lineal	<0,001	<0,001	0,406	0,183	<0,001	<0,001	<0,001
		Cuadrático	0,167	0,628	0,987	0,809	0,242	0,450	0,990
	Alta aFDAom	Lineal	<0,001	<0,001	0,479	0,002	<0,001	<0,001	<0,001
		Cuadrático	0,379	0,872	0,996	0,976	0,511	0,018	0,938

[A-C] Medias con superíndice en mayúscula indican diferencias estadísticas dentro del factor principal dentro de una columna ($p<0,05$); tendencia 0,05> o = 0,01. [a-d] Medias con superíndice en minúsculas indican diferencias estadísticas entre interaccion aFDAom y H-PO (combinaciones de factores principales) dentro de una columna ($p<0,05$). [A]Error estándar de la media (división de la desviación estándar por la raíz cuadrada del tamaño muestral), [B]Desaparición de materia seca *in vitro*, [C]Producción de gas, [D]Factor de partición: la relación entre MS degradada (MSd; mg) y volumen neto de gas (mL).

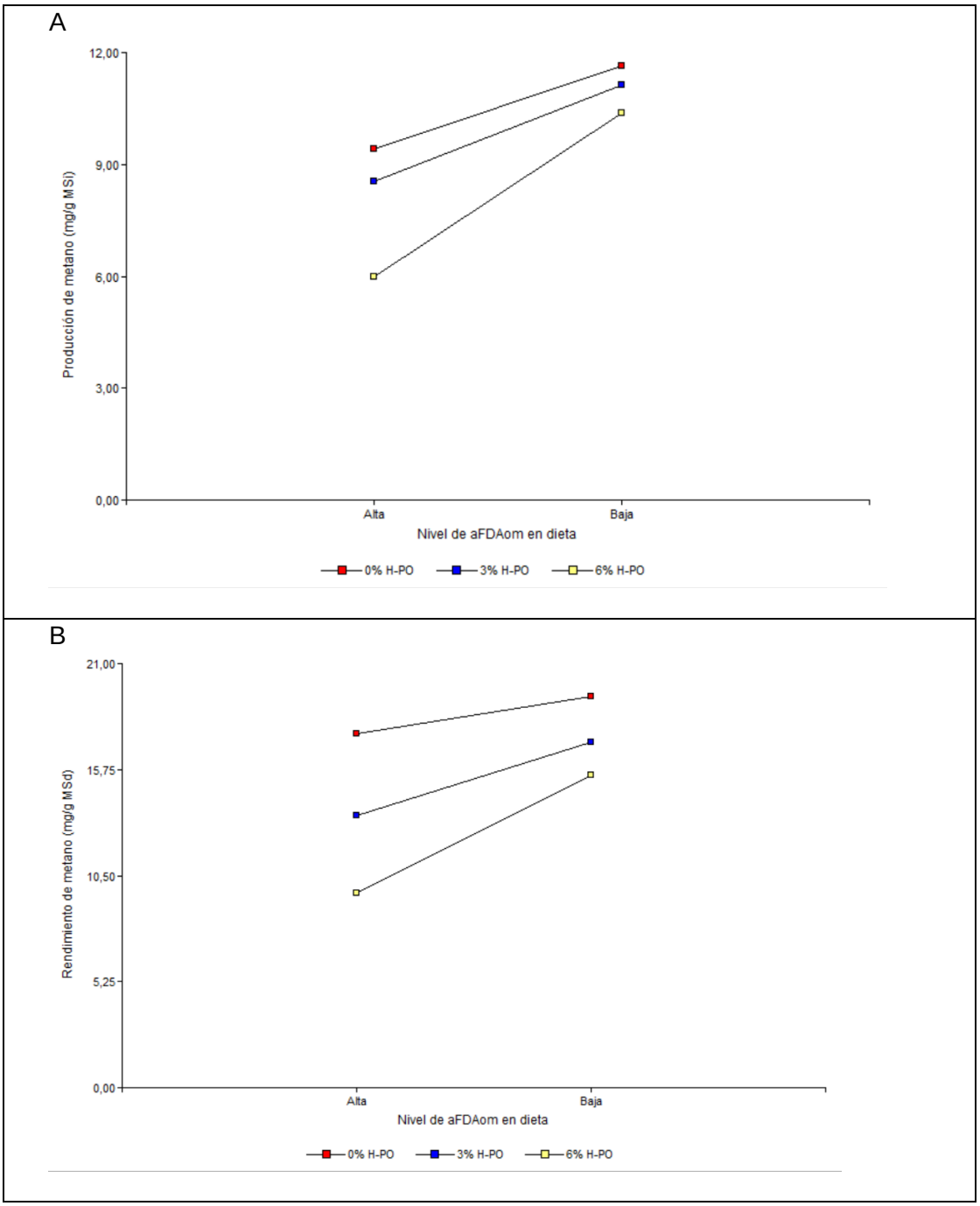


Figure 17 Interacción de fibra detergente ácido (aFDAom) en la dieta × concentración de H-PO (heno biodegradado de *P. ostreatus*) según dieta alta en aFDAom y baja en aFDAom para: (A) producción de metano (mg/g MSi) y (B) rendimiento de metano (mg/g MSd) a las 24 h.

Ácidos grasos totales de cadena corta (AGCC)

No se encontró interacción entre aFDAom y H-PO para la concentración de AGCC (p=0,910). Ellos tendieron a disminuir por aFDAom (p=0,076) y concentración de H-PO (p=0,080) en la dieta. El aumento de las concentraciones de aFDAom en la dieta dio lugar a un incremento de la proporción molar de acetato (p<0,001) y de la relación A:P (p=0,001), pero redujo las proporciones molares de propionato (p=0,038) y butirato (p=0,001). El aumento de las concentraciones de H-PO también incrementó las proporciones molares de ácido acético (p<0,001), la relación A:P (p=0,001), y redujo las proporciones molares de propionato (p=0,021), pero no afectó a las proporciones molares de butirato (p=0,233) (Tabla 8).

pH

El pH de incubación varió entre 6,52 y 6,92 a las 24 h, con un incremento lineal significativo en la medida que la concentración de H-PO incrementó.

Tabla 8 Ácidos grasos de cadena corta totales (AGCCt), y porcentaje de los principales AGCCt según la concentración de heno biodegradado de *P. ostreatus* y fibra detergente ácido, a las 24 h de incubación.

Items			Ácidos grasos de cadena corta totales (AGCCt)				
			Total, mM/L	Acetato, %	Propionato, %	Butirato, %	A:P[B]
Fibra detergente ácido (aFDAom)		Baja	306,0	49,0 [B]	27,0 [A]	22,0 [A]	1,84 [B]
		Alta	279,0	54,0 [A]	26,0 [B]	19,0 [B]	2,14 [A]
		EEM[A]	10,51	0,01	0,01	0,004	0,06
		Valo-*p*	0,076	<0,001	0,038	<0,001	<0,001
Heno biodegradado con *P. ostreatus* (H-PO)		0%	311,8	50,0 [C]	28,0 [A]	21,0	1,79 [B]
		3%	295,7	52,0 [B]	26,0 [AB]	21,0	2,02 [AB]
		6%	270,1	54,0 [A]	25,0 [B]	20,0	2,16 [A]
		EEM[A]	12,87	0,01	0,01	0,01	0,07
		Valor-*p*	0,080	<0,001	0,021	0,232	0,001
Interacción aFDAom y H-PO		Valor-*p*	0,910	0,944	0,951	0,989	0,867
Contrastes polinomiales[c]	Baja aFDAom	Lineal	0,101	0,000	0,001	0,090	<0,001
		Cuadrático	0,839	0,719	0,136	0,403	0,196
	Alta aFDAom	Lineal	0,007	<0,001	<0,001	0,095	<0,001
		Cuadrático	0,690	1,000	0,750	0,231	0,759

[A-C] Medias con superíndice en mayúscula indican diferencias estadísticas dentro del factor principal dentro de una columna ($p<0,05$); tendencia $0,05 > o = 0,01$.

[A]Error estándar de la media (división de la desviación estándar por la raíz cuadrada del tamaño muestral), [B]A:P = relación acetato:propionato, [C]Probabilidad de diferencias de un efecto lineal (L) o cuadrático (Q) por concentración de aFDAom.

c) Discusión

Desaparición *in vitro* de materia seca

La inclusión de 3 o 6% de heno biodegradado (H-PO) en la dieta de bajo o alto contenido en aFDAom implicó un aumento de la DIVMS, siendo los valores más altos con 6% de H-PO, es decir, la dieta en su conjunto mejoró su DIVMS al reemplazar parte de esta por heno biodegradado. Esto podría ser atribuido a que este material vegetal fue pretratado con el hongo implicando una alteración de la pared celular, y del complejo lignocelulósico (Shirivastava et al., 2012; Zuo et al., 2018).

Esto contrasta con los resultados de Fazaeli et al. (2002), que no encontraron diferencias en la digestibilidad *in vivo* de dietas con proporciones de forraje:concentrado de 1:1 cuando se sustituyó el heno de alfalfa por paja de trigo biodegradada por *P. ostreatus* durante 7 semanas, en proporciones de 0, 10, 20 y 30% de MS. Estos autores informaron de digestibilidades en el tracto total del 69% de MS. La falta de mejora de la DIVMS en el estudio de Fazaeli et al. (2002) puede deberse al excesivo tiempo de fermentación sólida de la paja de trigo, que lleva a la fructificación de los hongos, lo que indica un completo agotamiento de los nutrientes en la paja de trigo. Astudillo-Neira et al. (2022) determinaron que 14 días es el tiempo mínimo requerido por *P. ostreatus* para biodegradar el complejo lignocelulósico, mediante la producción de enzimas, sin alterar significativamente la proporción de celulosa y hemicelulosa.

Por el contrario, Badarina et al. (2013) reportaron una disminución de la DIVMS a las 48 h de incubación de dietas tropicales que incluían cáscara de café fermentada con *P. ostreatus* durante 60 días a 0, 10, 20, 30 y 40% de MS, concluyendo que los efectos negativos sobre la DIVMS eran atribuibles a las características del sustrato, lo que pone de manifiesto la necesidad de seleccionar ingredientes para la biodegradación que no presenten componentes antinutricionales para el ecosistema ruminal.

Producción total de gas

La inclusión de heno biodegradado no afectó a la PG, aunque hubo diferencias según la concentración de fibra de la dieta. La literatura proporciona ejemplos de fermentaciones de ingredientes fermentados con *P. ostreatus*, pero no de dietas. Entre ellos, la paja de trigo fermentada durante 21 días disminuyó la producción de gas en incubaciones *in vitro* de 24 h (Valizadeh et al., 2008), mientras que la PG a las 24 h de incubación aumentó de 30mL en el tratamiento control a 38mL en paja de arroz tratada con *P. ostreatus* (Akinfemi and Ogunwole, 2012). El rastrojo de maíz y las hojas de palma pretratado con *P. ostreatus* durante 42 días produjeron menos gas en incubaciones *in vitro* de 72h en comparación a

un sustrato control no pretratado, a diferencia de paja de arroz la cual mantuvo similar PG en comparación a un control (Tuyen et al., 2012). Esos autores atribuyeron las diferencias en PG a variaciones en la composición química de los sustratos antes de la fermentación con el hongo, a diferencias en la actividad enzimática entre distintas cepas de *P. ostreatus*, y a diferencias en el proceso de fermentación en estado sólido (medio de cultivo, temperatura, duración de la fermentación con el hongo).

El factor de partición (mg MS/mL gas), no fue afectado por H-PO, variando entre 4,80 y 5,56. Ya que la PG esta inversamente relacionada con el rendimiento microbiano (Blümmel et al., 1997), los valores del factor de partición reflejan variaciones en el rendimiento de biomasa microbiana (Sembiring and Baba, 2022).

Producción de CH_4

La inclusión de H-PO en ambas dietas supuso una disminución de la concentración de CH_4 en el gas, producción y rendimiento de CH_4. La razón de esta disminución puede estar sustentada en la presencia de lovastatina en el medio de crecimiento de *P. ostreatus*, la cual repercute en la integridad de las membranas lipídicas de las arqueas, alterando su producción de CH_4 (Figura 18).

Alarcón et al. (2003) estudiaron la concentración de lovastatina en la cepa 136 UBB de *P. ostreatus*, detectando después de 10 días una concentración de 70 mg/L, que es superior a las concentraciones de las otras cepas estudiadas (124 UBB, 127 UBB y 143 UBB). Miller and Wolin (2001) y Wolin and Miller (2006), demostraron la inhibición de cultivos de *Methanobrevibacter* con 5,6 nmol de mevastatina/mL de medio de crecimiento, pero no inhibieron el crecimiento de cepas de *Ruminococcus albus*, *R, flavefaciens*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Fibrobacter succinogenes* y *Selenomonas ruminantium* con 5,1 nmol de mevastatina/mL de medio de crecimiento.

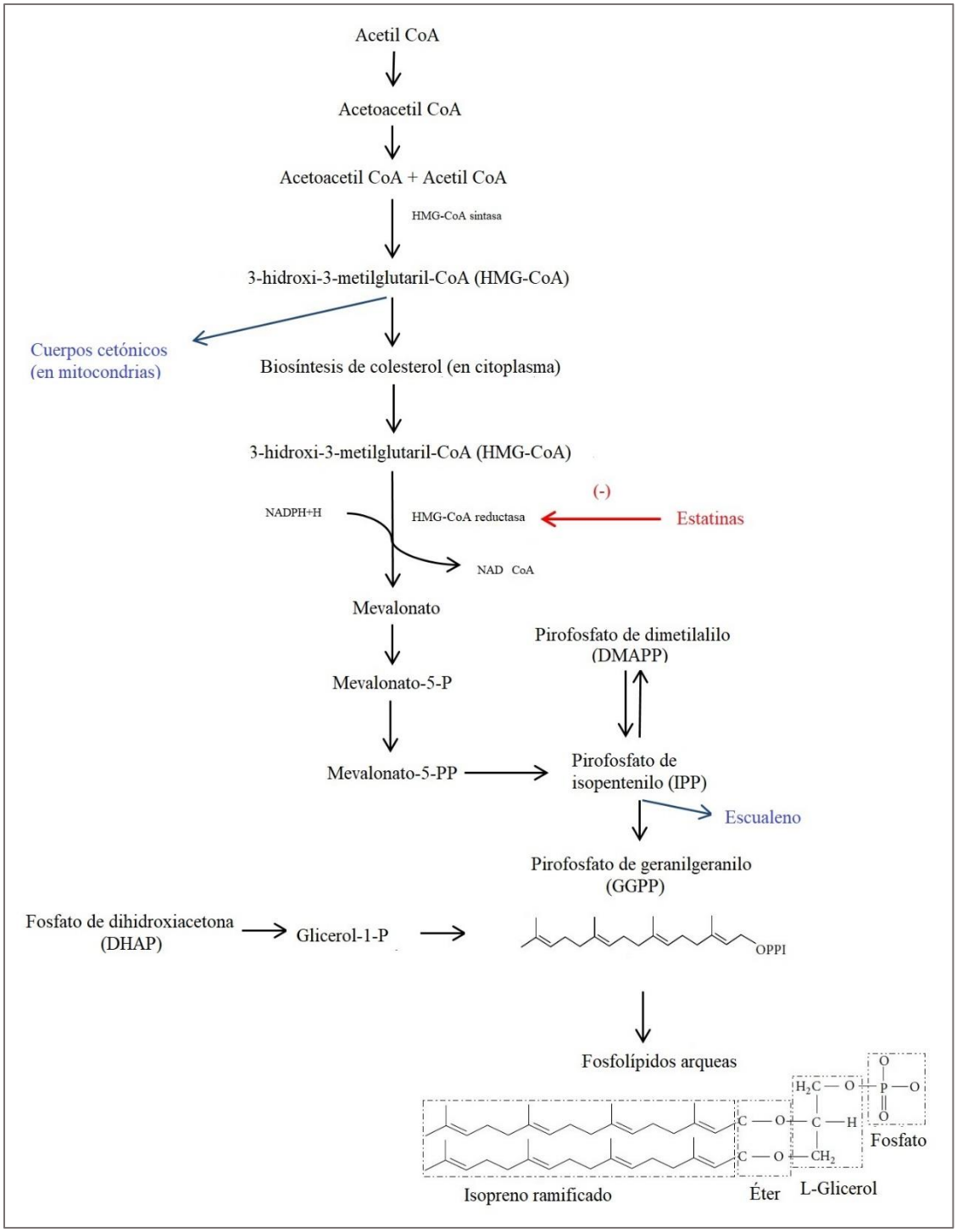


Figura 18 Objetivo de inhibición de las estatinas en la vía de síntesis de lípidos de la membrana plasmática de las arqueas. Fuente: Adaptado de Faseleh-Jahromi et al. (2013); Ábrego-García et al. (2021b). La flecha roja indica vía de inhibición.

Por otro lado, Jahromi et al. (2013) evaluaron el potencial de degradación de la lignocelulosa y la disminución de CH_4 de un extracto metanólico obtenido de paja de arroz sometido a fermentación sólida con *Aspergillus terreus*. La reducción de lignocelulosa fue significativa, pero afectó a la celulosa y a la hemicelulosa más que a la lignina. El uso de extracto enriquecido con lovastatina de paja de arroz fermentada disminuyó la producción de gas, la producción de CH_4 y aumentó la concentración de ácidos grasos de cadena corta, particularmente el acetato, mientras que la fermentación *in vitro* de la paja de arroz fermentada redujo la producción de CH_4 y las tasas de producción de gas, pero no se observó ningún efecto sobre la producción de AGCCt. Los autores señalaron que, aunque la adición de lovastatina pura suprime significativamente la metanogénesis, es demasiado costosa para utilizarla en las dietas de los rumiantes como estrategia de reducción del CH_4, y no así el uso de residuos agrícolas o forrajes fermentados con hongos productores de lovastatina (Ábrego-García et al., 2021a). La principal desventaja del uso de *A. terreus* estaría dada por la producción de enzimas celulolíticas de este último, que disminuyen los carbohidratos disponibles para la fermentación microbiana en el rumen, a diferencia de *P. ostreatus*, que se caracteriza por su producción de enzimas lignolíticas (Astudillo-Neira et al., 2022). En incubaciones *in vitro* de *Cenchrus clandestinus* (nombre común: Kikuyo, o Pasto africano) con 0,1 mg de lovastatina/mL de la mezcla tampón/inóculo provocó disminuciones en DIVMS (de 44 a 40%), en la producción de gas (113 a 97,5 ml/g DMi) y en CH_4 (14,7 a 10,1 ml/g DMi) (Ramírez et al., 2015). Estos autores atribuyeron la disminución del CH_4 al efecto tóxico de la lovastatina sobre las poblaciones metanogénicas. Akingemi and Ogunwole (2012) reportaron una disminución de 20% en la producción de metano por efecto de la biodegradación de paja de arroz con *P. ostreatus* durante 21 días, pasando de 12 a 10 ml de CH_4 a las 24 h. Por el contrario, Tuyen et al. (2013) no informaron de efecto sobre la producción de CH_4 al incubar rastrojo de maíz biodegradado por *P. ostreatus*, pero sí de mayores producciones en paja de arroz. Aunque los valores presentados en la literatura son variables, el efecto del pretratamiento con *P. ostreatus* en alimentos para rumiantes con alto contenido en fibra, sometidos a fermentaciones *in vitro* provoca una disminución de la producción de CH_4 o mantiene los niveles similares a los ingredientes no pretratados. Es de común acuerdo que la fibra (paredes celulares) aumenta la producción de CH_4, como resultado del aumento de la fermentación ruminal de carbohidratos estructurales asociado con una tasa de pasaje más baja y un aumento de la proporción acetato:propionato (Boadi et al., 2004). Sin embargo, dependiendo de la composición de estas paredes celulares, la fermentación puede verse limitada por la lignina

que puede tener un efecto de barrera sobre la celulosa y la hemicelulosa evitando el contacto directo de los microbios con el sustrato (Ellis et al., 2007; Kumari and Das, 2015). En nuestro estudio, la dieta alta en aADFom contenía más lignina en comparación con la dieta baja en aADFom (3,82 frente a 2,82% MS). Esta variación pudo limitar la fermentación de celulosa y hemicelulosa y, como tal, reducido la producción de gas y producción neta de CH_4 (30% menor en la dieta Alta en aADFom; Tabla 6). Esto fue parcialmente evidenciado por el aumento de la DIVMS de la dieta baja en aADFom (10% más que la dieta alta en aADFom) y resultó en una reducción de la producción y el rendimiento de CH_4 en las dietas altas en aADFom. Adicionalmente, se presentó una interacción significativa entre la aADFom dietética y la inclusión de H-PO en las dietas, sobre la producción y el rendimiento de CH_4. Esto se explica en la Figura 19, que indica que la producción y el rendimiento de CH_4 solo difieren entre las dietas altas y bajas en aADFom cuando se incluyeron 6% de H-PO.

Ácidos grasos de cadena corta totales (AGCCt)

La producción de AGCCt no se vio afectada por la inclusión de H-PO, aunque se observó una tendencia a disminuir tanto por el aumento de aFDAom y por aumento de H-PO (Tabla 8), pero aFDAom si aumentó la proporción molar de ácido acético, con dimiución de ácido propionico y ácido butírico. Por su parte H-PO tuvo efecto solo sobre la proporción molar de ácido acético y ácido propiónico. (Tabla 8). Badarina et al. (2013) reportaron valores de AGCCt a las 24 y 48 h similares a los de nuestro estudio, aunque la producción de AGCCt disminuyó significativamente a medida que se incluyó una mayor proporción de cascarilla de café fermentada con *P. ostreatus,* principalmente debido a una reducción en la DIVMS. Soto-Sánchez et al. (2015) reportaron incrementos en la producción de ácido propiónico y disminuciones de ácido acético en incubaciones *in vitro* de 48 h de paja de cebada, brote de cebada y combinación de ambos, pretratados en fermentación con *P. ostreatus*.

La inhibición de la enzima HMG-CoA reductasa por las estatinas presentes en el medio de crecimiento de *P. ostreatus* bloquea la vía de síntesis del mevalonato lo que implicaría la acumulación de HMG-CoA, dando como resultado la acumulación de sus precursores acetil-CoA y acetoacetil-CoA lo que podría ser responsable de la mayor proporción de producción de ácido acético (Arias-Islas et al., 2020). Esto podría ocurrir simultáneamente con una mayor degradación de la fibra por parte de los microorganismos, los cuales tendrán un mejor acceso a la matriz de la pared celular gracias a la acción de las enzimas lignolíticas (Nsereko et al., 2000) presentes en el micelio de *P. ostreatus* y al proceso de biodegradación previo a la fermentación ruminal, lo que da como resultado una mayor

proporción de acetato. El tipo de producto de fermentación generado a partir del piruvato depende de los microorganismos y las condiciones ruminales, como el pH y la tasa de dilución (Nagaraja, 2016). La ruta de fermentación de carbohidratos con dietas ricas en forraje generalmente, da como resultado un aumento de acetato, disminución de propionato y aumento de la producción de CH_4, mientras que cambiar a una dieta baja en forraje da como resultado una disminución de acetato, aumento de propionato y producción de CH_4 disminuye (Figura 19). La inclusión de heno biodegradado implicó una disminución en la producción y rendimiento de CH_4, acompañada de una mayor proporción de acetato, sugiriendo una mayor eficiencia energética para el huésped.

