



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**DIGESTIBILIDAD Y PRODUCCIÓN DE GAS *IN VITRO* DEL
RASTROJO DE MAÍZ INOCULADO CON *Paraconiothyrium***

brasiliense

TESIS QUE PRESENTA

PEDRO VICENTE FABIÁN

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

ASESORES

Dr. José Herrera Camacho

Dr. Gerardo Vázquez Marrufo

Morelia, Michoacán. Febrero del 2016.

Oficio de la mesa revisora

DEDICATORIA

A Dios, por haberme dado la vida y sobre todo la oportunidad de realizar mis sueños y mis metas de mantenerme de pie a pesar de todo.

A mis padres, Elisa Fabián Ambrosio y José Vicente Bautista, por el apoyo y ayuda incondicional, por los consejos y sobre todo ser los motores que han impulsado mi vida, que con su ternura alegría e inmenso amor son la fortaleza no solo de mi sino de toda mi familia, para ser mejores cada día y alcanzar nuestras metas en las que mil palabras no bastarían para agradecerles por su apoyo su comprensión y consejos en todo momento.

¡Muchas gracias!

A mis hermanos, por ser una motivación más para seguir adelante y cumplir mis sueños.

A mi familia, por su apoyo y consejos para tomar las decisiones de mi vida.

AGRADECIMIENTO

A mis asesores, Dr. José Herrera Camacho y Dr. Gerardo Vázquez Marrufo por instruirme en mi proyecto de titulación por el apoyo que me ofrecieron, también por todas las enseñanzas brindadas, y por la paciencia que me tuvieron para el desarrollo del proyecto.

Al maestro, Karlos Edmundo quien me instruyo para realizar este trabajo de tal manera que me sirvieran para la vida profesional.

A mis compañeros, por el apoyo dentro y fuera del aula de clases. Mi gratitud a todos aquellos que con su sabiduría y amistad colaboraron con la ejecución de este trabajo, Miguel Pérez, David Soriano, Heriberto Ponce de León, Tomas Saucedo, Jordi Cruz, Scott Hernández, Eduardo Calderón.

....Gracias.

INDÌCE

1. INTRODUCCIÓN	1
Hipótesis.....	4
Objetivo general.....	4
2.1. NUTRICIÓN DE LOS RUMIANTES	5
2.2. MICROBIOLOGÍA	5
2.2.1. EL ECOSISTEMA RUMINAL.....	5
2.2.2. BACTERIAS RUMINALES.....	6
2.2.2.1. Bacterias hemicelulíticas.....	7
2.2.2.2. Bacterias amilolíticas.....	7
2.2.2.3. Bacterias proteolíticas.....	7
2.2.2.4. Bacterias lipolíticas.....	7
2.2.2.5. Bacterias metano-génicas;	7
2.2.2.6. Bacterias que utilizan aminoácidos.....	8
2.2.3. Protozoarios ruminales	9
2.2.4. Hongos ruminales.....	10
2.3. DIGESTIÓN DE LAS SUSTANCIAS ORGÁNICAS	11
2.3.1. Digestión de las proteínas en el rumiante	11
2.3.1.1. Hidrolisis y metabolismo de los aminoácidos	11
2.3.2. Digestión y metabolismo de lípidos en los rumiantes	12
2.3.2.1. Catabolismo de los lípidos.....	13
2.3.3. Digestión de los carbohidratos en el rumen	14
2.3.3.1. Degradación de la celulosa.....	14
2.4. ESQUILMOS AGRÍCOLAS.....	16
2.4.1 Esquilmo agrícola	16
2.4.2 Factores que limitan el uso de residuos de cosecha.....	18
2.4.3. Método físico en el tratamiento del rastrojo.....	18
2.4.4. Métodos químicos en el tratamiento del rastrojo	18
2.4.5. Método biológico con hongos en el tratamiento del rastrojo	19
2.5. MICROORGANISMO BIOTECNOLÓGICOS (HONGOS) DEGRADADORES DE SUSTRATOS.....	20