Estos resultados pueden parecer contradictorios, ya que el acetato en condiciones normales se correlaciona positivamente con la producción de CH_4. En este estudio, los aumentos en las proporciones de acetato no dieron como resultado una mayor producción de CH_4. Como tal, el aumento de la proporción de ácido acético puede haber sido compensado por la reducción de AGCCt y GP en la dieta alta en aADFom. Además, la inclusión de H-PO aumentó la DIVMS, sin afectar la GP. En este caso, los resultados sugieren que, si las estatinas fúngicas inhibieron los metanógenos, el flujo de hidrógeno también puede haber sido parcialmente redirigido a la formación de acetato reductivo (McAllister and Newbold, 2008).

$$\text{Acetogénesis reductiva } 4H_2 + 2CO_2 \rightarrow CH_3COOH + 2H_2O \quad \Delta G^{\circ\prime} = -104{,}6 \text{ KJ}$$

$$\text{Metanogénesis } 4H_2 + CO_2 \rightarrow CH_4 + 2H_2O \quad \Delta G^{\circ\prime} = -135{,}6 \text{ KJ}$$

Como se ve en los balances presentados, los acetógenos no pueden competir termodinámicamente por el H_2 con los metanógenos, pero en un medio donde los metanógenos están inhibidos, el hidrógeno fluirá hacia vías alternativas que incluyen la acetogénesis reductora (Figura 19) a través de la vía Wood-Ljungdahl (Choudhury et al., 2022), aumentando así las proporciones de acetato. Este aparente aumento de la eficiencia energética no estuvo acompañado por una mejora en la eficiencia de la alimenticia debido a la mayor relación A:P. Una disminución en la relación A:P en el rumen indica una mayor eficiencia alimenticia, porque el acetato no es gluconeogénico en los tejidos animales y gran parte se oxida o disipa en forma de calor en los tejidos; en cambio, la cantidad de propionato es proporcional al contenido de carbohidratos no fibrosos de la dieta (Zuo et al., 2018; Wu et al., 2016).

pH

Los cambios en los valores de pH están dentro de los rangos considerados normales para la fermentación ruminal, como se esperaba cuando se usa buffer Menk (Menke et al., 1979). A pesar de que aADFom y H-PO aumentaron significativamente, la magnitud de los cambios fue bastante baja y no afectó los resultados de la fermentación.

d) Aplicaciones y desafíos

Aunque el uso de enzimas para mejorar la digestibilidad del rumen es una innovación conocida, el alto costo de las enzimas purificadas sigue siendo una limitante. La inclusión de heno biodegradado de *P. ostreatus* representa no solo una forma de incluir enzimas exógenas al ambiente ruminal, sino también heno con matriz lignocelulósica en degradación parcial, gracias al tratamiento de 14 días. El uso de este heno biodegradado ha mostrado en este experimento resultados alentadores, no solo en la mejora de la desaparición de materia *in vitro*, sino también en la disminución de la producción de CH_4. A partir de estos resultados, los dos principales desafíos son escalar la tecnología de biodegradación del heno y otros materiales con alto contenido de lignina utilizados en la alimentación animal para alcanzar volúmenes que permitan estudios *in vivo*, y esclarecer las modificaciones que se producen en los productos de la fermentación ruminal y rendimiento de los rumiantes.

a) Conclusiones

Los resultados indican que la inclusión de heno pretratado de *Pleurotus ostreatus* en dietas para rumiantes tanto altas como bajas en aADFom mejora la desaparición *in vitro* de la materia seca, reduce la producción de CH_4 de una manera dosis dependiente. Este procedimiento tiene el potencial de ser considerado en el futuro, una alternativa de alimentación respetuosa con el medio ambiente.

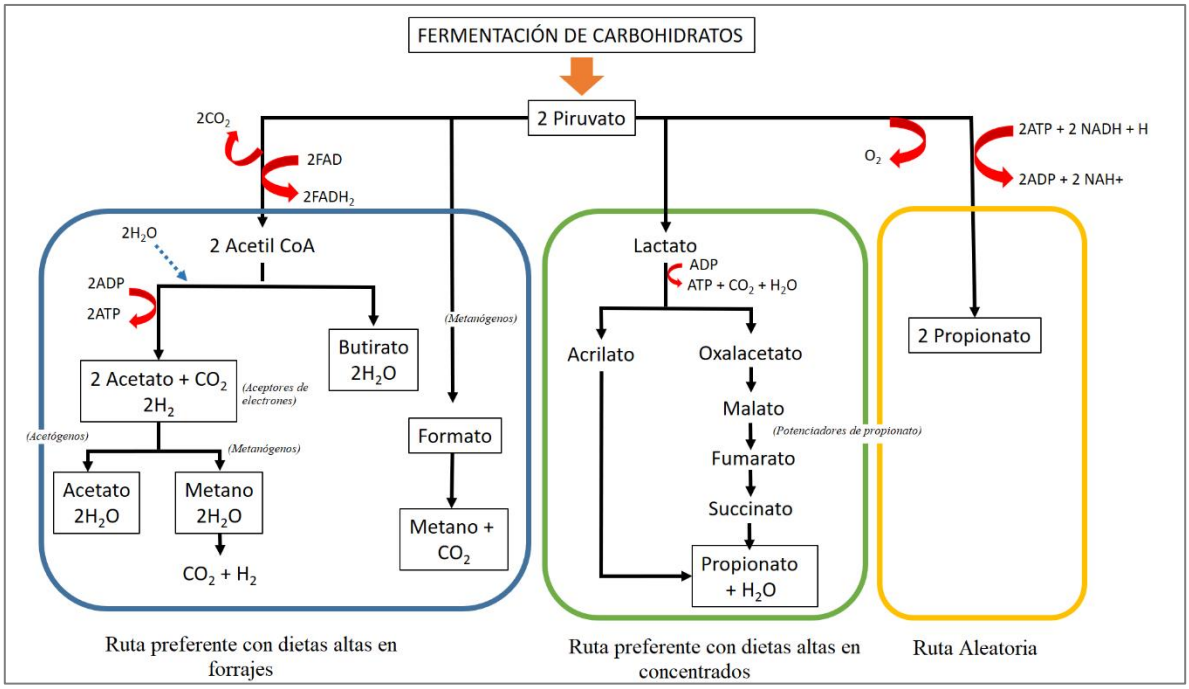


Figure 19 Diagrama de fermentación de carbohidratos a nivel ruminal, indicando productos finales (AGCCt) y metano, además de algunos de los objetivos potenciales para reducir las emisiones de CH_4 de los rumiantes indicados en cursiva. Fuente: Modificado de Patra (2012a), Ramírez et al. (2014) y Arias-Islas et al. (2020).

Experimento 3. Uso combinado de heno pretratado con *P. ostreatus* en dieta alta en forraje y uso combinado de *Saccharomyces cerevisiae* como aditivo de fermentaciones ruminales *in vitro*.

Etapa 1.- Obtención de inoculo de *Saccharomyces cerevisiae*, para utilización como DFM en fermentaciones ruminales *in vitro*.

Todas las fases de esta etapa se realizaron en el Laboratorio de Síntesis y Biotransformación de Productos Naturales, Dpto. Ciencias Básicas, Universidad del Bío-Bío, Chillán, Chile.

a) Materiales y Métodos

Material biológico.

Se utilizó una muestra se material biológico de levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Meyen ex E.C. Hansen), tipo panificadora, perteneciente a la colección de Macromicetos de la Universidad del Bio Bio, la cual permanecía bajo refrigeración (4° C).

Activación de crecimiento de *S. cerevisiae*.

Las muestras de interés fueron incubadas en una solución de sacarosa al 2% en oscuridad a 25° C (Heating incubator DHP-9052), en matraces Erlenmeyer de 250 ml, de manera tal de conseguir reiniciar la actividad de la levadura, durante 5 días. Durante este periodo se consideró como condición excluyente las muestras la presencia se contaminación.

Crecimiento *de S. cerevisiae*.

Finalizado el periodo de activación, muestras de 100 ml del medio de sacarosa con *S. cerevisiae*, fueron mezclados con 150 ml de medio de crecimiento (Salari and Salari, 2017) para continuar el proceso de incubación a 25°C en oscuridad. El medio de cultivo sintético fue formulado con (para 2 L de solución): 10 g KH_2PO_4, 4 g $(NH_4)_2$ SO_4, 0,8 g MgSO4, 2 g extracto de levadura y 10 g glucosa.

Observaciones diarias (5 días) fueron realizadas al microscopio óptico de manera tal de monitorear el aumento de población de levaduras y ausencia de contaminación.

Recuento Unidades Formadoras de Colonias (UFC).

Para estimar el número de levaduras presentes después de 5 días de crecimiento, fue realizado recuento de UFC, realizando siembra en placas Petri con agar PDA con diluciones seriadas (10^1 a 10^6) de *S. cerevisiae*, las cuales fueron incubadas a 35°C en oscuridad (Heating incubator DHP-9052) (**Figura 20**). Las evaluaciones o conteo de UFC fueron realizadas a las 2, 4, 8, 24, y 28 horas. El número final de microorganismos por gramos de pellet fue calculado como: (Número de colonias * Factor de dilución) / Volumen de siembra

= UFC/g (Shurson, 2018).

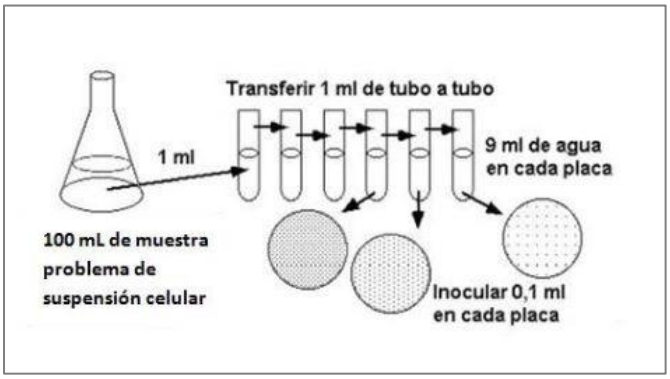


Figura 20 Diagrama de realización de dilusiones seriadas para conteo de unidades formadoras de colonia. Fuente: Altamirano (2013).

Obtención de cultivo de *S. cerevisiae*.

El contenido de los matraces fue centrifugado en tubos Eppendorf a 2000 rpm/15 minutos a 20°C. Luego de separado el sobrenadante, el cultivo fue pesado y congelado a -20°C hasta su uso (**Figura 16**).

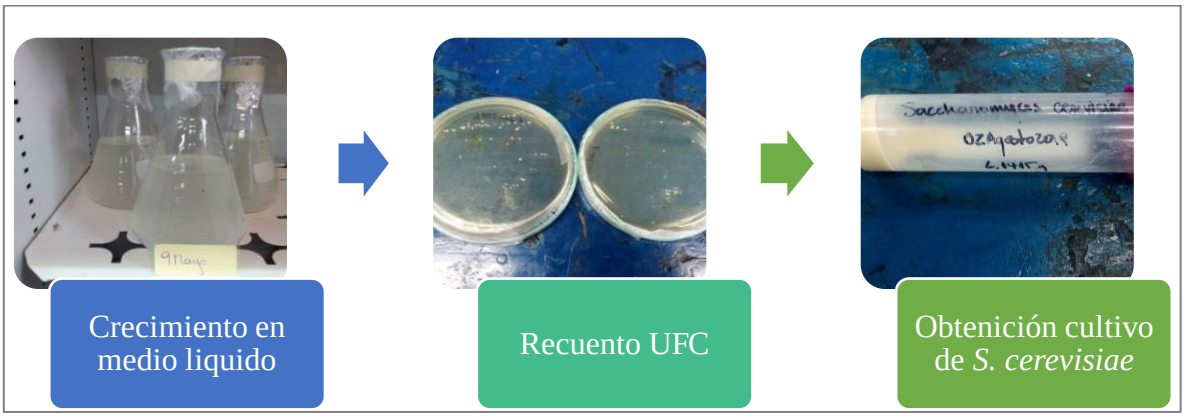


Figura 21 Diagrama de obtención de cultivo de *S. cerevisiae*

b) Resultados

Fueron realizados tres ciclos de crecimiento de *S. cerevisiae* para la obtención de pellet, en los meses de agosto, octubre y diciembre de 2019.

Obtención de cultivo. En total se obtuvieron 32,31 g de cultivo húmedo de *S. cerevisiae*, a partir de 1,170 ml de medio de crecimiento con levadura, después de centrifugado y separado del sobrenadante. Este cultivo tuvo un valor promedio de 1.540.000 (1,54 x 10^6)

UFC/ml. Este producto se considera un cultivo de levadura, ya que es un producto de fermentación, el cual tiene la levadura propiamente tal y los subproductos metabólicos producidos por estas durante la fermentación (Opsi et al., 2012; Shurson, 2018).

c) Discusión.

Dentro de los métodos de cultivo, se considera que el cultivo en batch o lote, es el que ofrece mayor simpleza de manejo, en el cual los organismos crecen en un volumen fijo de nutrientes que continuamente es alterado hasta su agotamiento por el crecimiento (Nieto, 2009). La técnica de cultivo de *S. cerevisiae* empleada implicó el uso de un medio de cultivo que contenía KH_2PO_4, $(NH_4)_2$ SO_4, $MgSO_4$, extracto de levadura y glucosa, lo cual implica que *S. cerevisiae* tuvo adecuado sumistro de carbono y nitrógeno, además de munerales. Esto se diferencia, por ejemplo, de la investigación de Darwish et al. (2012) ya que ellos utilizaron caldo de peptona con glucosa y extracto de levadura como medio de crecimiento, o el de Phesatcha et al. (2020), que emplearon extracto de malta con cloranfenicol.

Las levaduras necesitan oxígeno, fuentes de carbono orgánico y nitrógeno mineral u orgánico, diversos minerales y, temperatura y pH adecuados, algunas además necesitan de una o varias vitaminas y otros factores de crecimiento (Aguilar et al., 2015), como azufre y magnesio (Salari and Salari, 2017). Entre las principales fuentes de nitrógeno están el amoníaco, sales amónicas, nitratos, harina de soya, sangre deshidratada, solubles de destilería, germinado de cebada, lactosuero y bagazo de cebada (Aguilar et al., 2015; Salari and Salari, 2017). Las células de levaduras obtienen sus nutrienes por producción y liberación de enzimas que digieren la materia orgánica o mediante absorción de aminoácidos y monosacáridos, a través de la pared celular (Baron, 1996).

Esta técnica para producción de cultivos de levadura, implica que después de la inoculación del medio y crecimiento de las células, es secado todo el medio fermentado, lo hace que este producto contenga además de las células de levadura vivas y muertas, los productos de la fermentación de los azucares del medio, que generalmente son metabolitos que incluyen péptidos, alcoholes, ésteres y ácidos orgánicos. Por lo tanto, los cultivos de levadura son aditivos alimentarios únicos que contienen varios metabolitos indefinidos que pueden tener efectos beneficiosos para la salud y la nutrición de los animales, pero no se consideran una fuente de nutrientes en la alimentación animal (Shurson, 2018).

d) Conclusión

Mediante el procedimiento experimental fue posible obtener un inoculo de *Saccharomyces cerevisiae* para utilización en fermentaciones ruminales.

Etapa 2.- Evaluación de uso combinado de heno biodegradado con *P. ostreatus* y *S. ceverisiae*.

Este experimento se realizó en el Laboratorio de Sistemas Ganaderos y Nutrición de la Universidad de Concepción (UdeC), Chillán, Chile. El cuidado y manejo de las vacas fue certificado por el comité de bioética y bienestar animal de la UdeC.

a) Materiales y Métodos

Diseño experimental y tratamientos

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con arreglo factorial de 2 x 3. El primer factor fue inclusión de heno biodegradado con *P. ostreatus* (H-PO) y el segundo factor la inclusión de *S. cerevisiae* (SC), de tal manera que se evaluaron 6 tratamientos (Tabla 9), T1, T2, T3, con 0% de inclusión de H-PO, y T4, T5 y T6 con 6% inclusión H-PO.

Tabla 9 Tratamientos evaluados según la inclusión de heno biodegradado con *P. ostreatus* (H-PO) y el tipo de *S. cerevisiae* (SC) en una dieta rica en fibra.

Inclusión H-PO (%)	***S. cerevisiae***[1] (SC)		
	Sin SC	**Yea Sacc®**	**Cepa UBB**
0	Tratamiento 1	Tratamiento 2	Tratamiento 3
6	Tratamiento 4	Tratamiento 5	Tratamiento 6

[1]Dosis recomendada de *S. cerevisiae* de 250.000 UFC.

Los tratamientos fueron diseñados para evaluar la posible sinergia entre *P. ostreatus* y dos cultivos de *S. cerevisiae* sobre una dieta alta en forraje en un sistema de fermentación discontinuo *in vitro* (batch). Las cepas de *S. cerevisiae* corresponden a la cepa comercial Yea Sacc® 1026 suministrado por la empresa AllTech Inc. (USA) y una cepa tipo panificadora (cepa UBB) de la colección de Macromicetos de la Universidad del Bio Bio.

Las dosis de los aditivos fueron de 6% para H-PO, en base a los resultados del experimento anterior, mientras que la dosis de *S. cerevisiae* Yea Sacc® fue la dosis comercial sugerida por el fabricante de 0,00025g (250µg) equivalentes a 250.000 UFC (Dosis comercial 10 g/vaca, considerando dosis para 1 vaca lechera con consumo de 20 kg MS diario, y tomando en cuenta que el producto comercial tiene 1 x 10^8 UFC/g base tal como ofrecido). El inoculo de *S. cerevisiae* obtenido a partir de cepa comercial panificadora tiene 1,54x10^6 UFC/g base tal como ofrecido, por lo que la dosis a incluir fue 0,16g (160000µg), equivalentes a 250.000 UFC. Fue seleccionada una dieta alta en fibra para evaluar la respuesta de los aditivos heno biodegradado con *P. ostreatus* (H-PO) y *S. cerevisiae*

combinados. Esta corresponde a una dieta alta en forraje calculada para aportar sobre 30% de aFDAom (NRC, 2001), formulada utilizando el programa Large Ruminant Nutrition System (LRNS), versión 1.0.33 (Tabla 10). El heno biodegradado (H-PO) (Tabla 10), fue obtenido a partir de fermentación sólida de Heno de Ballica-Festuca (*Lolium perenme-Festuca arundinacea*) durante 14 días con *P. ostreatus* cepa 136 UBB. Adicionalmente, de un extracto de H-PO fue medida la actividad enzimática de lignina peroxidasa 19,51 U/L, manganeso peroxidasa 6,68 U/L, y lacasa 34,17 U/L (Astudillo-Neira et al., 2022).

Tabla 10 Ingredientes y composición química de la dieta y heno biodegradado utilizados para incubaciones *in vitro*.

Ingredientes, % de MS			**Dieta alta aFDAom[2]**
Forrajes	Ensilaje de maíz		32
	Heno trébol/ballica		15
	Paja de trigo		25
	Vinaza de achicoria		6
Concentrados	Maíz grano molido		5
	Maíz grano húmedo		5
	Harina de soya		1
	Concentrado comercial[6]		10
	Mezcla Vitaminas y Minerales		1
Composición quimica (%)	**Heno antes de fermentación estado solida[5]**	**H-PO[4]**	**Dieta alta aFDAom[2]**
Materia seca (MS)	91,29	14,52	91,43
Cenizas totales (CT)	4,41	3,83	8,57
Proteína cruda (PC)	4,73	5,16	12,73
Extracto etéreo (EE)	1,30	1,10	1,84
Energía Metabolizable (EM)[7]	2,01	1,95	2,13
aFDNom[1]	68,72	64,87	42,38
aFDAom[2]	42,45	42,05	35,30
LDA[3]	5,88	1,92	3,82

[1]aFDNom: Fibra detergente neutro, [2]aFDAom: Fibra detergente ácido sin ceniza residual, [3]LDA: Lignina detergente ácida, [4]H-PO: Heno biodegradado con *P. ostreatus*, [5]Heno de ballica-festuca antes de fermentación estado sólida con *P. ostreatus*, [6]Concentrado Cosetán® vaca lechera No.15 (MS 88,7%, PC 19,0%, EM 2,93 Mcal/kg MS, EE 1,7%, aFDNom 32,5%), [7]EM expresada como Mcal/kg MS, calculada después según Bath and Marble (1989) y Khalil et al. (1986). Todos los ingredientes, excepto H-PO fueron liofilizados antes de moler y mezclar.

Inóculo e incubaciones *in vitro*.

Dos vacas Aberdeen Angus adultas, no lactantes, canuladas fueron usados como donantes de fluido ruminal. Estas vacas fueron alimentados con una dieta relación forraje:concentrado de 70:30 por dos semanas previas al experimento. Dos horas después de la alimentación, fueron colectadas muestras del contenido ruminal, las cuales fueron mezcladas y filtradas por 4 capas de gasa, transportadas a laboratorio en contenedores térmicos precalentados a 39°C (Ávila et al., 2011). El inóculo para la fermentación se preparó mezclando el licor ruminal con una solución de incubación (Menke et al., 1979) en una proporción 1:3. Muestras de 25 mL del inóculo fueron transferidos a las botellas de suero ámbar (50 mL), insuflando CO_2 de manera constante hasta el sellado de las botellas. Estas botellas contenían bolsas filtrantes ANKOM® -F57, con 500 mg de cada tratamiento. Se incluyeron viales con blancos que solo incluyeron inóculo para realizar corrección de la producción de gas (Ávila et al., 2011). La incubación se realizó a 39°C (Forma Series II 3110 Water-Jacketed CO_2 Incubator, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) sobre un agitador orbital (Heidolph Unimax 2010, Schwabach, Germany) a 90 oscilaciones/minuto. Por cada tratamiento y horario de muestreo (24 y 48 h) se incubaron tres replicas y la incubación completa fue realizada tres veces en semanas consecutivas. El total de botellas a incubar fue de 120 [(6 tratamientos x 3 replicados + 2 blancos) x 2 horarios x 3 corridas semanales].

Estimacion de la producción de gas ruminal, CH_4 y desaparición de materia seca

La producción de gas de cada botella se midió a las 0, 6, 12, 24 y 48 h de incubación, mediante desplazamiento de agua (Fedorah and Hrudey, 1983). La producción fue ajustada mediante el modelo no lineal de Gompertz (Schofield *et al*., 1994): $y = b \exp\{-\exp[1-c\ (t-L)]\}$, donde: y es la PG (mL/g MS incubada [MSi]) al tiempo t (h); b es la producción asintótica de gas (mL/g MSi); c es la tasa de producción (/h); y L es el retraso inicial de la producción (h). t: tiempo (h), en esta ecuación fue considerada la producción en tiempo cero. Tras el muestreo de gas, se abrieron las botellas para medir el pH (Thermo Scientific, medidor portátil de pH Orion Star A121, USA) y retirar las bolsas ANKOM®-F57. Las bolsas se lavaron y se secaron a 60 °C durante 24 h para determinar la desaparición de la materia seca (DIVMS) (Vera et al., 2018). Se calculó el Factor de Partición (FP) para 24 h de incubación, este es la relación entre la MS degradada (MSd; mg) y el volumen neto de gas (mL), y representa una medida de la eficiencia de la fermentación (Blümmel et al., 1997).

Antes de cada medición de producción de gas, una muestra de 15 mL de gas fue tomada con jeringa y transferida a tubos Exetainers (Labco Ltd., High Wycombe, Buckinghamshire,

UK), de 5,9 mL para la determinación de la concentración de CH_4 por cromatografía de gases (GC; Agilent 7890B, Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA) utilizando una columna GS-CarbonPLOT de 30 m × 0,32 mm x 3 µm (GS–CarbonPLOT, Agilent Technologies, Italy) y detector de conductividad térmica (Ávila et al., 2011). Se utilizó Helio fue usado como gas carrier a un flujo de 1,33 mL/min, y una temperatura de horno isotérmica de 35 °C. La temperatura del inyector y del detector se fijó en 185 °C y 150 °C, respectivamente (Vera et al., 2021). Para la preparación de los estándares se utilizó gas metano de calidad analítica (99,99%) (Linde®, Santiago, Chile). Los estándares de CH_4 (15, 10, 7,5, 5,0, 2,5 y 1,0%) se prepararon diluyendo gas CH_4 stock con gas N_2 a temperatura ambiente.

Determinación del contenido de nitrógeno amoniacal (N-NH_3) y ácidos grasos de cadena corta (AGCC)

Desde las fracciones líquidas de la fermentación, al inicio de la incubación (0 h) y luego de retirar las bolsas (24 y 48 h), se tomaron muestras para determinar N-NH_3 y AGCC, como indicadores de la fermentación de proteínas y carbohidratos (Ávila et al., 2011). Desde cada botella se extrajeron dos muestras de 1,5 mL, las que se transfirieren a dos viales (Biologix Research Co., USA) de 2 mL; uno con 150 µL de ácido tricloroacético (ATC) (0,65; p/v) para AGCC y otro con 300 µL de ácido metafósforico (0,25; p/v), para determinación de N-NH_3, posteriormente centrifugadas y filtradas, y almacenadas a -20°C hasta su análisis. Las concentraciones de ácidos grasos, acético, propiónico, butírico y totales se analizaron por cromatografía de gases (Agilent 7890B; Agilent Tecnologies, Inc., Santa Clara, CA, USA) equipado con columna de acero inoxidable de 30 m (DB-FFAP, Agilent Tecnologies, Milan, Italia) y detector de ionización de llama (FID). La concentración de N-NH_3 fue determinada por espectrofotómetro UV-VIS (Microplacas Epoch™ Biotek Instruments, Highland Park, USA) aplicando el método de Berthelot, a una longitud de onda de 625 nm (Rhine et al.,1998). La estimación de producción de proteína microbiana (PPM), se calculó según Blümmel et al. (1997): PPM (mg/g MS) = mg MSd - (mL gas × 2,2 mg/mL) donde: 2,2 mg/mL es un factor estequiométrico que expresa los mg de C, H_2 y O_2 requeridos para la producción de AG de cadena corta asociados con la producción de 1 mL de gas (Figura 22).

Análisis estadístico

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con arreglo factorial de 2x3, considerando dos niveles de heno biodegradado con *P. ostreatus* (H-PO) (0 y 6% de inclusión) y tres niveles de *S. cerevisiae* (0% de inclusión, 250.000 UFC de Yea Sacc®1026

y 250.000 UFC de *S. cerevisiae* cepa UBB), realizando un análisis de varianza (ANOVA) en el programa STATA 14 (StataCorp LP, College Station, Texas, USA) (StataCorp 2015), utilizando el siguiente modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_j + \beta_k + (\alpha\beta)_{jk} + \varepsilon_{ijk,}$$

donde Y_{ijk}: valor observado, μ: media general (producción de gas, pH, CH_4 DIVMS, N-NH_3 y AGCC), δ efecto de incubación (aleatorio), α_j: efecto factor 1 (H-PO, efecto fijo), β_k: Efecto factor 2 (*S. cerevisiae*, efecto fijo), $(\alpha\beta)_{jk}$: Interacción entre factores y ε_{ijk}: error, Cuando $p<0,05$ se realizó comparación de medias a través de prueba Tukey. Fue definida tendencia estadística cuando $p> o = 0,05$ y $p<0,1$.

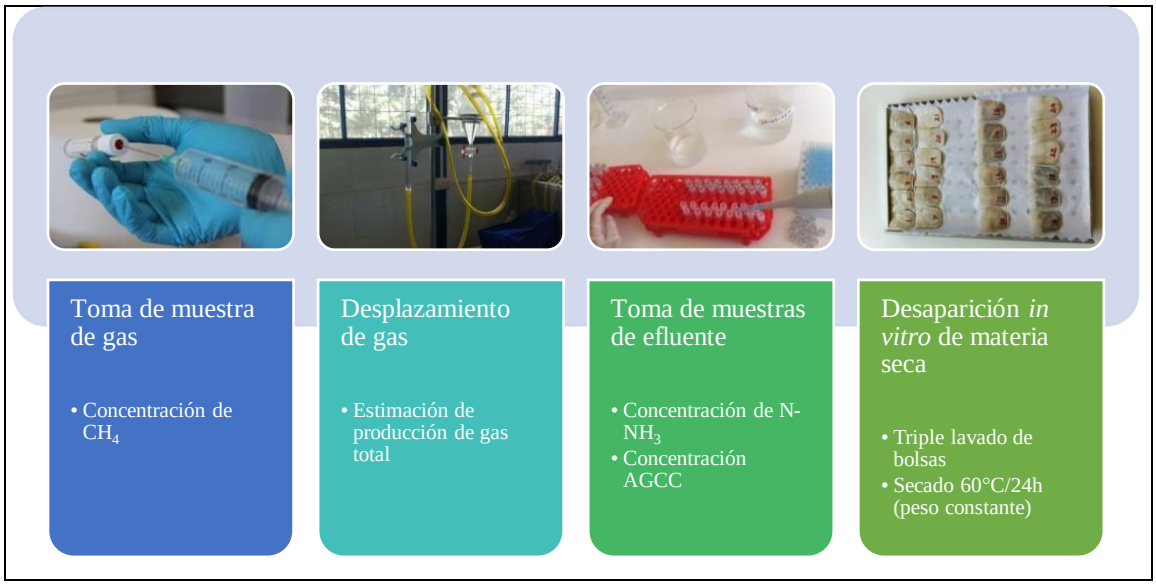


Figura 22 Diagrama de flujo de evaluaciones realizadas durante y después de incubación *in vitro.*

b) Resultados

Desaparición *in vitro* de materia seca (DIVMS)

El uso de heno biodegradado con *P. ostreatus* (H-PO), resultó en un incremento en la desaparición *in vitro* de la materia seca (DIVMS) ($p<0,001$) a las 24 h, y ($p<0,001$) a las 48 h. El uso de Yea Sacc® no generó diferencias en relación al tratamiento control, pero si el uso de SC cepa UBB, pasando de 59,60% a 64,44% ($p<0,001$) a las 24 h, y de 68,79% a 73,30% ($p<0,001$) a las 48 h de incubación *in vitro* (Tabla 11). Existió interacción entre ambos factores en ambos horarios de incubación ($p=0,024$ y $p=0,001$ para 24 y 48 h, respectivamente); En el análisis gráfico de las interacciones se observa que, a las 24 h, el uso de SC – UBB tubo un efecto diferente sobre DIVMS, que la dieta control y la dieta con

Yea Sacc®, cuando la dieta no incluyó H-PO, registrándose una mayor DIVMS. Esta situación no fue registrada en la dieta con 6% de H-PO, donde los comportamientos fueron similares (Figura 23). A las 48 h de incubación DIVMS presentó el mismo comportamiento ya descrito para las 24 h, lo que implicó efecto significativo de H-PO ($p<0,001$), SC ($p< 0,001$) y la interacción de estos ($p=0,001$) (Tabla 11; Figura 24).

Producción de gas

A las 24 h de incubación *in vitro*, la producción de gas no fue afectada por inclusión de H-PO ($p=0,208$), por el tipo de *S. cerevisiae* ($p=0,256$), ni interacción ($p=0,247$). Sin embargo, a las 48 h, la inclusión de 6% de H-PO redujo la producción de gas ($p=0,001$) pasando de 127,17 a 111,42 mL/g MSi, pero el tipo de *S. cerevisiae* no implicó efecto ($p=0,190$) (Tabla 11). La producción de gas fue ajustada mediante el modelo de Gompertz y mostró reducciones en la producción asintótica de gas (b) (mL/g MSi) por efecto de la inclusión de 6% de H-PO ($p=0,001$), mientras que la tasa de producción de gas (c; (/h)), aumentó por la inclusión de H-PO ($p=0,023$), como por el tipo de *S. cerevisiae* ($p=0,025$), específicamente con la dieta con SC – UBB en comparación a la dieta control y la dieta con Yea Sacc®. La fase Lag (h), no fue afectado por la inclusión de 6% de H-PO ($p=0,696$) o el tipo de *S. cerevisiae* ($p=0,762$). En los parámetros de producción de gas las interacciones no fueron significativas.

Factor de partición,

En ambos horarios, el factor de partición aumentó por efecto de la inclusión de 6% de H-PO, pasando a las 24 h de 6,44 a 7,74 mg/mL ($p=0,048$) y a las 48 h, de 5,24 a 6,69 mg/mL ($p<0,001$). Por su parte, la adición de *S. cerevisiae* presentó resultados diferentes según se trato de la cepa comercial o la cepa de UBB, con diferencias significativas a las 24 ($p=0,050$) y 48 h ($p=0,009$). La inclusión de Yea Sacc® disminuyó el FP, pasando de 7,02 a 6,13 mg/mL a las 24 h, y de 5,82 a 5,56 mg/mL a las 48 h. Mientras que, FP aumentó de 7,02 a 8,11 mg/mL cuando a la dieta se le adicionó SC – UBB a las 24 h y de 5,82 a 6,52 mg/mL a las 48 h. Las interacciones entre ambos factores no fueron significativas en los dos horarios de evaluación (Tabla 11).

Tabla 11 Parámetros de fermentación y de cinética de gas de incubación *in vitro*, según inclusión de heno biodegradado con *P. ostreatus* (H-PO) y *S. cerevisiae* (SC) en dieta.

		DIVMS[2], %		PG[3], mL/g MSi[6]		FP[4], mg/mL		Parametros producción de gas[5]		
Items		24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	b	c	L
Heno biodegradado con *P. ostreatus* (H-PO)	0%	57,66 ^{B}	66,18 ^{B}	94,64	127,17 ^{A}	6,44 ^{B}	5,24 ^{B}	124,79 ^{A}	0,13 ^{B}	0,43
	6%	63,81 ^{A}	72,75 ^{A}	88,48	111,42 ^{B}	7,74 ^{A}	6,69 ^{A}	105,48 ^{B}	0,24 ^{A}	0,62
	EEM[1]	0,67	0,71	3,45	2,63	0,45	0,17	2,98	0,03	0,33
	Valor-*p*	<0,001	<0,001	0,208	0,001	0,048	<0,001	0,001	0,023	0,696
S. cerevisiae[8]	Sin (Control)	59,60 ^{B}	68,79 ^{B}	91,52	120,11	7,02 ^{AB}	5,82 ^{AB}	116,77	0,14 ^{B}	0,33
	Yea Sacc®	58,16 ^{B}	66,29 ^{B}	96,55	123,04	6,13 ^{B}	5,56 ^{B}	121,02	0,14 ^{B}	0,50
	SC UBB	64,44 ^{A}	73,30 ^{A}	86,60	114,73	8,11 ^{A}	6,52 ^{A}	107,62	0,27 ^{A}	0,75
	EEM[1]	0,83	0,88	4,27	3,15	0,56	0,22	3,65	0,03	0,40
	Valor-*p*	<0,001	<0,001	0,256	0,190	0,050	0,009	0,063	0,025	0,762
Interacción H-PO y SC	0%-Sin SC	55,22 ^{b}	63,11 ^{b}	100,15	129,02	5,57	4,91	126,59	0,13	0,49
	0%-Yea Sacc®	54,52 ^{b}	62,47 ^{b}	98,33	130,84	5,57	4,78	128,32	0,12	0,17
	0%-SC UBB	63,22 ^{a}	72,96 ^{a}	85,43	121,64	9,19	6,03	119,46	0,14	0,63
	6%-Sin SC	63,98 ^{a}	74,47 ^{a}	82,89	111,20	8,48	6,73	106,94	0,15	0,16
	6%-Yea Sacc®	61,79 ^{a}	70,12 ^{a}	94,77	115,23	6,70	6,35	113,73	0,15	0,82
	6%-SC UBB	65,65 ^{a}	73,65 ^{a}	87,77	107,83	8,04	7,00	95,78	0,40	0,87
	EEM[1]	0,01	0,01	5,86	4,73	0,77	0,30	5,16	0,05	0,57
	Valor-^{p}	0,024	0,001	0,247	0,906	0,155	0,365	0,686	0,053	0,693

$^{A-B}$ Medias con superíndice en mayúscula indican diferencias estadísticas dentro del factor principal dentro de una columna (p<0,05); tendencia 0,05> o = 0,01.

$^{a-d}$ Medias con superíndice en minúsculas indican diferencias estadísticas entre interaccion H-PO y SC (combinaciones de factores principales) dentro de una columna (p<0,05).

[1]Error estándar de la media (división de la desviación estándar por la raíz cuadrada del tamaño muestral), [2]Desaparición de materia seca *in vitro*, [3]Producción de gas, [4]Factor de partición, [5]b: producción asintótica de gas (mL/g MS incubada); c: tasa de producción de gas (/h); L: retraso inicial antes de que comience la producción de gas (h), [6]MSi: Materia seca incubada, [7]Interacción entre inclusión H-PO y tipo SC, [8]*Saccharomyces cerevisiae* dosis de 250.000 UFC.

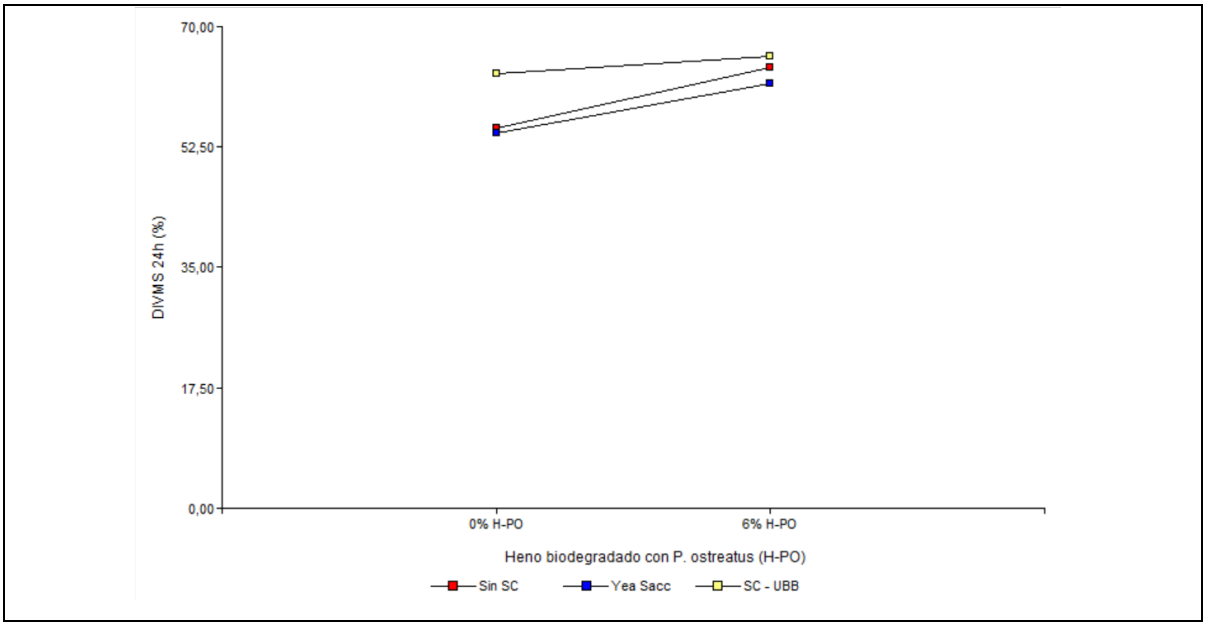


Figura 23 Interacción de la inclusión de *S. cerevisiae* × concentración de H-PO en dieta alta en aFDAom, sobre la desaparición *in vitro* de materia seca a las 24 h.

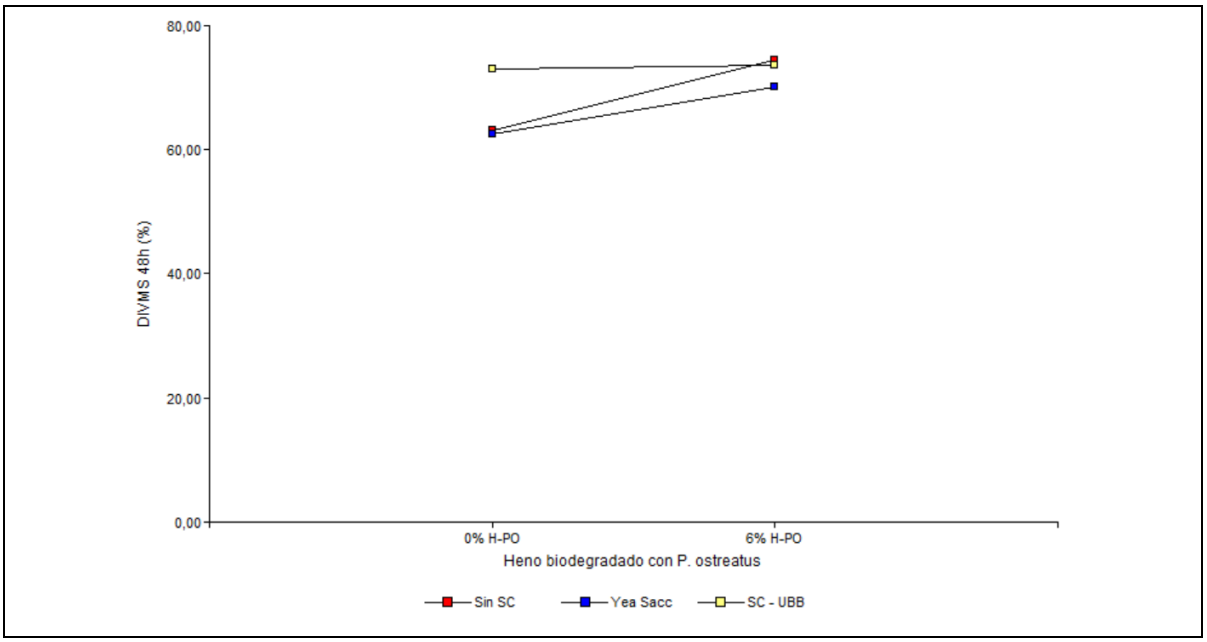


Figura 24 Interacción de la inclusión de *S. cerevisiae* × concentración de H-PO en dieta alta en aFDAom, sobre la desaparición *in vitro* de materia seca a las 48 h.

Concentración de nitrógeno amoniacal.

A las 24 h la concentración de N-NH_3, disminuyó por la inclusión de 6% H-PO, de 0,18 a 0,10 mg/dL ($p<0,001$), pero el tipo de *S. cerevisiae* no generó efecto ($p=0,891$). A las 48 h, el comportamiento fue similar, disminuyendo por efecto de la inclusión de 6% de H-PO, de 0,38 a 0,26mg/dL ($p=0,001$), pero sin efecto por el tipo de *S. cerevisiae* ($p=0,689$). La interacción de ambos factores no fue significativa en los dos horarios de incubación ($p=0,232$ y $p = 0,716$ a las 24 y 48 h, respectivamente) (Tabla 12).

Producción de proteína microbiana (PPM)

La producción estimada de proteína microbiana a las 24 h, fue reducida por la inclusión de H-PO ($p=0,001$), pasando de 163,54 a 135,54 mg/g MS, pero no fue afectada por el tipo de *S. cerevisiae* ($p=0,065$), con una media de 161,60 mg/g de MS en dieta sin *S. cerevisiae*, 147,10 mg/g de MS en dieta con Yea Sacc® y 139,10 mg/g de MS en la dieta con SC – UBB.

A las 48 h, la disminución de PPM se presentó tanto por la inclusión de H-PO ($p=0,001$), como por la inclusión de *S. cerevisiae* ($p=0,001$). La dieta sin H-PO tuvo una producción estimada de 169,17mg/g MS, mientras que con 6% de H-PO fue de 147,45 mg/g MS; 173,36 mg/g MS en la dieta sin *S. cerevisiae*, 156,02 mg/g MS en la dieta con Yea Sacc® y 145,55 mg/g MS en la dieta con SC - UBB. (Tabla 12). En ambos tiempos de incubación, las interacciones de ambos factores resultaron ser significativas ($p<0,001$). La representación grafica de las interacciones muestra que a las 24 h de incubación (Figura 25), PPM en dieta alta en fibra sin H-PO muestra un alza significativa por efecto de SC-UBB, pero cuando esta cepa de *S. cerevisiae* se mezcla con 6% H-PO la estimación de PPM disminuye. La situación descrita se repitió a las 48 h de incubación (Figura 26).

Tabla 12 Producción de nitrógeno amoniacal y producción de proteína microbiana, según concentración de Heno biodegradado con *P. ostreatus* (H-PO) y *S. cerevisiae* (SC) en dieta en incubación *in vitro* a las 24 y 48 h

Items		N-NH_3 (mg/dL)[1] 24 h	N-NH_3 (mg/dL)[1] 48 h	PPM (mg/g MS)[2] 24 h	PPM (mg/g MS)[2] 48 h
Heno biodegradado con *P. ostreatus* (H-PO)	0%	0,18 [A]	0,38 [A]	163,54 [A]	169,17 [A]
	6%	0,10 [B]	0,26 [B]	135,54 [B]	147,45 [B]
	EEM[3]	0,01	0,02	5,51	3,88
	Valor-*p*	<0,001	0,001	0,001	0,001
S. cerevisiae[4]	Sin (Control)	0,13	0,30	161,60	173,36 [A]
	Yea Sacc®	0,14	0,33	147,10	156,02 [B]
	SC UBB	0,14	0,32	139,10	145,55 [B]
	EEM[3]	0,02	0,02	6,82	4,80
	Valor-*p*	0,891	0,689	0,065	0,001
Interacción H-PO y SC	0%-Sin SC	0,17	0,36	153,70 [ab]	161,05 [bc]
	0%-Yea Sacc®	0,20	0,41	153,22 [ab]	156,68 [c]
	0%-SC UBB	0,17	0,37	183,70 [a]	189,58 [a]
	6%-Sin SC	0,10	0,24	169,51 [ab]	185,66 [ab]
	6%-Yea Sacc®	0,08	0,25	140,98 [b]	155,15 [c]
	6%-SC UBB	0,12	0,27	94,51 [c]	101,53 [d]
	EEM[3]	0,02	0,03	9,35	6,59
	Valor-*p*	0,232	0,716	<0,001	<0,001

[A-B] Medias con superíndice en mayúscula indican diferencias estadísticas dentro del factor principal dentro de una columna (p<0,05); tendencia 0,05> o = 0,01.

[a-d] Medias con superíndice en minúsculas indican diferencias estadísticas entre interaccion H-PO y SC (combinaciones de factores principales) dentro de una columna (p<0,05).

[1]Nitrogeno amoniacal, [2]Producción de proteína microbiana, [3]Error estándar de la media (división de la desviación estándar por la raíz cuadrada del tamaño muestral), [4]*Saccharomyces cerevisiae*, dosis de 250.000 UFC.

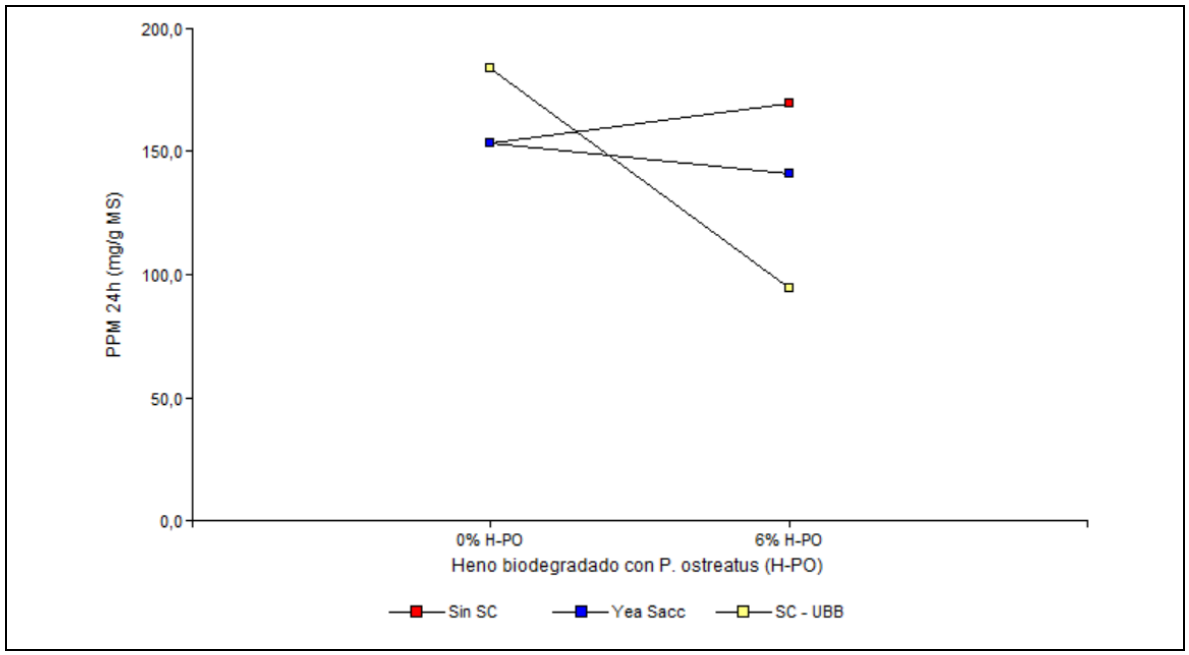


Figura 25 Interacción de la inclusión *de S. cerevisiae* × concentración de H-PO en dieta alta en aFDAom, sobre la producción de proteína microbiana (PPM) a las 24 h.

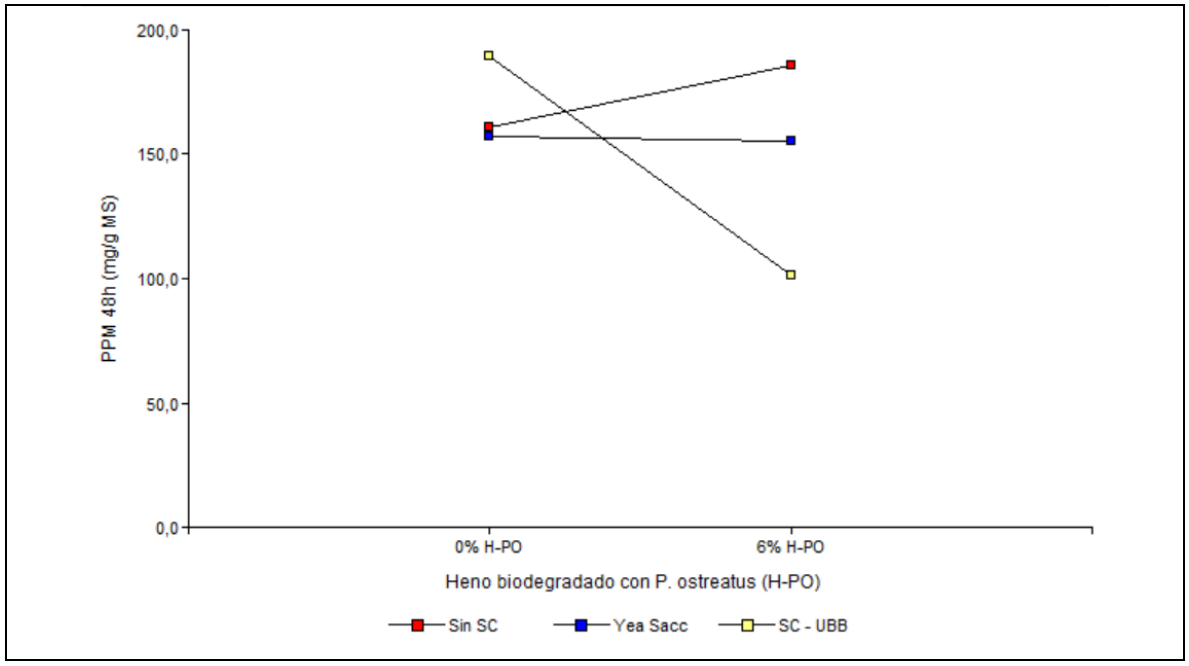


Figura 26 Interacción de la inclusión de *S. cerevisiae* × concentración de H-PO en dieta alta en aFDAom, sobre la producción de proteína microbiana (PPM) a las 48 h.

Ácidos grasos de cadena corta totales (AGCCt).

Los AGCCt a las 24 h de incubación, disminuyeron (p=0,001) por la inclusión de 6% de H-PO en la dieta, pasando de 95,30 a 65,93 mM. De igual forma a las 48 h, el efecto de 6% de H-PO implicó disminución signficiativa (p <0,001) de AGCCt, pasando de 139,50 a 96,93 mM. La adición de *S. cerevisiae* a las 24 h no tuvo efecto (p=0,085), pero si a las 48 h (p=0,003) en el cual la dieta sin *S. cerevisiae* presentó un valor de 118,40 mM, la dieta con Yea Sacc® 133,43 mM y la dieta con SC – UBB 101,75 mM (Tabla 13**).**

La comparación de la proporción molar de ácido acético no mostró diferencias significativas por inclusión de 6% de H-PO (p=0,058) o por *S. cerevisiae* (p=0,065) o la interacción de ambos factores (p=0,761) a las 24 h de incubación. Al pasar a 48 h de incubación se observó aumento de la proporción molar de ácido acético por efecto de H-PO (p=0,003), al igual que por efecto de SC, especialmente por inclusión de SC-UBB.

La propoción molar de ácido propionico disminuyó por efecto de H-PO a las 24 y 48h de incubación, al igual que SC-UBB. En detalle a las 24h, la adición de 6% de H-PO implicó una disminución de 3,56 unidades porcentuales, la adición de SC - UBB una disminución de 3,75 unidades porcentuales, pero la adición de Yea Sacc® no tuvo variación porcentual con respecto al tratamiento sin SC, ni presentaron interacción significativa (p=0,347). A las 48 h de incubación, la adición de 6% de H-PO implicó una disminución de 3,94 unidades porcentuales mientras que la incorporación de Yea Sacc® una disminución de 1,07% y de SC de la cepa UBB en 3,42 unidades porcentuales, sin interacción significativa entre factores (p=0,059). La proporción de butirato no fue alterada por los factores evaluados en los dos horarios de muestreo.

La relación ácido acético: ácido propiónico (A:P) presentó semejante comportamiento a las 24 y 48 h, con aumento de la relación A:P de manera significativa, por adición de 6% de H-PO, mientras que la relación no presentó variaciones al añadir Yea Sacc® respecto al control sin SC, pero si con SC cepa UBB, aumentando de forma significativa (p=0,002 a las 24 h; p=0,06 a las 48 h). Solo a las 48 h la interacción H-PO y SC fue significativa (p=0,015) (Tabla 13). El análisis gráfico de la interacción (Figura 27) muestra que sin inclusión de H-PO, el tipo de levadura no tiene diferencia significativa del tratamiento control, sin embargo cuando la dieta incluye 6% de H-PO, la cepa SC – UBB ocasiona un alza significativa de la relación A:P.

Tabla 13 Principales ácidos grasos de cadena corta (AGCC), según concentración de aditivo Heno biodegradado con *P. ostreatus* (H-PO) y tipo de *S. cerevisiae* (SC) en fermentación *in vitro.*

		AGCC									
		Total, mM		Acetato, %		Propionato, %		Butyrato, %		A:P[2]	
Items		24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
Heno	0%	95,30 ^{A}	139,50 ^{A}	50,15	56,03 ^{B}	28,88 ^{A}	27,69 ^{A}	19,50	14,90	1,78 ^{B}	2,06 ^{B}
biodegradado con	6%	65,93 ^{B}	96,22 ^{B}	53,91	60,44 ^{A}	25,32 ^{B}	23,75 ^{B}	19,33	14,54	2,22 ^{A}	2,62 ^{A}
P. ostreatus	EEM[1]	5,11	5,05	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,08	0,08
(H-PO)	Valor-*p*	0,001	<0,001	0,058	0,003	0,001	<0,001	0,853	0,659	0,001	<0,001
S. cerevisiae[3]	Sin (Control)	82,18	118,40 ^{AB}	50,69	55,69 ^{B}	28,26 ^{A}	27,22 ^{A}	19,68	15,66	1,85 ^{B}	2,09 ^{B}
	Yea Sacc®	89,94	133,43 ^{A}	50,06	58,33^{AB}	28,54 ^{A}	26,15 ^{A}	20,01	14,39	1,83 ^{B}	2,27 ^{B}
	SC-UBB	69,72	101,75 ^{B}	55,33	60,69 ^{A}	24,51 ^{B}	23,80 ^{B}	18,55	14,11	2,33 ^{A}	2,65 ^{A}
	EEM[1]	6,32	6,31	0,02	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,10	0,10
	Valor-*p*	0,085	0,003	0,065	0,021	0,002	0,001	0,397	0,269	0,002	0,006
Interacción H-PO y	0%-Sin SC	90,71	143,45	48,16	53,18	29,96	28,91	20,45	16,27	1,66	1,87 ^{b}
SC	0%-Yea Sacc®	108,45	147,94	49,18	58,00	29,46	27,23	19,91	13,73	1,71	2,16 ^{b}
	0%-SC UBB	86,73	127,13	53,10	56,92	27,22	26,94	18,14	14,71	1,97	2,14 ^{b}
	6%-Sin SC	73,65	93,36	53,22	58,21	26,55	25,54	18,92	15,06	2,03	2,23 ^{b}
	6%-Yea Sacc®	71,43	118,92	50,94	58,66	27,61	25,07	20,12	15,05	1,94	2,38 ^{b}
	6%-SC UBB	52,71	76,38	57,55	64,46	21,80	20,66	18,96	13,51	2,69	3,15 ^{a}
	EEM[1]	8,67	8,41	0,02	0,02	0,01	0,01	0,01	0,01	0,14	0,13
	Valor-p	0,477	0,374	0,761	0,135	0,347	0,059	0,545	0,347	0,241	0,015

$^{A-B}$ Medias con superíndice en mayúscula indican diferencias estadísticas dentro del factor principal dentro de una columna ($p<0,05$); tendencia 0,05> o = 0,01.

$^{a-d}$ Medias con superíndice en minúsculas indican diferencias estadísticas entre interaccion H-PO y SC (combinaciones de factores principales) dentro de una columna ($p<0,05$).[1]Error estándar de la media (división de la desviación estándar por la raíz cuadrada del tamaño muestral), [2]A:P = relación ácido acetico:ácido propionico, [3]*Saccharomyces cerevisiae*, dosis de 250.000 UFC.

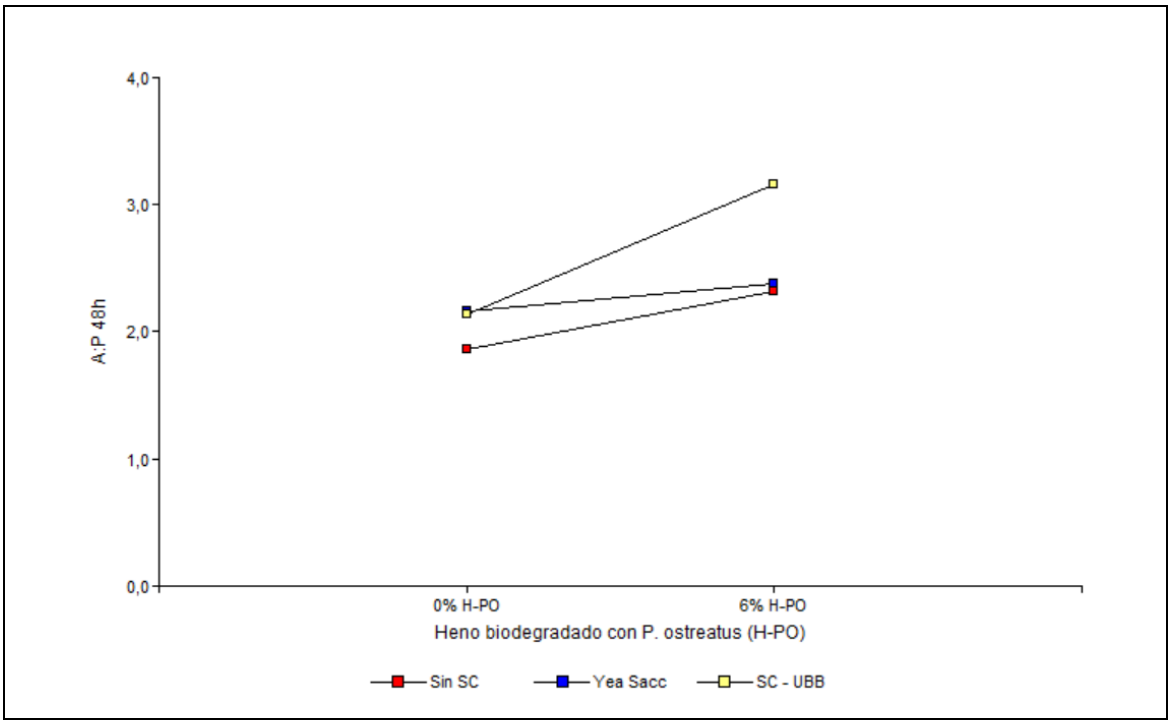


Figura 27 Interacción de la inclusión de *S. cerevisiae* × concentración de H-PO en dieta alta en aFDAom, sobre relación ácido acético:ácido propiónico (A:P) a las 48 h.

Por su parte, el porcentaje de producción de ácido butírico no presentó diferencias por adición de 6% de H-PO y el tipo de levaduras que se añada a la dieta (Tabla 13).

Esta situación también se observó en el porcentaje de ácidos grasos de cadena corta menores (Tabla 14) los cuales no fueron afectados por H-PO y SC, o la interacción de ambos factores. La relación ácidos grasos glucogénicos y no glucogénicos (NGR), a las 24 h de incubación presentó diferencias ($p<0,001$) por 6% de H-PO, por el tipo de *S. cerevisiae* ($p<0,001$) e interacción significativa ambos factores ($p=0,021$). A las 24h de incubación, la adición de 6% de H-PO implicó un aumento de la relación pasando de 3,07 a 3,68, mientras que la adición de Yea Sacc® no presentó diferencias con el tratamiento control, pero la adición de SC - UBB implicó un aumento de la relación pasando de 3,18 a 3,77. Mientras que, a las 48 h la adición de 6% de H-PO ocasionó un aumento de la relación de 3,08 a 3,77; la adición de Yea Sacc® no modificó la relación, pero SC - UBB implicó un aumento, pasando de 3,19 a 3,76. Al igual que a las 24 h, la interacción de los factores fue significativa ($p=0,002$) (Tabla 14). En análisis de la interacción a las 24 h (Figura 28 y 29) muestra que la relación no es afectada por la adición de *S. cerevisiae,* cuando es el único aditivo incluido en la dieta, mientras que al incluir 6% de H-PO solo la adición de SC-UBB ocasiona un

aumento de NGR.

Tabla 14 Ácidos grasos de cadena corta (AGCC) menores y proporción de ácidos grasos glucogénicos y no glucogénicos (NGR), según concentración de heno biodegradado con *P. ostreatus* y tipo de *S. cerevisiae* en dieta, producidos por fermentación *in vitro*

		AGCC menores (%)		NGR[2]	
Items		24 h	48 h	24 h	48 h
Heno biodegradado con *P. ostreatus*	0%	0,70	0,69	3,07 ^{B}	3,08 ^{B}
	6%	0,68	0,66	3,68 ^{A}	3,77 ^{A}
	EEM[1]	0,07	0,09	0,08	0,07
	Valo-*p*	0,781	0,812	<0,001	<0,001
S, cerevisiae[3]	Sin (Control)	0,63	0,73	3,18 ^{B}	3,19 ^{B}
	Yea Sacc®	0,61	0,53	3,17 ^{B}	3,32 ^{B}
	SC-UBB	0,83	0,77	3,77 ^{A}	3,76 ^{A}
	EEM[1]	0,08	0,11	0,10	0,08
	Valor-*p*	0,131	0,236	<0,001	<0,001
Interacción H-PO y SC	0%-Sin SC	0,66	0,87	2,97 ^{b}	2,94 ^{c}
	0%-Yea Sacc®	0,65	0,46	3,01 ^{b}	3,12 ^{bc}
	0%-SC UBB	0,79	0,75	3,24 ^{b}	3,17 ^{bc}
	6%-Sin SC	0,60	0,60	3,39 ^{b}	3,43 ^{b}
	6%-Yea Sacc®	0,56	0,60	3,33 ^{b}	3,51 ^{b}
	6%-SC UBB	0,87	0,80	4,30 ^{a}	4,36 ^{a}
	EEM[1]	0,12	0,13	0,15	0,11
	Valor-*p*	0,764	0,381	0,021	0,002

$^{A-B}$ Medias con superíndice en mayúscula indican diferencias estadísticas dentro del factor principal dentro de una columna (p<0,05); tendencia 0,05> o = 0,01.

$^{a-d}$ Medias con superíndice en minúsculas indican diferencias estadísticas entre interaccion H-PO y SC (combinaciones de factores principales) dentro de una columna (p<0,05).

[1]Error estándar de la media (división de la desviación estándar por la raíz cuadrada del tamaño muestral), [2]NGR = (Acetato + (2*Butirato) + Valerato) /(Propionato + Valerato), [3]*Saccharomyces cerevisiae*, dosis de 250.000 UFC.

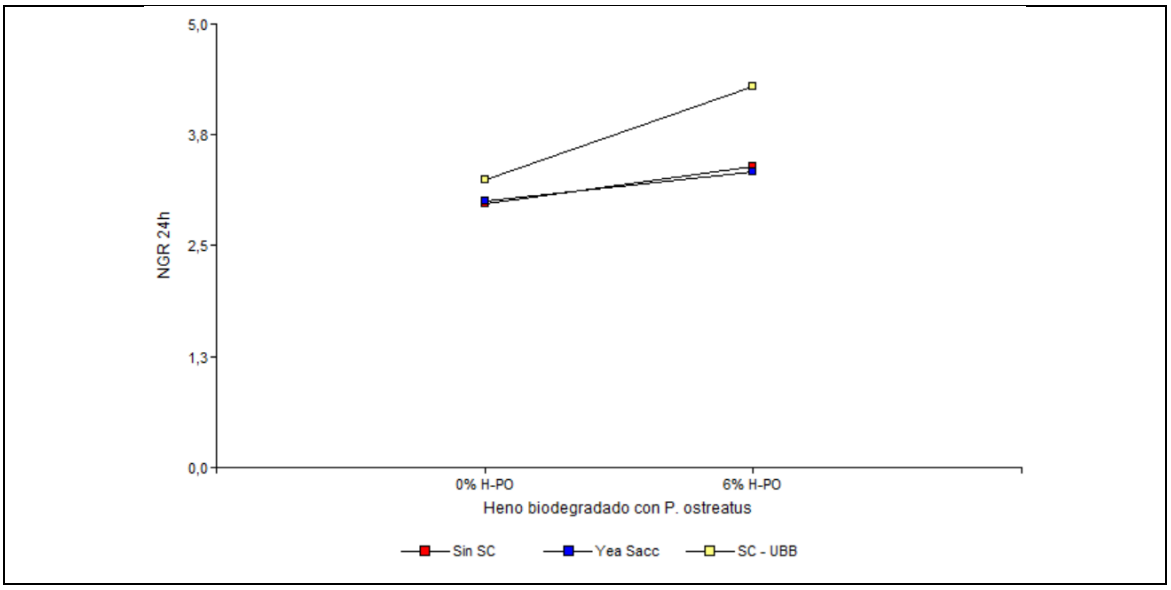


Figura 28 Interacción de inclusion de *S. cerevisiae* x concentración de H-PO en dieta alta en aFDAom, en proporción de ácidos grasos glucogénicos y no glucogénicos (NGR) a las 24 h.

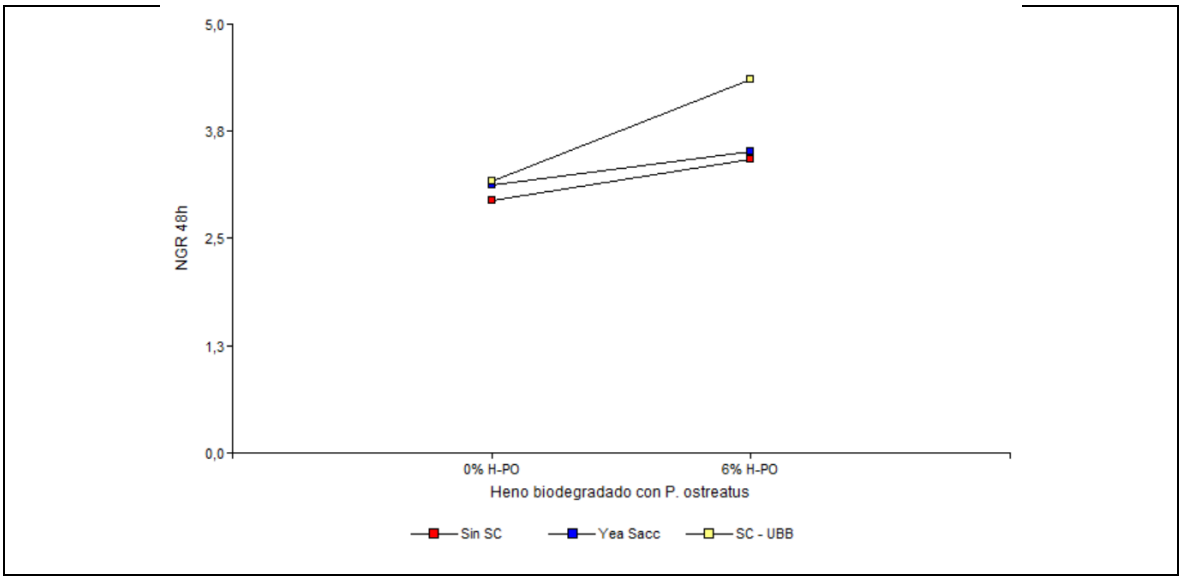


Figura 29 Interacción de inclusión de S. cerevisiae × concentración de H-PO en dieta alta en aFDAom, sobre proporción de ácidos grasos glucogénicos y no glucogénicos (NGR) a las 48 h.

Producción de metano (CH_4)

La producción neta de CH_4 a las 24 h disminuyó por la inclusión de 6% de H-PO, ($p<0,001$), al igual que la inclusión de SC – UBB ($p<0,001$), pero sin interacción significativa ($p=0,225$). A las 48 h la situación fue similar, ya que la inclusión de H-PO disminuyó la producción neta de CH_4 ($p<0,001$), al igual que SC – UBB ($p<0,001$), pero sin interacción de los factores ($p=0,511$) (Tabla 15)

Comportamiento similar presento la producción de CH_4 (mg CH_4/g MS incubada) y el rendimiento (mg CH_4/g MS degrada) a las 24 y 48 h, es decir, la adición de 6% de H-PO disminuyó el CH_4, así como la adición de SC – UBB, de manera significativa ($p<0,001$). En específico, la producción de CH_4 pasó de 13,71 a 9,30 mg/g MSi a las 24 h y 27,47 a 18,89 mg/g MSi a las 48 h, por efecto de H-PO. Por su parte, la adición de SC – UBB disminuyó el CH_4 desde 12,49 a 9,35 mg/g MSi a las 24 h y de 24,91 a 19,10 mg/g MSi, mientras que la adición de Yea Sacc® no produjo efectos en la producción de CH_4 *in vitro*.

El rendimiento de CH_4, que corresponde a la relación de CH_4 con materia seca degradada, presentó disminución por efecto de H-PO ($p<0,001$) y SC-UBB ($p<0,001$) a las 24 y 48 h. El primer factor implicó una disminución del 38,64%, mientras que el segundo una disminución de 31,68% de rendimiento de CH_4 a las 24 h, y de 37,87% y 29,51%, para ambos factores, respectivamente a las 48 h. Solo el rendimiento de CH_4 a las 24 h, presentó interacción significativa entre H-PO y SC (Tabla 15), en la cual tanto con o sin inclusión de H-PO, el rendimiento de CH_4 disminuye al agregar a la dieta SC-UBB (Figura 30).

Tabla 15 Producción de metano (CH_4) en incubación *in vitro* a las 24 y 48 h, según concentración heno biodegradado con *P. ostreatus* y tipo de *S. cerevisiae* en dieta.

		CH_4 Neto, mg		Producción CH_4, mg/g MSi[2]		Rendimiento CH_4, mg/g MSd[3]		CH_4/AGCCt, mg/mM	
Ítems		24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
Heno biodegradado con	0%	6,17 ^{A}	12,34 ^{A}	13,71 ^{A}	27,47 ^{A}	22,46 ^{A}	41,88 ^{A}	0,07 ^{A}	0,09 ^{A}
P. ostreatus	6%	2,94 ^{B}	6,01 ^{B}	9,30 ^{B}	18,89 ^{B}	13,78 ^{B}	26,02 ^{B}	0,05 ^{B}	0,06 ^{B}
	EEM[1]	0,11	0,34	0,28	0,83	0,43	1,08	0,01	0,01
	Valor-*p*	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,020	0,001
S. cerevisiae[5]	Sin	5,30 ^{A}	10,56 ^{A}	12,49 ^{A}	24,91 ^{A}	19,98 ^{A}	36,97 ^{A}	0,07	0,09 ^{A}
	Yea Sacc®	5,24 ^{A}	10,56 ^{A}	12,68 ^{A}	25,51 ^{A}	20,73 ^{A}	38,82 ^{A}	0,07	0,08 ^{A}
	SC-UBB	3,13 ^{B}	6,41 ^{B}	9,35 ^{B}	19,10 ^{B}	13,65 ^{B}	26,06 ^{B}	0,04	0,06 ^{B}
	EEM[1]	0,14	0,42	0,34	1,03	0,54	1,34	0,01	0,01
	Valor-*p*	<0,001	<0,001	<0,001	0,001	<0,001	<0,001	0,053	0,001
Interacción H-PO y SC	0%-Sin SC	6,95	13,56	15,00	29,25	25,40 a	46,29	0,09	0,10
	0%-Yea Sacc®	6,67	13,49	14,33	29,02	24,63 a	46,37	0,07	0,09
	0%-SC UBB	4,88	9,97	11,81	24,12	17,35 b	32,99	0,06	0,08
	6%-Sin SC	3,64	7,56	9,99	20,57	14,56 b	27,65	0,05	0,08
	6%-Yea Sacc®	3,81	7,62	11,04	22,00	16,83 b	31,28	0,07	0,07
	6%-SC UBB	1,37	2,85	6,88	14,09	9,96 c	19,12	0,03	0,04
	EEM[1]	0,19	0,58	0,47	1,41	0,74	1,84	0,01	0,01
	Valor-*p*	0,225	0,511	0,125	0,576	0,044	0,418	0,388	0,565

$^{A-B}$ Medias con superíndice en mayúscula indican diferencias estadísticas dentro del factor principal dentro de una columna ($p<0,05$); tendencia 0,05> o = 0,01.

$^{a-d}$ Medias con superíndice en minúsculas indican diferencias estadísticas entre interacción H-PO y SC (combinaciones de factores principales) dentro de una columna ($p<0,05$).

[1]Error estándar de la media (división de la desviación estándar por la raíz cuadrada del tamaño muestral), [2]MSi: Materia seca incubada, [3]MSd: Materia seca degradada, [4] *Saccharomyces cerevisiae*, dosis de 250.000 UFC.

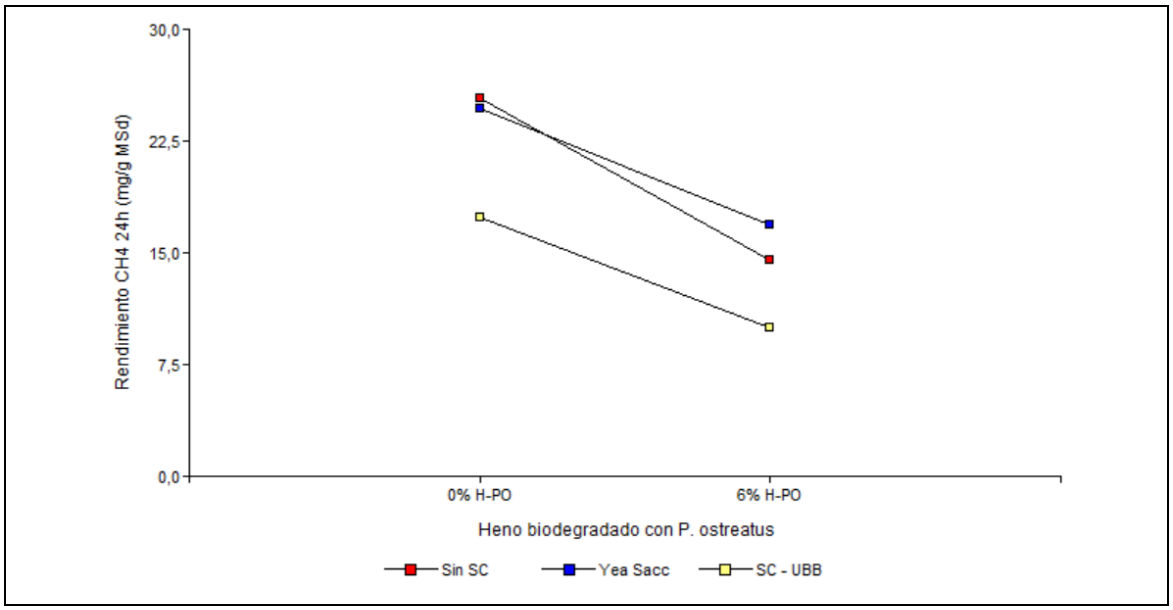


Figura 30 Interacción de la inclusión de *S, cerevisiae* × concentración de H-PO en dieta alta en aFDAom, sobre el rendimiento de metano a las 24 h.

c) Discusión

Desaparición *in vitro* de materia seca

Dietas con 6% de H-PO presentaron una mejor DIVMS en ambos tiempos de incubación. La adición de Yea Sacc® no implicó cambios en DIVMS, pero SC-UBB aumentó el parámetro, en ambos tiempos de incubación.

La adición de *S. cerevisiae* puede causar un cambio en las poblaciones bacterianas ruminales, implicando un aumento del número y actividad de bacterias celulolíticas y fibrolíticas (McAllister et al 2011; Martin et al., 1989; Chaucheyras-Durant et al., 2008; Mitchell and Heinrich 2020). Considerando que muchos microorganismos del rumen son altamente sensibles a la presencia de oxígeno en el rumen, la alta actividad respiratoria de *S. cerevisiae* podría mejorar la condición de anaerobiosis (Newbold et al., 1996). También es posible que la levadura proporcione a las bacterias del rumen factores de crecimiento, incluidos ácidos orgánicos, vitaminas B y aminoácidos (Callaway y Martin 1997). Además, los productos de levadura pueden estimular el crecimiento de bacterias fibrolíticas al prevenir la acidosis ruminal subaguda (Chaucheyras-Durand et al. 2008, Habeed 2017), así como aumentar la digestibilidad de proteínas al estimular las bacterias proteolíticas (Habeed 2017). Esta situación ha sido propuesta por McAllister et al. (2011), como la razón de la mejora en la digestibilidad que ocasionalmente ha sido observada en con suplementación con *S. cerevisiae*.

Lascano et al. (2012) evaluaron dosis crecientes de Yea Sacc® en vaquillas, reportando una digestibilidad máxima de FDA de 54% con dosis de 30 g/día de levadura. Mitchell and Heinrich (2020) señala que los efectos positivos de Yea Sacc® en el estudio de Lascano et al. (2012) pueden ser atribuido a que la dieta aportaba cantidades ideales recomendadas por NRC (2001) de FDA y FDN, lo cual no representaría un desafío a los microorganismos. Es importante recalcar que la mejora en la digestibilidad de la materia seca sólo fue observada con el uso de SC - UBB como aditivo único, y considerando que fue utilizada una misma dosis entre las cepas evaluadas, probablemente el mejor desempeño puede deberse al hecho de que se trata de un inoculo húmedo, donde las levaduras pudieron requerir menor tiempo para reiniciar su actividad celular, a diferencia de la cepa Yea Sacc® la cual tiene presentación en seco, lo que podría retrasar el reinicio de la actividad, al actuar como barrera física entre las células de levadura y el inoculo de fermentación. Amanzougarene et al. (2020) postulan que la variabilidad en los resultados de estudios con uso de *S. cerevisiae* puede deberse en parte a que estos productos comerciales son añadidos directamente al alimento, sin una activación previa, y los resultados de sus experimentos demostraron que la activación de células vivas de *S. cerevisiae* en forma seca (AMBIOTEC balance, Toledo, España) utilizando un medio potenciador compuesto de lactosa, harina de *Ceratonia siliqua*, fosfato bicálcico y óxido de magnesio, diluido en agua (24h/30°C) permite mantener una concentración constante de levadura en incubaciones *in vitro* de cebada y remolacha azucarera en evaluaciones a las 6 y 12 horas, a diferencia del producto seco, con efecto positivo sobre la producción de gas, en pulpa de remolacha y mayor producción de AGCCt respecto al tratamiento control (sin aditivo).

De todas formas, Russouw et al. (2020) señalan que aumentos de digestibilidad se deben a algunos de los modos de acción propuestos ya mencionados, pero también indican que es posible que ocurra competencia por nutrientes dentro del rumen, si una dosis excesiva de levaduras es utilizada. En el caso de Yea Sacc® corresponde a un cultivo de células vivas de una cepa de *S. cerevisiae* especialmente seleccionada, la cual se presenta en estado liofilizado junto al medio de cultivo, el cual contiene maíz, melasa, malta y elementos trazas (Mikolaychik et al., 2019), mientras que SC – UBB corresponde a una cepa de orientación industrial, destinada a la industria del pan, seleccionada en laboratorio, la cual junto al medio de cultivo, que incluye extracto de levadura y glucosa, además de KH_2PO_4, $(NH_4)_2\ SO_4$, y $MgSO_4$, sometido a centrifugación y refrigeración previo a su uso, indicando estas diferencias en cuanto a medio de crecimiento y técnica de conservación del producto. El uso en conjunto de microorganismos para mejorar la fermentación ruminal es planteado

como un mecanismo para aportar al rumen, microorganismos que actúen directamente sobre algún producto del sustrato o de la fermentación de este, o que estos aporten algún componente que mejore la actividad de los microorganismos ya presentes, a través de su actividad o de su lisis (Doto and Liu 2011). En el caso del presente experimento, se utilizó de manera conjunta heno pretratado por 14 días con *P. ostreatus* y *S. cerevisiae*, donde se esperaba que el primero mantuviera actividad, tanto micelial como enzimática (aunque no óptima por condiciones de pH y anaerobiosis) gracias a la información entregada en los experimentos previos y que *S. cerevisiae* mejoraría las condiones ambientales para la microbiota ruminal en base a la literatura disponible. Sin embargo, el uso de Yea Sacc® no logro diferenciarse de los demás tratamientos.

Phesatcha et al. (2020) realizaron un tratamiento con urea y cal en paja de arroz para mejorar la digestibilidad, estudiando la fermentación *in vitro* de dietas que variaron en su relación forraje:concentrado y diferentes niveles de *S. cerevisiae*. Sus resultados no mejoraron la DIVMS, ya que este parámetro solo aumento en la medida que la proporción de concentrado aumentaba en la dieta, pero si mejoraron por la inclusión de *S. cerevisiae*, situación atribuida a la estimulación que esta levadura realiza sobre los microorganismos del rumen y a su capacidad de reducir el potencial redox en el rumen, al disminuir el O_2 disponible. Con objetivos similares Zain et al. (2011) evaluaron paja de arroz amonizada con 4% de urea más una mezcla de alimentos concentrados como sustrato de fermentación *in vitro*, evaluando como aditivo 4 niveles de *S. cerevisiae* ($4x10^8$ celulas vivas/g, más medio de crecimiento), reportando mejora en la digestibilidad de la materia seca y fracciones fibrosas del sustrato, asociando esto a un aumento de la microbiota ruminal, especialmente celulolitica, por efecto de *S. cerevisiae*.

Resultados interesantes de comparar, son los presentados por Darwish et al. (2012) donde la fermentación sólida de tallos de maíz con *P. ostreatus* fue acompañada con diferentes dosis de *S. cerevisiae*. Esta fermentación sólida se realizó por 7, 14, 21 y 28 días. Transcurridos 14 días, la DIVMS aumentó de 23,3% en el tratamiento control, a 48,0% cuando fueron incluidos 30 ml de *S. cerevisiae*, mientras que la digestibilidad de la materia orgánica fue mayor con la dosis de 45 ml de *S. cerevisiae* (72,5%). Obteniendo de igual forma aumentos del aporte de proteína cruda del forraje pretratado. Lamentablemente, este estudio no analizó otros parámetros de fermentación ruminal.

Producción de gas (PG)

La PG *in vitro*, no fue afectada por la inclusión de H-PO o el tipo de SC a las 24 h de incubación, aunque a las 48 h se reportó una disminución de la producción de gas por efecto

de H-PO. El sistema de PG *in vitro* ayuda a cuantificar mejor la utilización de nutrientes y su precisión en describir la digestibilidad en animales ha sido validada en numerosos experimentos, sin embargo, este parámetro es afectado por la composición nutricional del alimento o dieta fermentada especialmente la fracción de FDN y FDA las cuales se correlacionan negativamente con la PG *in vitro*, ya que estas tienden a disminuir la actividad microbiana (Sallam et al., 2007).

De manera similar Direkvandi et al. (2021) no reportaron diferencias en la producción de gas entre tratamiento control y con adición de *S. cerevisiae* ($1{,}4x10^7$ ufc), señalando que a pesar del efecto de consumo de oxígeno que realiza la levadura, no siempre se ve reflejado en un incremento de la PG. En los resultados de nuestro experimento, PG no fue afectada a las 24 h por H-PO o los tipos de SC, pero la DIVMS asociada, mostró aumentó de este parámetro por efecto de H-PO y SC-UBB, pero sin cambios con Yea Sacc®.

Marrero et al. (2010) evaluaron tres formas de inclusión de *S. cerevisiae in vitro*: medio de cultivo inoculado con *S. cerevisiae* (medio completo), granulado de la centrifugación del medio de cultivo inoculado y sobrenadante de la centrifugación del medio de cultivo inoculado. Ellos reportaron que la adición de medio completo incrementó la PG, por aumento de la actividad microbiana, mientras que el sobrenadante del medio tuvo la menor producción de gas, y los autores indicaron la posible existencia de algún compuesto generado por el metabolismo de las levaduras, que altera la producción de gas, pero no la degradación de FDN.

En oposición a los resultados de nuestro estudio, Lila et al. (2004) informaron incremento en la PG con adición de Yea Sacc® en fermentaciones *in vitro*, reportando valores máximos de 49 mL a las 24 h. Estos autores atribuyen este aumento a la mayor producción de propionato, ya que, cuando éste se genera, se libera CO_2 en la vía succinato-propionato, el cual es incorporado a la carboxilación de oxaloacetato. En nuestro experimento PG fue afectada solo a las 48 h de incubación *in vitro* y de manera negativa por efecto de H-PO, mientras que la proporción de propionato disminuyó a las 24 y 48 h por efecto de H-PO y SC – UBB, por lo tanto, no se correlacionó una mayor producción de gas con mayor producción de Propionato.

Nitrógeno amoniacal (N-NH_3) y producción de proteína microbiana (PPM)

La concentración de N-NH_3 disminuyó por efecto de H-PO, en ambos horarios de muestreo, pero la adición de SC no generó cambios.

Por su parte, la PPM fue afectada por la inclusión de H-PO a las 24 y 48 h de incubación disminuyendo, mientras que SC, afectó solo a las 48h de incubación, generando ambos

tipos de Sacaromices disminución de esta estimación. Una posible explicación, al aumento de desaparición de materia seca, sumado a nulo aumento de gas, y reducción de PPM, es la acción de las enzimas propias del micelio de *P. ostreatus*, las cuales pudieron realizar degradación enzimática.

Este parámetro presentó interacción entre los factores, indicando que la PPM fue afectada en los tratamientos con SC – UBB por la adición de H-PO, ya que en las estimaciones de PPM en tratamientos sin H-PO el valor del tratamiento con SC-UBB es significativamente mayor en comparación a los otros dos tratamientos, pero al evaluar en dieta con H-PO el mismo tratamiento tiene el valor menor.

Los valores de N-NH_3, están muy por debajo de los presentados en la literatura (Zain et al., 2011; Phesatcha et al., 2020; Aoki et al., 2021) sin embargo, es necesario mencionar que estos valores han sido corregidos por el valor en el tiempo cero, esto implica, que el N-NH_3, casi no varió durante la incubación. Esto explica en parte la disminución de PPM durante las incubaciones.

Dentro de los factores químicos que afectan la síntesis de proteína microbiana, la sincronización en la liberación de nitrógeno y energía desde la dieta es uno de los más importantes, requiriendo que ambos no sean limitantes o estén en exceso, ya que en ambas situaciones limitan la producción de proteína microbiana. El balance óptimo de proteína degradable en el rumen (PDR) de una dieta es cercano a cero y corresponde a la proporción de N degradable en el rumen a materia orgánica fermentada, equivalente a 25 g de N/kg de materia orgánica fermentada, lo que refleja una disponibilidad bien balanceada de energía y N para los microbios del rumen. Cuando el balance de PDR es positivo para una dieta, ocurren pérdidas de N del rumen, mientras que un balance de PDR negativo indica una escasez de nitrógeno y, en consecuencia, la actividad microbiana puede verse afectada (Harun and Sali 2019). Considerando que el H-PO es el resultado del pretratamiento biológico, el cual libera carbohidratos, es posible asumir que la disminución de PPM durante las incubaciones es resultado de un deficiente balance de energía y N.

Bajo condiciones *in vivo*, el pool de N del rumen, está conformado por el N proteico, el N no proteico y N reciclado a través de la saliva, permitiendo que, ante dietas bajas en N, no sea perjudicada la actividad microbiana y su multiplicación, pero bajo condiciones *in vitro*, no se dispone de este reciclaje de N. En los resultados de nuestro experimento, la DIVMS mejoró por adición de H-PO y SC-UBB, lo que puede indicar que los microorganismos del rumen mantenían su actividad fermentativa.

Rodríguez et al. (2007) indica que el amoníaco es el intermediario central en la degradación

y asimilación de N en el rumen, pudiendo variar entre 0 y 130 mg de N/100 ml, según la fuente de N y el momento postpandrial. También señalan que la concentración óptima para la síntesis de proteína microbiana debería estar sobre 5,6 mg de NH_3/100 ml de fluido ruminal, siempre que la disponibilidad de energía no sea limitante.

La síntesis de proteína microbiana es favorecida por la energía liberada tras la fermentación de carbohidratos en el rumen, pero menores tasas de crecimiento se han logrado con carbohidratos estructurales como una fuente de energía o con suplementos ricos en almidón (Rodríguez et al., 2007).

El experimento de Phesatcha et al. (2020) reportó concentraciones de N-NH_3 entre 17,1 y 24,1 mg/dL; encontrando el valor máximo con la dieta relación forraje:concentrado 20:80, indicando que esto sucede ya que, dietas más altas en concentrado son más altas en proteína cruda, disponibles para degradación microbiana a N-NH_3, en comparación a las dietas bajas en concentrado.

Otras investigaciones han reportado disminución de N-NH_3 por efecto del uso de *S. cerevisiae* (Moloney and Drennan 1994; Zain et al., 2011; Aoki et al., 2021), los cuales asocian la disminución de N-NH_3 a incrementos de incorporación de éste a la proteína microbiana.

Ácidos grasos de cadena corta (AGCC)

La producción de AGCC totales disminuyó por efecto de H-PO a las 24 y 48 h de incubación, mientras que el tipo de *S. cerevisiae* no afectó a las 24 h, pero si a las 48 h de incubación, por efecto de la inclusión de Yea Sacc®. La máxima producción de AGCC a las 24 h fue 95 mM y a las 48 h de 139,50 mM ambos sin inclusión de H-PO.

Los valores de AGCC totales son menores a los reportados por Direkvand et al. (2021) quienes indican que este parámetro varió entre 140 y 180 mM entre las 2 – 48 h de incubación, sin modificaciones por *S. cerevisiae*, al igual que la producción de acetato y propionato, pero son similares a los datos de Russouw et al. (2020) con dosis de *S. cerevisiae* de hasta $1x10^7$ UFC, en evaluaciones a las 24 h de incubación *in vitro*.

Lila et al. (2004) reportaron que aumentos en las concentraciones de Yea Sacc® cepa 8417 más 1026, implicó aumentos lineales de la concentración *in vitro* de AGCC pasando de 60,3 mM sin adición de Yea Sacc® a 68,0 mM con 1,32 g/L de Yea Sacc®, utilizando como sustrato de incubación una mezcla de heno y concentrado más almidón de maíz, mientras que aumentó de 56,3 mM sin adición de Yea Sacc® a 64,1mM con 1,32 g/L, cuando el sustrato de fermentación fue almidón de papa, señalando la importancia del sustrato para conseguir efecto sobre la producción de AGCC. Además, estos autores incluyeron dosis

mucho más altas que la recomendación habitual del producto ($5x10^9$ UFC fue la dosis utilizada por Lila et al., 2004 versus la dosis utilizada en nuestro estudio de $2,5x10^5$ UFC). Zain et al. (2011) reportaron aumentos de AGCCt al fermentar paja de arroz amonizada con alimentos concentrados y utilizando *S. cerevisiae* como aditivo, pasando de 135 a 160 mM, asociando esta mayor producción a un mayor crecimiento y actividad microbiana por los factores de crecimiento que aporta *S. cerevisaie*.

La falta de efecto de *S. cerevisiae* también ha sido observada en experimentos *in vivo*, por ejemplo, Mitchell and Heinrich (2020) no reportaron efecto de Yea Sacc® sobre la producción de AGCC totales o las proporciones molares de estos, en experimentos con terneros, utilizando heno de alfalfa, ensilaje de maíz o heno de pradera como sustratos. Resultados similares presentan Aoki et al. (2021) quienes utilizaron el mismo producto en vacas Holstein multíparas, aunque ellos reportan una mayor concentración de propionato y disminución de acetato; los resultados de Takemura et al. (2020) que suplementaron terneros con Levucell® (*S. cerevisiae* cepa CNCM I-1077) hasta la décima semana de vida y los resultados de Bayat et al. (2015) con vacas en lactancia alimentadas con dieta relación forraje:concentrado 1:1 y suplementación con 2 cepas de *S. cerevisiae*, quienes nuevamente no reportaron efecto de *S. cerevisiae* sobre los AGCCt.

En nuestro experimento a las 24 h de incubación, la proporción molar de ácido acético no fue afectado por H-PO o tipo de SC, mientras que a las 48 h el uso de 6% de H-PO y SC–UBB implicaron aumento. Por su parte, la proporción molar de ácido propiónico, disminuyó por la inclusión de 6% de H-PO y de SC-UBB a las 24 y 48 h. La proporción molar de ácido butírico no fue afectado por la inclusión de H-PO y *S. cerevisiae*.

Resultados similares presentaron Lila et al. (2004) usando como aditivo Yea-Sacc® Twin Strain 8417 y 1026, no reportando variaciones en las proporciones de acetato y butirato, pero disminución significativa de propionato a las 24 h. Estos autores recalcan que estudios previos con Yea Sacc® (Chademana y Offer 1990; Newbold et al.,1990; Mustsvangwa et al.,1992) han reportado resultados contradictorios sobre AGCC totales y sobre acético, propiónico y butírico.

La relación ácido acético:ácido propiónico (A:P) del presente experimento, aumentó por la inclusión de 6% de H-PO a las 24 y 48 h, y por la adición de SC – UBB, pero Yea Sacc® no tuvo efecto. Doto and Liu (2011) reportaron que la relación A:P fue influenciada por la combinación *C. butyricum* y *S. cerevisae,* disminuyendo significativamente, y por el uso de la levadura como único aditivo, debido a un aumento de la proporción molar de ácido propiónico. En general, cuando disminuye la relación forraje:concentrado de la dieta,

también disminuye la relación A:P y viceversa (Church 1993).

Producción de metano

La producción de CH_4 neto (mg) disminuyó por efecto de 6% H-PO y SC–UBB a las 24 y 48 h, siendo similar la situación con la producción de CH_4 (mg/g MS incubada) y el rendimiento (mg/g MS degradada), resultados que coinciden con el experimento anterior de este estudio (Astudillo-Neira et al., 2023)

Los reportes de utilización de *S. cerevisiae* sobre los parámetros de fermentación ruminal, producción de CH_4 y gases en general, en experimentos *in vitro* e *in vivo* son muy variables, (Miller-Webster et al., 2002; Lynch and Martin 2002; Darabighane et al., 2019; Meller et al., 2019). Sobre esto Patra (2012a) indica que diferentes factores determinan la respuesta al uso de *S. cerevisiae*, tales como dosis, dieta, cepa y condiciones fisiológicas de uso. Razones que explicarían las diferentes respuestas en producción de CH_4 de las cepas evaluadas, ya que es probable que estas tuvieran un comportamiento diferente en la dinámica ruminal. A pesar de estas diferencias se sugiere que el uso de *S. cerevisiae* podría estimular a los acetógenos a competir o co-metabolizar el hidrógeno con metanógenos, reduciendo así las emisiones de CH_4 (Patra 2012a, Mwenya et al., 2004).

Elghandour et al. (2017), estudiando los parámetros de fermentación de dos dietas contrastantes en aporte de proteína cruda, evaluaron tres cepas de *S. cerevisiae*. En este caso, la producción de CH_4 fue mayor en los tratamientos que incluyeron las cepas de levaduras en las dos dosis evaluadas, en la mayoría de los tratamientos. Este aumento de la producción de CH_4 por adición de *S. cerevisiae* ya fue reportado por el mismo grupo de investigación en 2014 evaluando otra cepa de *S. cerevisiae*, en un experimento similar (Elghandour et al., 2014). Esta situación contrasta con los resultados de nuestro estudio, en que la producción fue igual o menor, por efecto del uso de cepas de *S. cerevisiae*. Opsi et al. (2012) compararon dosis de 250 y 500 mg de un aditivo de extracto de levadura inactivada y 150 mg de Yea Sacc® en fermentaciones *in vitro*, reportando que ambos inóculos aumentaron la producción de CH_4 en comparación a los tratamientos control.

Darabighane et al. (2019) concluyeron a partir de un metanálisis de estudios con uso de *S. cerevisiae* que, la adición de este a la dieta de vacas de carne y leche no reduce la producción de CH_4. Con resultados similares, Direkvandi et al. (2021) estudiaron los efectos del uso de aditivos microbianos diferenciando de bacterias ácido lácticas (LAB, lactic acid bacteria), bacterias utilizadoras de ácido láctico (LUB, lactic acid utilizing bacteria) y *S. cerevisiae*, solos y en conjunto, sobre los parámetros de fermentación ruminal, indicando que la producción estimada de CH_4 (ml/g MS incubada) (método de Moss et al., 2000) no

fue afectada por los tratamientos. Meller et al. (2019) en estudios *in vivo* concluyó que el uso de *S. cerevisiae* (5% Yea Sacc® 1026) no afectó la producción de CH_4 y no potencia el efecto de disminución de CH_4 que tiene el uso de nitrato (NO_3^-) como aditivo.

Esta gran diferencia entre los resultados *in vitro* como *in vivo*, mantiene las dudas sobre el real efecto de los tipos de *S. cerevisiae* disponibles para investigaciones hasta la fecha, sobre la producción de CH_4 entérico, ya que se ha establecido que tiene la capacidad de estimular a las bacterias acetogénicas, que podrían usar hidrógeno metabólico en el rumen, lo que a su vez podría afectar la disponibilidad de este para la metanogénesis (Darabighane et al., 2019). Otro punto a considerar lo plantean Opsi et al. (2012) quienes señalan que la levadura no induciría cambios rápidos en la población microbiana ruminal y, por lo tanto, no se pueden esperar cambios a corto plazo en el patrón de fermentación en respuesta a los productos de levadura. De esta forma, las fermentaciones *in vitro*, deberían realizarse por periodos prolongados de incubación.

Por otro lado, Elghandour et al. (2017) estudiaron las diferencias en parámetros de fermentación ruminal *in vitro* al utilizar 3 cepas distintas de *S. cerevisiae* en dietas bajas y altas en proteína cruda (PC). Dentro de las dietas altas en PC, la mayor producción de CH_4 a las 24 h se observó con Procreatin 7® (dosis 2mg/g MS;42 mL CH_4/g MS) y Biosaf SC47® (dosis 2 mg/g MS; 40,3 mL CH_4/g MS y dosis 4 mg/g MS; 36,5 mL CH_4/g MS), mientras que, dentro de la ración baja en PC, Biocel F53® y Biosaf SC47® se obtuvieron los mayores valores de producción de CH_4 a las 24 h de incubación, con valores de 143,2 mL CH_4/g MS y 69,8 mL CH_4/g MS, respectivamente. Los autores señalan que el aumento de contenido de PC de la ración provocó un aumento de la producción de gas y disminución de la producción de CH_4, lo que justifican indicando que la mayor concentración de proteína, cambia las concentraciones de ácidos grasos de cadena corta producidos, de tal manera que se forma menos ácido acético y más ácido propiónico y, por lo tanto, el suministro de hidrógeno para la metanogénesis es limitado. En nuestro experimento la producción de ácido acético no fue modificado por efecto de 6% de H-PO o las cepas de levaduras a las 24 h, mientras que ácido propiónico disminuyó, aunque si ocurrió disminución de la producción de CH_4, por efecto de 6% de H-PO y por la inclusión de SC cepa UBB de manera significativa. Esta discrepancia señala que son requeridos más estudios con uso de henos pretratados con *P. ostreatus* y el uso combinado de *S. cerevisiae*, en fermentaciones ruminales *in vitro*, de manera de establecer la dirección del flujo de hidrógenos.

Tradicionalmente, se ha observado que la fermentación de dietas altas en fibra implica alta producción de ácido acético y baja producción de ácido propiónico, con relativamente alta

producción de CH_4 por unidad de materia seca digerida. Por el contrario, las dietas altas en alimentos concentrados, generan más ácido propiónico y menos CH_4. A pesar de esta afirmación, Janssen (2010) señala que los cambios en la producción de ácido acético o ácido propiónico no pueden ser únicamente explicados a través de la propiorción de fibra en la dieta, sino que propone que este cambio esta dado por la tasa de crecimiento de metanógenos y acumulación de H_2 en el rumen, en lo cual concuerda Ungerfeld (2020).

d) Conclusión

La inclusión de 6% de heno biodegradado con *P. ostreatus* (H-PO) en dieta alta en fibra, con uso de *S. cerevisiae* (cepa comercial Yea Sacc® o cepa UBB) en incubaciones *in vitro*, implicó un aumento de DIVMS por uso de H-PO y SC – UBB, sin alteración de la producción de gas, con disminución de producción y rendimiento de CH_4; pero el uso de H-PO implicó disminución de $N\text{-}NH_3$, proteína microbiana estimada y AGCC totales.

Por su parte, a las 48 h de incubación, la inclusión de H-PO y SC – UBB, aumentó DIVMS, disminuyó de producción y rendimiento de CH_4; pero disminuyeron la producción de NH_3, producción microbiana, AGCC totales, aunque la proporción de ácido acético aumentó.

V.- DISCUSIÓN GENERAL

Entre las estrategias nutricionales para disminuir las emisiones de CH_4 entérico, el uso de forraje de calidad mejorada ha presentado resultados altamente variables (Beauchemin et al., 2020). La mitigación del CH_4 generado de las dietas basadas en forrajes se puede lograr en cierta medida mejorando la calidad y disponibilidad del forraje, a través del manejo del pastoreo, el momento de la cosecha, el uso de especies forrajeras con digestibilidad superior, uso de plantas que contienen taninos condensados y almacenamiento de forrajes para conservar el contenido de nutrientes digeribles. La disponibilidad de forrajes de calidad nutricional y alta digestibilidad está fuertemente limitada a los aspectos agroecológicos de la zona de cultivo, así como el acceso económico a estos. Una alternativa de valorización de forrajes y subproductos altos en lignina, es el pretratamiento biológico mediante fermentación sólida (Ábrego-Garcia et al. 2021a) con *Pleurotus ostreatus* que, permite la degradación del complejo lignocelulosa, mejorando la calidad propiamente tal del forraje, por aumento de la disponibilidad de nutrientes para los microorganismos del rumen. Adicionalmente, este hongo aporta a la dinámica de fermentación ruminal estatinas, las cuales tienen efecto inhibidor de la metanogénesis, al afectar la síntesis de membranas plasmáticas de las arqueas metanógenicas (Miller and Wolin 2001).

El objetivo planteado en esta investigación fue evaluar, en dietas altas en forrajes, los efectos de la inclusión de heno pretratado con *P. ostreatus* en la dieta y *S. cerevisiae* como aditivo. Para esto, se planteó como primera actividad realizar la biotransformación de heno de ballica con festuca utilizando *P. ostreatus*, lo cual se logro en su totalidad ya que, a través de fermentación en estado sólido de solo 14 días, disminuyó la lignina detergente ácido y aFDNom, con la consiguiente modificación del aporte y disponibilidad de nutrientes del heno, como consecuencia de actividad enzimática lignolitica y presencia de estatinas.

Las estatinas han cobrado interés como aditivo para rumiantes, orientado a la mitigación de emisiones entéricas de CH_4, pero su alto costo (7,4 US$/g) sugiere que el pretratamiento de forrajes con *P. ostreatus* como vía de incorporación de estatinas sería una estrategia viable con aplicaciones de campo y no solo experimentales, de disminución del CH_4 producido por unidad de materia seca consumida, con aumento de la eficiencia de utilización de los nutrientes (Faseleh-Jahromi et al., 2013). El uso de fermentación sólida como vía de inclusión de estatinas en el rumen, tiene la ventaja de generar un 90% de lovastatina en forma β hidroxiácido, la cual corresponde a su forma activa, explicando los mejores resultados del uso de fermentación sólida de material vegetal alto en lignina en

lugar del uso de estatinas puras sobre la inhibición de arqueas (Faseleh-Jahromi et al., 2013; Ábrego-García et al., 2021b) **(**Figura 31).

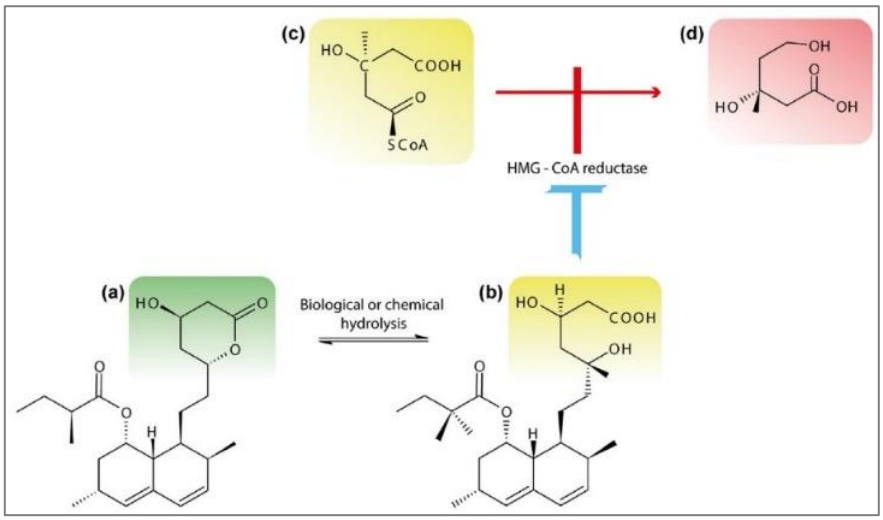


Figura 31 Hidrólisis de lactona de lovastatina y similitud entre las estructuras químicas del ácido β-hidroxi de lovastatina y la HMG-CoA. a) lactona de lovastatina, b) β-hidroxiácido de lovastatina, c) HMGCoA y d) mevalonato Fuente: Ábrego-García et al., 2021b.

La inclusión de heno pretratado con *P. ostreatus* en dos dietas altas en fibra, fue evaluada en porcentajes de 0, 3 y 6 en incubaciones *in vitro* tipo batch, permitiendo evaluar los parámetros de fermentación a las 24 h. Los principales resultados asociados al heno biodegradado (H-PO) fueron aumento de la DIVMS, disminución de producción y rendimiento de CH_4 con 6% de inclusión.

Con el objetivode evaluar el uso de *S. cerevisiae* como aditivo que complemente dietas con inclusión de heno biodegradado con *P. ostreatus*, fueron seleccionados los productos Yea Sacc® y la cepa aislada desde cepa panificadora en la Universidad del Bio Bio (SC-UBB). Considerando los resultados del experimento de uso de heno biodegradado, se determinó que el siguiente experimento sería en la dieta alta en fibra (>30% aFDAom), sobre la cual se evaluarían dos niveles de inclusión de heno biodegradado con *P. ostreatus* (0 y 6% H-PO) y la adición de *S. cerevisaie* en una dosis de 250.000 UFC, ya sea de Yea Sacc® o la cepa SC-UBB. Este ultimo experimeto mostró que el uso de H-PO mantuvo el comportamiento del anterior experimento, con aumento de DIVMS, aumento de ácido acético a las 48h, y disminución del CH_4, tanto en producción (mg/g MS incubada) y en rendimiento (mg/g MS degradada). Mientras que la adición de *S. ceverisiae* como Yea Sacc® no afecto parámetros de DIVMS, PG, ácido propiónico, ácido butirico o ácido acético,

o la producción y rendimiento de CH_4, pero *S. ceverisiae*, proveniente de la cepa SC-UBB mejoró DIVMS, factor de partición, producción de ácido acético a las 48 h, e implicó disminución de la proporción de ácido propiónico y, producción y rendimiento de CH_4.

Es importante mencionar que los resultados presentados en este documento se circunscriben a investigaciones *in vitro*, donde el medio de fermentación es controlado por el uso de soluciones que imitan la composición de la saliva del ruminate y ejercen efecto tampón (Firkins, 2021), esta puede ser una de las razones por las cuales el efecto de *S. cerevisiae* no fue significativo en todos los casos (Mao et al., 2013); como menciona Adesogan et al. (2019) en su revisión, *S. cervisiae* expresa de manera más evidente su efecto en la fermentación ruminal en dietas altas en carbohidratos no estructurales, debido a que este microorganismo modula el pH ruminal durante periodos de acidosis. Los mismos autores, indican la alta variabilidad de resultados con el uso de *S. cerevisiae*, tanto en estudios *in vitro* como *in vivo*. Ogunade and McCoun (2020) añaden como razones de la inconsistencia en el uso de *S. cerevisiae* en estudios previos, a las diferencias en las dosis utilizadas, cepas, composición de las dietas evaluadas y estado nutricional de los animales implicados en los estudios.

A pesar de los resultados positivos en cuanto al uso de heno biodegradado con *P. ostreatus* en las mejoras de digestibilidad de las dietas y emisiones de CH_4, su uso en animales no ha impactado en los sistemas productivos de rumiantes de manera masiva, principalmente debido a lo extenso de los pretratamientos hasta ahora evaluados y al riesgo de degradación de los carbohidratos de los alimentos altos en lignocelulosa (Adesogan et al., 2019). Los resultados de nuestra investigación indican que con fermentación sólida de 14 días logra la degradación del complejo lignocelulosa, sin pérdida de carbohidratos, aumento leve de proteína y actividad de enzimas lignocelulolíticas considerable, gracias a que la cepa de *P. ostreatus* utilizada presenta alta actividad enzimática selectiva, obteniendo así forraje de mejor calidad para alimentación de rumiantes. De esta manera, el diseño de fermentadores a mayor escala que permitan obtener mayores cantidades de heno pretratado, permitirá a investigaciones futuras realizar estudios *in vivo*, que evalúen no solo el uso de heno pretratado como reemplazo parcial de la dieta, sino también el uso de *S. cerevisiae* como aditivo modulador del medio ambiente ruminal.

VI.- CONCLUSIONES

A partir de los experimentos realizados en esta tesis, se puede concluir que:

- El pretratamiento de heno de ballica con festuca mediante fermentación sólida con *P. ostreatus* durante 14 días, mejora las características nutricionales del forraje, con disminución de fracciones fibrosas, por acción de enzimas lignoliticas.
- En base a los protocolos definidos, fue desarrollado un inoculo de *Saccharomyces cerevisiae* a partir de levadura de panificación, con concentración de 1,54 x 10^6 UFC, apto para uso en rumiantes.
- Mediante la evaluación *in vitro* de heno pretratado con *P. ostreatus* en dosis de 0, 3 y 6% en dieta alta y baja en fibra, se determinó que dosis de 6% mejoró la digestibilidad, aumentó la proporción molar de ácido acético, mientras que disminuyó la proporción molar de ácido propiónico y producción de CH_4
- El uso combinado de heno pretratado con *P. ostreatus* y cepa UBB de *S. cerevisiae*, como aditivo para dieta alta en fibra en dosis de inclusión de 6% y 250.000 UFC, respectivamente, mejoró la desaparición *in vitro* de la materia seca a las 24 y 48h de incubación, disminuyó la producción y rendimiento de CH_4, así como la producción de ácidos grasos de cadena corta y la proporción molar de propionato, aunque la proporción molar de ácido acético aumentó a las 48 h de incubación.

VII.- LISTA DE PUBLICACIONES

Del trabajo realizado en esta tesis se desprende una serie de publicaciones y presentaciones las cuales se listan a continuación:

Revistas científicas revisadas por pares

Astudillo-Neira R., Muñoz-Nuñez E., Quiroz-Carreno S., Avila-Stagno J. and Alarcón-Enos J. 2022. Bioconversion in Ryegrass-Fescue hay by *Pleurotus ostreatus* to increase their nutritional value for ruminant, Agriculture 12(4), 534.

Astudillo-Neira R., Suescun-Ospina S., Vera-Aguilera N., Alarcón-Enos J., Ávila-Stagno J. 2023. Biodegraded hay with graded addition of *Pleurotus ostreatus* improves dry matter disappearance and reduces methane production of diets incubated *in vitro*. Italian Journal of Animal Science. 22(1), 347-358.

Astudillo-Neira R., Suescun-Ospina S., Vera-Aguilera N., Alarcón-Enos J., and Ávila-Stagno J. 2024. Uso combinado de *Saccharomyces cerevisiae* y heno biodegradado con *Pleurotus ostreatus* en desaparición *in vitro* de materia seca y producción de gas en fermentación ruminal *in vitro*. Articulo en preparación

Presentaciones en congresos

Astudillo-Neira R., Suescun-Ospina S., Vera-Aguilera N., Alarcón-Enos J., Ávila-Stagno J. 2020. Efecto sobre la digestibilidad, producción de gas y metano de un aditivo de *pleurotus ostreatus* en dietas altas en fibra, XLV Congreso anual SOCHIPA, 11 al 13 en noviembre de 2020.

Astudillo-Neira R., Suescun-Ospina S., Vera-Aguilera N., Alarcón-Enos J., Ávila-Stagno J. 2021. Efecto de la inclusión de heno biodegradado con *pleurotus ostreatus* en dietas para rumiantes sobre producción de ácidos grasos de cadena corta *in vitro*, XLVI Congreso Anual SOCHIPA, 10 al 12 de noviembre 2021.

Astudillo-Neira R., Muñoz-Nuñez E., Quiroz-Carreno S., Ávila-Stago J., Pastene-Navarrete E., Alarcón-Enos J. 2021. Actividad lignolitica de heno de ballica-festuca biodegradado por cepa nativa de *Pleurotus ostreatus*. IX Encuentro de Investigación de Estudiantes de Postgrado.

VIII.- REFERENCIAS

1. Ábrego-García A, Poggi-Varaldo HM, Mendoza-Vargas A, Mercado-Valle FG, Ríos-Leal E, Ponce-Noyola T, Calva-Calva G. 2021a. Effects of fermented oat straw as a lovastatin carrier on *in vitro* methane production and rumen microbiota. Front Energy Res. 9:630701.
2. Ábrego-García A, Poggi-Varaldo HM, Robles-González V, Ponce-Noyola T, Calva-Calva G, Ríos-Leal E, Estrada-Bárcenas D, Mendoza-Vargas A. 2021b. Lovastatin as a supplement to mitigate rumen methanogenesis: an overview. J Anim Sci Biotechnol. 12, 123.
3. Ábrego-García A. 2021c. Efecto de lovastatina sobre la producción de metano, fermentación, y microbiota ruminal. Tesis presentada para obtener el grado de doctor en ciencias en la especialidad en biotecnología, Centro de investigaciones y de estudios avanzados del Instituto Politécnico Nacional, departamento de Biotecnología y Bioingeniería, Ciudad de Mexico, Mexico.
4. Adebayo EA, Martínez-Carrera D. 2015. Oyster mushrooms (*Pleurotus*) are useful for utilizing lignocellulosic biomass. Afr. J. Biotechnol.14(1), 52-67.
5. Adesogan AT, Arriola KG, Jiang Y, Oyebade A, Paula EM, Pech-Cervantes AA, Romero JJ, Ferraretto LF and Vyas D. 2019. Symposium review: Technologies for improving fiber utilization J. Dairy Sci. 102, 5726-5755.
6. Aguilar J, Espinoza M, Cabanillas J, Ávila I, García A, Julca J, Tacanga D, Zuta I, Linares G. 2015. Evaluación de la cinética de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* utilizando un medio de cultivo a base de melaza de caña y suero lácteo. Agroind Sci 5(1), 37-47.
7. Akinfemi A, Adu OA, Doherty F. 2010. Conversion of sorghum stover into animal feed with white-rot fungi: *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus pulmonarius*. African Journal of Biotechnology 9(11), 1706-1712.
8. Akinfemi A, Ogunwole OA. 2012. Chemical Composition and *in vitro* digestibility of rice straw treated with *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus pulmonarius* and *Pleurotus tuber-regium*. Slovak J Anim Sci. 45(1), 14-20.
9. Akpinar M, Urek RO. 2012. Production of ligninolytic enzymes by solid-state fermentation using *Pleurotus eryngii*. Preparative Biochemistry and Biotechnology 42(6), 582-597.

10. Alarcón J, Águila S, Arancibia-Ávila P, Fuentes O, Zamorano-Ponce E, Hernández M. 2003. Production and purification of statins from *Pleurotus ostreatus* (basidiomycetes) strains. Z Naturforsch, 58c, 62-64.
11. Alarcón J, Águila S. 2006. Lovastatin Production by *Pleurotus ostreatus*: Effects of the C:N Ratio, Z Naturforsch. 61c,95-98.
12. Altamirano CA. 2013. Optimización de un método para la producción de biomasa de *Saccharomyces cerevisiae* empleada en la etapa de fermentación del mosto de cerveza, desde un nivel de laboratorio a un nivel piloto, tesis para optar el título profesional de Ingeniero Químico, Facultad de Química, Ingeniería Química é Ingeniería Agroindustrial, Universidad Nacional Mayor De San Marcos, Lima, Perú.
13. Amanzougarene Z, Tejeda MP, Calvo H, de la Fuente G, and Fondevila M. 2020. Microbial fermentation of starch- or fibre-rich feeds added with dry or pre-activated *Saccharomyces cerevisiae* studied *in vitro* under conditions simulating high-concentrate feeding for ruminants. J Sci Food Agric. 100, 2236-2243.
14. Anrique, R. 2014. Composición De Alimentos Para El Ganado Bovino; Cuarta Ed. Consorcio Lechero; Imprenta América Ltd.: Región Metropolitana, Chile.
15. AOAC (Association of Official Analytical Chemists Official). 1997. Methods of Analysis of AOAC International, 16th ed.; Association of Official Analytical Chemists: Arlington, VA, USA.
16. Aoki N, Yanki Z, Kanda S, Kurokawa Y, Sultana H and Itabashi H. 2021. Effect of *Saccharomyces cerevisiae* fermentation product on ruminal fermentation, blood metabolites, and milk production on dairy cows. JARQ 55(3), 265-271.
17. Ardón, C. 2007. La producción de hongos comestibles. Master's Thesis, Universidad de San Carlos de Guatemala, Ciudad de Guatemala, Guatemala.
18. Arias-Islas E, Morales-Barrera J, Prado-Rebolledo O, García-Castillas A. 2020. Metabolismo en rumiantes y su asociación con analitos bioquímicos sanguíneos. Abanico Vet. 10,1-24.
19. Arora DS, Sharma RK, Chandra P. 2011. Biodelignification of wheat straw and its effect on *in vitro* digestibility and antioxidant properties. International Biodeterioration & Biodegradation 65, 352-358.
20. Arora DS, Sharma RK. 2009. Comparative ligninolytic potential of *Phlebia* species and their role in improvement of *in vitro* digestibility of wheat straw. Journal of Animal and Feed Sciences 18,151-161.
21. Astudillo-Neira R, Muñoz-Nuñez E, Quiroz-Carreno S, Ávila-Stagno J, Alarcon-Enos

J. 2022. Bioconversion in Ryegrass-Fescue hay by *Pleurotus ostreatus* to increase their nutritional value for ruminant. Agriculture 12(4), 534.

22. Astudillo-Neira R, Suescun-Ospina S, Vera-Aguilera N, Alarcón-Enos J, and Ávila-Stagno J. 2023. Biodegraded hay with graded addition of Pleurotus ostreatus improves dry matter disappearance and reduces methane production of diets incubated in vitro. Italian Journal of Animal Science. 22(1), 347-358.
23. Ávila JS, Chaves AV, Hernández-Calva M, Beauchemin KA, McGinn SM, Wang Y, Harstad OM, Mc Allister TA. 2011. Effects of replacing barley grain in feedlot diets with increasing levels of glycerol on in vitro fermentation and methane production. Anim Feed Sci Techno. (166–167), 265-268.
24. Ávila-Stagno J, Chaves AV, Ribeiro GO Jr, Ungerfeld EM, McAllister TA. 2014. Inclusion of glycerol in forage diets increases methane production in a rumen simulation technique system. Br J Nutr. 111(5),829-835.
25. Ayala Sánchez NE, Portillo López A, Villarreal Gómez LJ, Rico Mora R, Soria Mercado IE. 2016. Los hongos como fuente de recursos farmacólogicos*: Ganoderma lucidum*; *Grifola frondosa*; y *Pleurotus ostreatus.* Temas de Ciencia y Tecnología Vol 20(58), 25-36.
26. Badarina I, Evvyernie D, Toharmat T, Herliyana EN, Darusman LK. 2013. Nutritive value of coffee husk fermented with *Pleurotus ostreatus* as ruminant feed. Media Peternakan 36(1),58-63.
27. Baron S. 1996. Medical Microbiology, 4th ed, The University of Texas Medical Branch at Galveston.
28. Bath DL, Marble VL. 1989. Testing alfalfa for its feeding value. Leaflet. 21437. WREP 109. Division of agricultural natural resources. University California, Oakland, CA.
29. Bayat AR, Kairenius P, Steganski T, Leskinen H, Comtet-Marre S, Forano E, Chaucheryras-Durand F and Shingfield J. 2015. Effect of camelina oil or live yeasts (*Saccharomyces cerevisiae*) on ruminal methane production, rumen fermentation, and milk fatty acid composition in lactating cows fed grass silage diets. J Dairy Sci. 98, 3166-3181.
30. Beauchemin K, McAllister TA and McGinn S. 2009. Dietary mitigation of enteric methane from cattle. CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources 4, 1-18.
31. Beauchemin KA, Ungerfeld EM, Eckard RJ and Wang M. 2020. Review: Fifty years of research on rumen methanogenesis: lessons learned and future challenges for

mitigation. Animal 14(1), s2–s16.

32. Blümmel M, Steingss H, Becker K. 1997. The relationship between *in vitro* gas production, *in vitro* microbial biomass yield and 15N incorporation and its implications for the prediction of voluntary feed intake of roughages. Br J Nutr. 77, 911-921.
33. Boadi DA, Wittenberg KM, Scott SL, Burton D, Buckley K, Small JA, Ominski KH. 2004. Effect of low and high forage diet on enteric and manure pack greenhouse gas emissions from a feedlot. Can. J Anim Sci. 84, 445-453.
34. Bodas R, Prieto N, García-González R, Andrés S, Giráldez FJ, López S. 2012. Manipulation of rumen fermentation and methane production with plant secondary metabolites. Animal Feed Science and Technology 176, 78- 93.
35. Bonilla-Cárdenas JA, Lemus-Flores C. 2012. Emisión de metano entérico por rumiantes y su contribución al calentamiento global y al cambio climático. Revisión. Rev Mex Cienc Pecu. 3(2), 215-246.
36. Bruno RGS, Rutigliano HM, Cerri RL, Robinson PH, Santos JEP. 2009. Effect of feeding *Saccharomyces cerevisiae* on performance of dairy cows during summer heat stress. Animal Feed Science and Technology 150, 175-186.
37. Bugg TD, Ahmad M, Hardiman EM and Rahmanpour R. 2011. Pathways for degradation of lignin in bacteria and fungi. Nat Prod Rep. 28, 1883-1896.
38. Callaway ES, Martin SA. 1997. Effects of a *Saccharomyces cerevisiae* culture on ruminal bacteria that utilize lactate and digest cellulose. J Dairy Sci 80, 2035-2044.
39. Calsamiglia, S. 1997. Nuevas bases para la utilización de la fibra en dieta de rumiantes. Avances en nutrición y alimentación animal: Xiii Curso De Especialización Fedna/Coord; Rebollar, P.G., Beorlegui, C.d., Mateos, G.G., Eds.; Universidad Autónoma de Barcelona: Barcelona, Spain. pp. 3–19.
40. Cárcamo Behrens M R. 2013. Producción de proteínas recombinantes en cultivos fedbatch de *Saccharomyces cerevisiae* y *Escherichia coli*. Documento de tesis para optar al grado de Magister en Ciencias de la Ingeniería. Pontificia Universidad Catolica de Chile. Escuela de Ingeniería. Santiago de Chile.
41. Carro-Travieso MD, Evan T de, González-Cano J. 2018. Emisiones de metano en los animales rumiantes: influencia de la dieta, Revista "Albéitar" 220, 32-35.
42. Castillo-González AR, Burrola-Barraza ME, Domínguez-Viveros J, Chávez-Martínez A. 2014. Rumen microorganisms and fermentation. Arch Med Vet. 46, 349-361.
43. Chademana I, Offer NW. 1990. The effect of dietary inclusion of yeast culture on digestion in the sheep. Anim. Prod. 50, 483-489.

44. Chan-Cupul W, Heredia-Abarca GP, Rodríguez-Vázquez R. 2016. Aislamiento y evaluación de la actividad enzimática ligninolítica de acromicetos del estado de Veracruz, México. Rev. Int. Contam. Ambient 32, 339-351.
45. Chaucheyras F, Fonty G, Bertin G, Gouet P. 1995. *In Vitro* H_2 utilization by a ruminal acetogenic bacterium cultivated alone or in association with an Archaea Methanogen is stimulated by a probiotic strain of *Saccharomyces cerevisiae*. Applied Environ Microbiol. 61, 3466-3467.
46. Chaucheyras-Durand F, Walker ND, Bach A. 2008. Effects of active dry yeasts on the rumen microbial ecosystem: Past, present and future. Animal Feed Science and Technology 145, 5-26.
47. Chen SY, Ho KJ, Hsieh YJ, Wang LT, Mau JL. 2012. Contents of lovastatin, γ-aminobutyric acid and ergothioneine in mushroom fruiting bodies and mycelia. LWT - Food Science and Technology 47, 274-278.
48. Chen Y, Fan H and Meng F. 2017. *Pleurotus ostreatus* decreases cornstalk lignin content, potentially improving its suitability for animal feed. J Sci Food Agric 97, 1592–1598.
49. Choudhury PK, Jena R, Tomar SK, Puniya AK. 2022. Reducing enteric methanogenesis through alternate hydrogen sinks in the rumen. Methane. 1, 320- 341.
50. Church D.C. 1993. EI rumiante: fisiologfa digestiva y nutricion. Zaragoza, Ed. Acribia, 641 p.
51. Cobellis G, Trabalza-Marinucci M, and Yu Z. 2016. Critical evaluation of essential oils as rumen modifiers in ruminant nutrition: A review. Science of the Total Environment 545-546, 556-568.
52. Cofré P, Velasco R, 2007. Forrajeras: calidad y costos de producción. Informativo Agropecuario Bioleche INIA Quilamapu. 20(4), 49-52.
53. Curia MV, D´Alessandro O y Briand LE. 2010. La enseñanza de conceptos en biotecnología a través de un experimento sencillo y económico. Formación Universitaria Vol 3(1), 27-30.
54. Darabighane B, Salem AZM, Mirzaei Aghjehgheshlagh F, Mahdavi A, Zarei A, Yasseen Elghandour MMM, Lopez S. 2019. Environmental efficiency of *Saccharomyces cerevisiae* on methane production in dairy and beef cattle via a meta-analysis. Environ. Sci. Pollut. Res. 26, 3651-3658.
55. Darwish GAMA, Bakr AA, Abdallah MMF. 2012. Nutritional value upgrading of maize stalk by using *Pleurotus ostreatus* and *Saccharomyces cerevisiae* in solid state

fermentation. Annals of Agricultural Science. 57(1), 47-51.

56. Dávila G, Vázquez-Duhalt R. 2006. Enzimas ligninolíticas fúngicas para fines ambientales. Mensaje Bioquímico. XXX, 29-55.
57. Denev SA, Peeva Tz, Radulova P, Stancheva N, Staykova G, Breev G, Todorova P and Tchobanova S. 2007. Yeast Cultures in Ruminant Nutrition. Bulgarian Journal of Agricultural Science 13, 357-374.
58. Desnoyers M, Giger-Reverdin S, Bertin G, Duvaux-Ponter C and Sauvant D. 2009. Meta-analysis of the influence of *Saccharomyces cerevisiae* supplementation on ruminal parameters and milk production of ruminants. J. Dairy Sci. 92, 1620-1632.
59. Díaz R. 2009. Efecto del pH inicial de desarrollo de *Pleurotus ostreatus* en fermentación sumergida sobre su actividad de lacasas. Tesis para obtener el grado de maestro en ciencias en biotecnología aplicada, Instituto politécnico nacional. Tlaxcala, México.
60. Direkvandi E, Mohammadabadi T and Salem AZM. 2021. Influence of three microbial feed additives of *Megasphaera elsdenii*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus sp*, On ruminal methane and carbon dioxide production, and biofermentation kinetics. J. Appl. Microbiol. 131(2), 623-633.
61. Doto SP, Liu JX. 2011. Effects of direct-fed microbials and their combinations with yeast culture on *in vitro* rumen fermentation characteristics. Journal of Animal and Feed Sciences. 20, 259-271.
62. Elghandour MMY, Salem AZM, Martínez Castañeda JS, Camacho LM, Kholif AE, Vázquez Chagoyán JC. 2015. Direct-fed microbes: A tool for improving the utilization of low quality roughages in ruminants. Journal of Integrative Agriculture. 14(3), 526-533.
63. Elghandour MMY, Vázquez Chagoyán JC, Salem AZM, Kholif AE, Martínez Castañeda JS, Camacho LM and Cerrillo-Soto MA. 2014. Effects of *Saccharomyces cerevisiae* at direct addition or pre-incubation on *in vitro* gas production kinetics and degradability of four fibrous feeds. Italian Journal of Animal Science.13(2), 294-301.
64. Elghandour MMY, Vázquez JC, Salem AZM, Kholif AE, Cipriano MM, Camacho LM and Márquez O. 2017. *In vitro* gas and methane production of two mixed rations influenced by three different cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of applied animal research. 45(1), 389-395.
65. Ellis JL, Kebreab E, Odongo NE, McBride BW, Okine EK, France J. 2007. Prediction of Methane Production from Dairy and Beef Cattle. J. Dairy Sci. 90(7), 3456-3466.

66. Ergun SO, Urek RO. 2017. Production of ligninolytic enzymes by solid state fermentation using *Pleurotus ostreatus*. Annals of Agrarian Science 15, 273-277.
67. Faseleh-Jahromi M, Liang JB, Mohamad R, Goh YM, Shokryazdan P, Ho YW. 2013. Lovastatin-enriched rice straw enhances biomass quality and suppresses ruminal methanogenesis. Biomed Res Int. 2013, 397934.
68. Fazaeli H, Azizi A, Amile M. 2006. Nutritive value index of treated wheat straw with *Pleurotus* fungi fed to sheep. Pak. J. Biol. Sci. 9, 2444-2449.
69. Fazaeli H, Jelan ZA, Mahmodzadeh H, Liang JB, Azizi A, Osman A. 2002. Effect of fungal treated wheat straw on the diet of lactating cows. Asian-Aust J Anim Sci. 15(11), 1573-1578.
70. Fedorah PM, Hrudey SE. 1983. A simple apparatus for measuring gas production by methanogenic culture in serum bottles. Environ Sci Technol Lett. 4(10), 425-432.
71. Ferry JG. 2011. Fundamentals of methanogenic pathways that are key to the biomethanation of complex biomass. Current Opinion in Biotechnology. 22(3), 351-357.
72. Firkins JL. 2021. Invited Review: Advances in rumen efficiency. Applied Animal Science 37, 388-403.
73. France A, Cañumir JA, Cortez M. 2000. Produccion de hongos Ostras (*Pleurotus ostreatus*); No. 23; Boletin INIA—Instituto de Investigaciones Agropecuarias: Primera Edición; Rodríguez, H., Ed.; Imprenta Trama: Chillán, Chile.
74. Galip N. 2006. Effects of dietary *Saccharomyces cerevisiae* live yeast culture supplementation on ruminal digestion and protozoa count in rams fed with diets with low or high ratio forage/concentrate. Revue Méd. Vét. 157 (12), 609-613.
75. García-Oduardo N, Bermúdez-Savon R, Téllez-Suarez I, Chávez-Toledano M, Perraund-Gaime I. 2017. Enzimas lacasa en inóculos de *Pleurotus spp*. RTQ 27, 39-45.
76. Gerber PJ, Steinfeld H, Henderson B, Mottet A, Opio C, Dijkman J, Falcucci A and Tempio G. 2013. Enfrentando el cambio climático a través de la ganadería – Una evaluación global de las emisiones y oportunidades de mitigación. Organización de las naciones unidas para la alimentación y la agricultura (FAO), Roma.
77. Getachew G, Crovetto GM, Fodevila M, Krishnamoorthy U, Sigh B, Spanghero M, Steingass H, Robinson PH, Kailas MM. 2002. Laboratory variation of 24 h *in vitro* gas production and estimated metabolizable energy values of ruminant feeds Anim. Feed Sci Technol. 102, 171-182.

78. Ghorbani GR, Morgavi DP, Beauchemin KA and Leedle JAZ. 2002. Effects of bacterial direct-fed microbials on ruminal fermentation, blood variables, and the microbial populations of feedlot cattle. Journal of Animal Science. 80,1977-1986.
79. González-Caloch I, Nava-Galicia S, Díaz-Godínez R, Garrido-Bazán V, Tlecuitl-Beristain S, Bibbins-Martínez MD. 2015. Determinación de la actividad de oxidasas producidas por *Oxyporus latemarginatus* crecido en fermentación sumergida en presencia y ausencia de colorante amarillo azo. Revista latinoamericana el ambiente y las ciencias 6, 72-88.
80. Guillén-Navarro GK, Márquez-Rocha FJ, Sanchez-Vásquez JE. 1998. Producción de biomasa y enzimas ligninolíticas por *Pleurotus ostreatus* en cultivo sumergido. Rev Iberoam Micol. 15, 302-306.
81. Have RT, Teunissen PJ. 2001. Oxidation mechanisms involved in lignin degradation by white rot fungi. Chem. Rev. 101, 3397-3413.
82. Hoa HT, Wang CL. 2015. The effects of temperature and nutritional conditions on mycelium growth of two oyster mushrooms (*Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus cystidiosus*). Mycobiology 43(1), 14-23.
83. Hong Y, Dashtban M, Chen S, Song R, Qin W. 2012. Enzyme production and lignin degradation by four basidi-omycetous fungi in submerged fermentation of peat containing medium. Int. J. Biol. 4, 172-180.
84. Hristov AN, Oh J, Firkins JL, Dijkstra L, Kebreab E, Waghorn G, Makkar HPS, Adesogan AT, Yang W, Lee C, Gerber PJ, Henderson B and Tricarico JM. 2013. SPECIAL TOPICS -- Mitigation of methane and nitrous oxide emissions from animal operations: I, A review of enteric methane mitigation options. J Anim Sci. 91, 5045-5069.
85. InfoStat Versión 2017. Grupo InfoStat, FCA. Universidad Nacional de Córdoba: Córdoba, Argentina, 2017. Available online: http://www.infostat.com.ar.
86. Jahromi MF, Liang JB, Mohamad R, Goh YM, Shokryazdan P, Ho YW. 2013. Lovastatin-enriched rice straw enhances biomass quality and suppresses ruminal methanogenesis. BioMed Res Int. 397934.
87. Jain S, Caforio A, Driessen AJM. 2014. Biosynthesis of archaeal membrane ether lipids. Front microbial. 5, 1-16.
88. Janssen PH. 2010. Influence of hydrogen on rumen methane formation and fermentation balances through microbial growth kinetics and fermentation thermodynamics. Anim. Feed Sci. Technol. 160, 1-22.

89. Janusz G, Pawlik A, Sulej J, Swiderska-Burek U, Jarosz-Wilkołazka A, Paszczyski A. 2017. Lignin degradation: Microorganisms, enzymes involved genomes analysis and evolution. FEMS Microbiol. Rev. 41, 941-962.

90. Jayasundara S, Ranga Niroshan Appuhamy JAD, Kebreab E and Wahner-Riddle C. 2016. Methane and nitrous oxide emissions from Canadian dairy farms and mitigation options: An updated review. Can. J. Anim. Sci. 96, 306-331.

91. Jeyanathan J, Martin C and Morgavi DP. 2014. The use of direct-fed microbials for mitigation of ruminant methane emissions: a review. Animal 8(2), 250-261.

92. Johnson KA, Johnson DE. 1995. Methane emissions from cattle, Journal of Animal Science. 73, 2483-2492.

93. Jonathan SG, Okorie AN, Garuba EO and Babayemi OJ. 2012. Bioconversion of sorghum stalk and rice straw into value added ruminant feed using *Pleurotus pulmonarius*. Nature and Science. 10(4), 10-15.

94. Juárez-Pacheco LA. 2013. Estudio Químico de una Cepa Comercial del Hongo *Pleurotus sp.* Tesis para obtener el título de Químico Farmacéutico Biólogo, Facultad de Quimica Farmaceutica Biologica, Universidad Veracruzana, Xalapa-Enríquez, Veracruz, México.

95. Khalil JK, Sawaya WN, Hyder SZ. 1986. Nutrient composition of Atriplex leaves grown in Saudi Arabia. Journal of Range Management. 39, 104-107.

96. Khampa S, Wanapat M. 2007. Manipulation of rumen fermentation with organic acids supplementation in ruminants raised in the tropics. Pakistan Journal of Nutrition, 6 (1), 20-27.

97. Khan NA, Hussaun S, Ahman N, Alam S, Bezabhi M, Hendriks WH, Yu P and Cone JW. 2015. Improving the feeding value of straws with *Pleurotus ostreatus*. Animal Production Science. 55, 241-245.

98. Knapp JR, Laur GL, Vadas PA, Weiss WP and Tricarico JM 2014. Invited review: Enteric methane in dairy cattle production: Quantifying the opportunities and impact of reducing emissions. J. Dairy Sci. 97, 3231-3261.

99. Kumari S, Das D. 2015. Improvement of gaseous energy recovery from sugarcane bagasse by dark fermentation followed by biomethanation process. Bioresour Technol. 194, 354-363.

100. Kumla J, Suwannarach N, Penkhrue W, Kakumyan P, Jatuwong, K, Vadthanarat S, Lumyong S. 2020. Cultivation of mushrooms and their lignocellulolytic enzyme production though the utilization of agro-industrial waste. Molecules 25(12), 2811.

101. Lascano GJ, Heinrichs A J and, Tricarico JM. 2012. Substitution of starch by soluble fiber and *Saccharomyces cerevisiae* dose response on nutrient digestion and blood metabolites for precision-fed dairy heifers. J. Dairy Sci. 95, 3298-3309.

102. Leng RA. 2014. Interactions between microbial consortia in biofilms: a paradigm shift in rumen microbial ecology and enteric methane mitigation. Animal Production Science. 54, 519-543.

103. Lila ZA, Mohammed N, Kurokawa Y, Kanda S and Itabashi H. 2004. Effects of a twin strain of *Saccharomyces cerevisiae* live cells on mixed ruminal microorganism fermentation *in vitro*. J. Anim. Sci. 82, 1847-1854.

104. Luley CJ. 2006. Identifying wood decay and wood decay fungi in urban trees. International Society of Arboriculture. Arborist News. 15(2).

105. Lynch HA, Martin A. 2002. Effects of *Saccharomyces cerevisiae* culture and *Saccharomyces cerevisiae* live cells on *in vitro* mixed ruminal microorganism fermentation. J. Dairy Sci. 85, 2603-2608.

106. Madadi M, Abbas A. 2017. Lignin Degradation by Fungal Pretreatment: A Review. J Plant Pathol Microbiol 8, 398.

107. Mao HL, HL Mao, JK Wang, JX Liu, I Yoon. 2013. Effects of *Saccharomyces cerevisiae* fermentation product on *in vitro* fermentation and microbial communities of low-quality forages and mixed diets. J. Anim. Sci. 91, 3291-3298.

108. Marrero Y, Martin E, Rodríguez D, Galindo J. 2010. Efecto de la inclusión de fracciones de cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* en la fermentación ruminal *in vitro* de pastro estrella (*Cynodon nlemfuensis*). Revista Cubana de Ciencia Agricola 44(2), 161-168.

109. Martin C, Morgavi DP and Doreau M. 2010. Methane mitigation in ruminants: from microbe to the farm scale. Animal. 4-3, 351-365.

110. Martin SA, Nisbet DJ and Dean RG. 1989. Influence of a commercial yeast supplement on the in vitro ruminal fermentation. Nutrition Reports Internaational 40(2), 395.

111. Martin SA, Nisbet DJ. 1990. Effects of *Aspergllus oryzae* fermentation extract on fermentation of amino acids, bermudagrass and starch by mixed ruminal microorganisms *in vitro*. J. Anim. Sci. 68, 2142-2149.

112. Martínez A, Speranza M, Ruiz-Dueñas F, Ferreira P, Camarero S, Guillén F, Martínez M, Gutiérrez A, Del Rio J. 2005. Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. Int. Microbiol. 8(3), 195-204.

113. McAllister TA, Beauchemin KA, Alazzeh AY, Baah J, Teather RM, Stanford K. 2011.

The use of direct fed microbials to mitigate pathogens and enhance production in cattle. Can. J. Anim. Sci. 91, 193-211.

114. McAllister TA, Meale SJ, Valle E, Guan LL, Zhou M, Kelly WJ, Henderson G, Attwood GT and Janssen PH. 2015. RUMINANT NUTRITION SYMPOSIUM: Use of genomics and transcriptomics to identify strategies to lower ruminal methanogenesis. J. Anim. Sci. 93, 1431-1449.
115. McAllister TA, Newbold CJ. 2008. Redirecting rumen fermentation to reduce methanogenesis. Aust J Exp Agric. 48, 7-13.
116. Meale SJ, McAllister TA, Beauchemin KA, Harstad OM and Chaves AV. 2012. Strategies to reduce greenhouse gases from ruminant livestock, Acta Agriculturae Scandinavica, Section A – Animal Science, 62(4), 199-211.
117. Meller RA, BA Wenner, J Ashworth, AM Gehman, J Lakritz, JL Firkins. 2019. Potential roles of nitrate and live yeast culture in suppressing methane emission and influencing ruminal fermentation, digestibility and milk production in lactating Jersey cows. J. Dairy Sci. 102, 6144-6156.
118. Menke KH, Raab L, Salewski A, Steingass H, Fritz H, Schrieder W. 1979. The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feeding stuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor *in vitro*. J Agric Sci. (Camb.) 93, 217-222.
119. Menke KH, Steingass H. 1988. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and gas production using rumen fluid. Anim Res Dev. 28, 7-55.
120. Mertens DR. 2002. Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fiber in feeds with refluxing in beakers or crucibles: Collaborative study. J AOAC Int. 85(6), 1217-1240.
121. Mikolaychik IN, Morozova LA, Kahikalo VG, Ovchinnikova LYu, Yarmots LP, Karmatskikh, YuA, Charykov VI. 2019. Microbiological supplements for the metabolic rate correction in calves. International Transaction Journal of Engineering, Management, & Applied Sciences & Technologies 11(1), 1-13.
122. Miller TL, Wolin MJ. 2001. Inhibition of growth of methane-producing bacteria of the ruminant forestomach by Hydroxymethylglutaryl~SCoA reductase inhibitors. J. Dairy Sci. 84, 1445-1448.
123. Miller-Webster T, Hoover WH, Holt M. 2002. Influence of yeast culture on ruminal microbial metabolism in continuous culture. J. Dairy Sci. 85, 2009-2014.
124. Mitchell LK, Heinrichs AJ. 2020. Feeding various forages and live yeast culture on

weaned dairy calf intake, growth, nutrient digestibility, and ruminal fermentation. J. Dairy Sci. 103, 8880-8897.

125. Moloney AP, Drennan MJ 1994. The influence of the basal diet on the effects of yeast culture on ruminal fermentation and digestibility in steers. Anim. Feed Sci. Tech. 50, 55-73.
126. Montoya S, Sánchez OJ, Levin L. 2014. Evaluación de actividades endoglucanasa, exoglucanasa, lacasa y lignina peroxidasa en diez hongos de pudrición blanca. Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial 12(2), 115-124.
127. Morgavi DP, Forano E, Martin C and Newbold CJ. 2010. Microbial ecosystem and methanogenesis in ruminants. Animal 4(7), 1024-1036.
128. Moss AR, Jouany JP, Newbold J 2000. Methane production by ruminants: Its contribution to global warming. Ann. Zootech. 49, 231-253.
129. Mould FL, Kliem KE, Morgan R, Mauricio RM. 2005. *In vitro* microbial inoculum: A review of its function and properties. Animal Feed Science and Technology 123–124, 31-50.
130. Muñoz-Duarte LD. 2012. Evaluación de enzimas degradadoras de lignina producidas por aislamientos fúngicos de cultivos de arroz. Trabajo de grado presentado para optar al titulo de Microbiología Industrial, Pontificia Universidad Javeriana, Bogota, Colombia.
131. Mutsvangwa T, Edwards IE, Topps JH and Paterson GFM. 1992. The effect of dietary inclusion of yeast culture (Yea-Sacc) on patterns of rumen fermentation, food intake and growth of intensively fed bulls. Anim. Prod. 55, 35-41.
132. Mwenya B, Santoso B, Sar C, Gamo Y, Kobayashi T, Arai I, Takahashi J. 2004. Effects of including β1–4 galacto-oligosaccharides, lactic acid bacteria or yeast culture on methanogenesis as well as energy and nitrogen metabolism in sheep. Anim Feed Sci Technol 115, 313-326.
133. Nagaraja TG. 2016. Microbiology of the Rumen. Chapter 2, p, 39-61, In: Rumenology, Millen D, De Beni-Arrigoni M, Lauritano-Pacheco R (Eds), Springer, Cham.
134. Newbold CJ, Rode LM. 2006. Dietary additives to control methanogenesis in the rumen. International Congress Series 1293, 138-147.
135. Newbold CJ, Wallace RJ and McIntosh FM. 1996. Mode of action of the yeast *Sacchavomyces cerevisiae* as a feed additive for ruminants. British Journal of Nutrition. 76, 249-261.
136. Newbold CJ, Williams PEV, McKain N, Walker A, and Wallace RJ. 1990. The effects

of yeast culture on yeast numbers and fermentation in the rumen of sheep. Proc. Nutr. Soc. 49, 47A.

137. Nieto HO. 2009. Evaluación de las condiciones de la fermentación alcohólica utilizando *Saccharomyces cerevisiae* y jugo de caña de azúcar como sustrato para obtener etanol. Trabajo de titulo presnetado para obtenicón de titulo de Ingeniero en Biotecnología. Escuela Politécnica del Ejército, departamento de Ciencias de la Vida, Ingeniería en Biotecnología.
138. NRC. 2001. Nutrient Requirement of Dairy Cattle. 7th revised ed, National Academic Press. 2001. Washington DC. USA.
139. Nsereko VL, Morgavi DP, Rode LM, Beauchemin KA, McAllister TA. 2000. Effects of fungal enzyme preparations on hydrolysis and subsequent degradation of alfalfa hay fiber by mixed rumen microorganisms *in vitro*. Anim Feed Sci Technol. 88, 153-170.
140. Ogunade I, McCoun M. 2020. Effects of adding live *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus*-based enzyme extracts on ruminal fermentation, plasma polyamine concentrations, and fiber digestibility in beef steers fed a high-forage diet. Applied Animal Science 37, 21-26.
141. Oonincx, GAB, van Itterbeeck, J, Heetkamp, MJW, Brand, Hvd., van Loon, JJA, van Huis, A, 2010. An Exploration on Greenhouse Gas and Ammonia Production by Insect Species Suitable for Animal or Human Consumption. PLoS ONE 5, e14445.
142. Opsi F, Fortina R, Tassone S, Bodas R and López S. 2012. Effects of inactivated and live cells of *Saccharomyces cerevisiae* on *in vitro* ruminal fermentation of diets with different forage:concentrate ratio. Journal of Agricultural Science 150, 271-283.
143. Páez M. 2012. Determinación de la actividad enzimática de lacasa y lignina peroxidasa de hongos degradadores de colorantes seleccionados para el tratamiento de aguas residuales de la industria textil; Memora de título para obtención de título de Ingeniería en Biotecnología; Escuela Politécnica del Ejército: Sangolqui, Ecuador.
144. Paggi RA, Fay JP and Faverin C. 2004. *In vitro* ruminal digestibility of oat hay and cellulolytic activity in the presence of increasing concentrations of short-chain acids and glycerol. Journal of Agricultural Science 142, 89-96.
145. Patra A, Tansol P, Minseok K and Zhongtang Y. 2017. Rumen methanogens and mitigation of methane emission by anti-methanogenic compounds and substances. Journal of Animal Science and Biotechnology 8, 13.
146. Patra AK. 2012a. Enteric methane mitigation technologies for ruminant livestock: a synthesis of current research and future directions. Environ Monit Assess. 184, 1929-

1952.

147. Patra AK. 2012b. The use of live yeast products as microbial feed additives in ruminant nutrition. Asian Journal of Animal and Veterinary Advances 7(5), 366-375.
148. Patra AK. 2013. The effect of dietary fats on methane emissions, and its other effects on digestibility, rumen fermentation and lactation performance in cattle: A meta-analysis. Livest Sci. 155, 244-54.
149. Phesatcha K, Phesatcha B, Wanapat M, Cherdthong A. 2020. Roughage to concentrate ratio and *Saccharomyces cerevisiae* inclusion could modulate feed digestion and *in vitro* ruminal fermentation. Vet Sci 7 (151), 1-13.
150. Puniya AK, Salem AZM, Kumar S, Dagar SS, Griffith GW, Puniya M, Ravella SR, Kumar N, Dhewa T, Kumar R. 2015. Role of live microbial feed supplements with reference to anaerobic fungi in ruminant productivity: A review. Journal of Integrative Agriculture. 14(3), 550–560.
151. Purcell PJ, ÓBrien M, Boland TM, ÓDonovan M, ÓKiely P. 2011. Impacts of herbage mass and sward allowance of perennial ryegrass sampled throughout the growing season on in vitro rumen methane production. Anim. Feed Sci Technol. 166–167, 405-411.
152. Quintero JC. 2011. Revisión: Degradación de plaguicidas mediante hongos de la pudrición blanca de la madera. Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín 64(1), 5867-5882.
153. Rahman MM, Lourenco M, Hassim HA, Baars JJP, Sonnenberg ASM, Cone JW, De Boever J, Fievez V. 2011. Improving ruminal degradability of oil palm fronds using white rot fungi. Animal Feed Science and Technology. 169, 157-166.
154. Ramírez JF, Posada-Ochoa S, Rosero-Noguera R. 2015. Effect of lovastatin on *in vitro* methane production and dry matter digestibility of kikuyu grass (Cenchrus clandestinus). Ces Med Vet Zootec. 10(2), 111-121.
155. Ramírez JF, Posda Ochoa S, Noguera R. 2014. Metanogénesis ruminal y estrategias para su mitigación. Rev CES Med Zootec. 9(2), 307-323
156. Relling A, Mattioli G. 2003. Fisiología digestiva y metabólica de los rumiantes. Fac. Ciencias Veterinarias. Argentina: Universidad Nacional de La Plata.
157. Rhine ED, Mulvaney RL, Pratt G, Sims GK. 1998. Improving the Berthelot reaction for determining ammonium in soil extracts and water. Soil Sci Soc Am J. 62(2), 473-480.
158. Rodrigues-Barbosa J, dos Santos Freitas MM, da Silva Martins LH, de Carvalho Junior RN. 2020. Polysaccharides of mushroom *Pleurotus* spp.: New extraction techniques, biological activities and development of new technologies. Carbohydrate Polymers

229, 115550.

159. Rodríguez R, Sosa A y Rodríguez Y. 2007. La síntesis de proteína microbiana en el rumen y su importancia para los rumiantes. Revista Cubana de Ciencia Agrícola, 41(4).
160. Rooke J, Wallace RJ, Duthie CA, Mckain N, Motta de Souza S, Hyslop JJ, Ross DW, Waterhouse T and Roehe R. 2014. Hydrogen and methane emissions from beef cattle and their rumen microbial community vary with diet, time after feeding and genotype. British Journal of Nutrition 112, 398-407.
161. Russouw A, Chevaux E, Chaucheyras-Durand F, Esposito G, Raffrenato E. 2020. Effects of *Saccharomyces cerevisiae*, medium and forage type and their interactions on *in vitro* ruminal fermentation. Heliyon 6, e05028.
162. Salari R, Salari R. 2017. Investigation of the best *Saccharomyces cerevisiae* growth condition. Electronic Physician 9(1), 3592-3597.
163. Sallam SMA, Nasser MEA, El-Waziry AM, Bueno ICS, Abdalla AL. 2007. Use of an *in vitro* rumen gas production technique to evaluate some ruminant feedstuffs. Journal of Applied Sciences Research. 3(1), 34-41.
164. Schofield, P., Pitt, R.E., Pell, A.N., 1994. Kinetics of fibre digestion from *in vitro* gas production. J. Anim. Sci. 72, 2980-2991.
165. Sembiring M, Baba ASH. 2022. *In Vitro* gas production test: towards rapid nutritional evaluation of roughages for ruminant feeding. Formosa Journal of Science and Technology. 1(4), 247-258.
166. Shabtay A, Hadar Y, Eitam H, Brosh A, Orlov A, Tadmor Y, Izhaki I, Kerem Z. 2009. The potential of Pleurotus-treated olive mill solid waste as cattle feed. Bioresource Technology 100, 6457-6464.
167. Sharma RK, Arora DS. 2015. Fungal degradation of lignocellulosic residues: An aspect of improved nutritive quality. Critical Reviews in Microbiology, 41(1), 52-60.
168. Shibata M, Terada F. 2010. Factors affecting methane production and mitigation in ruminants. Animal Science Journal 81, 2-10.
169. Shrivastava B, Nandal P, SharmaA, Jain KK, Khasa YP, Das TK, Mani V, Kewalramani NJ, Kundu SS, Kuhad RC. 2012. Solid state bioconversion of wheat straw into digestible and nutritive ruminant feed by *Ganoderma* sp, rckk02. Bioresour Technol. 107, 347-351.
170. Shrivastava B, Thakur S, Khasa YP, Gupte A, Puniya AK, Kuhad RC. 2011. White-rot fungal conversion of wheat straw to energy rich cattle feed. Biodegradation 22, 823-

831.

171. Shurson GC. 2018. Yeast and yeast derivatives in feed additives and ingredients: Sources, characteristics, animal responses, and quantification methods. Animal Feed Science and Technology 235, 60-76.
172. Smit A, Mushegian A. 2000. Biosynthesis of isoprenoids via mevalonate in Archaea: the lost pathway. Genome Res. 10(10), 1468-84.
173. Soto-Sánchez A, Ramírez-Bribiesca JE, Meneses-Mayo M, Loera-Corral O, Miranda-Romero LA, Bárcena-Gama R. 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. Chil J. Agr Res. 75(3), 313-319.
174. StataCorp. 2015. Stata Statistical Software: Release 14. College Station, TX: StataCorp LP.
175. Suarez C, Guevara CA. 2018. Probiotic use of yeast *Saccharomyces cerevisiae* in animal feed. Res J Zool 1, 1.
176. Suescún-Ospina ST, Vera N, Astudillo R, Yunda C, Williams P, Allende R, Avila-Stagno J. 2022. Effects of País grape marc inclusion in high and low forage diets: ruminal fermentation, methane production and volatile fatty acids. Ital J Anim Sci. 21(1), 924-933.
177. Takemura K, Shingu H, Ikuta K, Sato S, Kushibiki S. 2020. Effects of *Saccharomyces cerevisiae* supplementation on growth performance, plasma metabolites and hormones, and rumen fermentation in Holstein calves during pre- and post-weaning periods. Anim Sci J. 00, e13402.
178. Talukdar R. & Tandon RK. 2008. Pancreatic stellate cells: a new target in the treatment of chronic pancreatitis. J Gastroenterol Hepatol. 23, 34-41
179. Tavendale MH, Megher LP, Pacheco D, Walker N, Attwood GT and Sivakumaran S. 2005. Methane production from in vitro rumen incubations with *Lotus pedunculatus* and *Medicago sativa*, and effects of extractable condensed tannin fractions on methanogenesis. Animal Feed Science and Technology 123–124, 403-419.
180. Téllez-Téllez M, Fernández FJ, Montiel-González AM, Sánchez C, Días Godínez G. 2008. Growth and laccase production by *Pleurotus ostreatus* in submerged and solid-state fermentation. Appl. Microbiol. Biotechnol. 81, 675-679.
181. Tiemann TT, Avila P, Ramirez G, Lascano CR, Kreuzer M, and Hess H. 2008. *In vitro* ruminal fermentation of tanniniferous tropical plants: Plant-specific tannin effects and counteracting efficiency of PEG. Animal Feed Science and Technology 146, 222-241.

182. Trejo-López T, Zepeda-Bastida A, Franco-Fernández J, Soto-Simental S, Ojeda-Ramírez D, Ayala-Martínez M. 2017. Uso de extracto enzimático de *Pleurotus ostreatus* sobre los parámetros productivos de cabras. Abanico Veterinario 7(2), 14-21.

183. Tuyen DV, Phuong HN, Cone JW, Baars JJP, Sonnenberg ASM, Hendriks WH. 2013. Effect of fungal treatments of fibrous agricultural by-products on chemical composition and in vitro rumen fermentation and methane production. Bioresource Technology 129, 256-263.

184. Tuyen VD, Cone JW, Baars JJP, Sonnenberg ASM, Hendriks WH. 2012. Fungal strain and incubation period affect chemical composition and nutrient availability of wheat straw for rumen fermentation. Bioresource Technology 111, 336-342.

185. Ungerfeld E, Rust S, Boone D, Liu Y. 2004. Effects of several inhibitors on pure cultures of ruminal methanogens. J. Appl Microbiol. 97, 520-6.

186. Ungerfeld EM, Newbold CJ 2018. Editorial: Engineering Rumen Metabolic Pathways: Where We Are, and Where Are We Heading. Front. Microbiol. 8, 2627. doi: 10.3389/fmicb.2017.02627.

187. Ungerfeld EM, Rust SR, Burnett R. 2003. Use of some novel alternative electron sinks to inhibit ruminal methanogenesis. Reprod Nutr Dev. 43, 189-202.

188. Ungerfeld EM. 2020. Metabolic hydrogen flows in rumen fermentation: principles and possibilities of interventions. Front. Microbiol. 11, 589.

189. Usnayo P. 2007. Optimización de medios de cultivo, para la producción de enzimas ligninolíticas, por cepas fúngicas aisladas del altiplano boliviano. Trabajo de grado para optar al título de Lic. En Bioquímica. Bachelor's Thesis, Universidad Mayor de San Andrés, La Paz, Bolivia.

190. Valizadeh R, Sobhanirad S, Mojtahedi M. 2008. Chemical composition, ruminal degradability and *in vitro* gas production of wheat straw inoculated by *Pleurotus ostreatus* Mushrooms. J Anim Vet Adv. 7(11), 1506-1510.

191. Van Houtert MFJ. 1993. The production and metabolism of volatile fatty acids by ruminants fed roughages: A review. Animal Feed Science and Technology. 43(3-4), 189-225.

192. Van Soest P, Robertson J, Lewis B. 1991. Methods for dairy fiber, neutral detergent fiber and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. Journal of Dairy Sci. 74, 3586-3597.

193. Vera N, Gutiérrez C, Allende R, Williams P, Fuentealba C, Ávila-Stagno J. 2018.

Dose–response effect of a pine bark extract on in vitro ruminal ammonia and methane formation kinetics. Acta Agric Scand A Animal Sci. 68, 181-189.

194. Vera N, Gutiérrez C, Williams P, Fuentealba C, Allende R and Ávila-Stagno J. 2021. Low concentrations of a polyphenolic extract from pine bark in high–concentrate diets decrease *in vitro* rumen ammonia nitrogen but not methane production. J Appl Anim Res. 49(1), 413-422.
195. Vyas BRM, Molitois HP. 1995. Involvement of an extracellular H_2O_2-dependent ligninolytic activity of the white rot fungus *Pleurotus ostreatus* in the decolorization of Remazol brilliant blue R. Appl Environ Microbiol. 61(11), 3919-3927.
196. Wallace RJ, Newbold C J. 1992. Probiotics for ruminants. In Probiotics: The Scientific Basis, pp. 317-353.
197. Wallace RJ, Snelling TJ, McCartney CA, Tapio I and Strozzi F. 2017. Application of meta-omics techniques to understand greenhouse gas emissions originating from ruminal metabolism. Genet. Sel. Evol. 49, 9.
198. Wang JK, Ye JA and Liu JX. 2012. Effects of tea saponins on rumen microbiota, rumen fermentation, methane production and growth performance a review. Trop Anim Health Prod 44, 697-706.
199. Wang Z, He Z, Beauchemin KA, Tang S, Zhou C, Han X, Wang M, Kang J, Odongo NE, and Tan Z. 2016. Evaluation of different yeast species for improving *in vitro* fermentation of cereal straws. Asian-Australasian journal of animal sciences. 29(2), 230-240.
200. Wolin MJ, Miller TL. 2006. Control of rumen methanogenesis by inhibiting the growth and activity of methanogens with hydroxymethylglutaryl-SCoA inhibitors. Inte Congr Ser. 1293, 131-137.
201. Wu H, Meng Q, Yu Z. 2016. Evaluation of ferric oxide and ferric citrate for their effects on fermentation, production of sulfide and methane, and abundance of select microbial populations using *in vitro* rumen cultures. Bioresour Technol. 211, 603-609.
202. Zain M, Jamurun N, Arnim A, Ningrat RWS, Herawati R. 2011. Effect of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) on fermentability, microbial population and digestibility of low quality roughage *in vitro*. Archiva Zootechnica 14(4), 51-58.
203. Zuo S, Niu D, Zheng M, Jiang D, Tian P, Li R, Xu C. 2018. Effect of *Irpex lacteus*, *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus cystidiosus* pretreatment of corn stover on its improvement of the *in vitro* rumen fermentation. J Sci Food Agric. 98(11), 4287-4295.