2.5.1. Hongos como agente degradadores de esquilmos agrícolas.....	20
2.6. ENZIMAS LIGNOLITICAS EN HONGOS.....	21
2.6.1. Enzima lacasa	21
2.6.2. Enzima lignin peroxidasa (LiP).....	21
2.6.3 Enzima manganeso peroxidasa (MNP).....	22
2.7. METODOS PARA EVALUAR LA DIGESTIBILIDAD EN LOS RUMIANTES	22
2.7.1. Técnica de digestibilidad <i>in-vivo</i>	22
2.7.2. Pruebas de digestibilidad <i>in vitro</i>	23
2.7.3. Pruebas de digestibilidad <i>in situ</i>	24
2.7.4. Producción de gas	25
2.8. FIBRAS DETERGENTES	25
2.8.1. La fibra detergente neutra (FDN).....	25
2.8.2. Fibra detergente acida (FDA)	26
2.8.3. Ácidos grasos volátiles (AGV).....	27
3. MATERIALES Y METODOS.....	28
3.1. Preparación de la cepa de <i>Paraconiothyrium brasiliense</i>	28
3.2 Inoculación del rastrojo.....	28
3.3 Tratamientos y producción de gas <i>in vitro</i>	29
3.4 Digestibilidad in vitro de la materia seca	30
3.5 Análisis estadístico	30
4. RESULTADOS	31
5. DISCUSIÓN.....	32
7. CONCLUSIÓN	35
8. BIBLIOGRAFIA	36

INDÌCE DE FIGURAS

Ilustración 1. Tipos morfológicos de bacterias ruminales.	7
Ilustración 2. Protozoarios que habitan en el complejo retículo-rumen. (Abner y Rodríguez, 2008).....	10

INDÌCE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de las principales bacterias del rumen según el tipo de sustrato que fermentan (adaptado de Yokohama y Johnson, 1988).	8
Tabla 2. Clasificación de los carbohidratos adaptado por (Van Soest, 1982).	15

INDÌCE DE GRAFICAS

Gráfica 1. Porcentaje de AGV con forraje y concentrado (Wattiaux, 2000).	15
--	----

INDÌCE DE CUADROS

Cuadro 1. Análisis bromatológico en rastrojos de maíz expuestos al hongo <i>Paraconiothyrium brasiliense</i> (cepa CUMU-196) durante 0 (CONTROL), 10 (R10) y 12 (R12) semanas.	31
Cuadro 2. Producción acumulada de gas y digestibilidad in vitro de la materia seca, en rastrojos de maíz expuestos al hongo <i>P. brasiliense</i> (cepa CUMU-196) durante 0 (CONTROL), 10 (R10) y 12 (R12) semanas.	32

Resumen

Se evaluó la producción de gas (PG) y digestibilidad *in vitro* de materia seca (DIVMS) de rastrojos de maíz inoculado con el hongo *Paraconiothyrium brasiliense*. Los parámetros de PG y DIVMS se determinaron en muestras de rastrojo con el hongo durante por 10 (R10) y 12 semanas (R12) en fermentación en sustrato sólido. El desempeño de estos se comparó con un rastrojo intacto como grupo control (CON) que no fue tratado con el hongo. El cultivo se realizó con 0.99 g de materia seca de cada rastrojo, 10 ml de líquido ruminal y 90 ml de saliva artificial durante 120 h a 39 °C. Se evaluó la PG y la DIVMS en los residuos sólidos del cultivo bajo un análisis de comparación de medias y de proporciones, respectivamente. Se encontró una mayor PG en la muestra CON (266.6 cm³), que en las muestras de rastrojo incubadas con hongo, aunque sin diferencia respecto al tratamiento R10 (247.99 cm³) (P= 0.2021), pero siendo superior al R12 (219.5 m³) (P=0.0139). En cuanto a la DIVMS, se observó un comportamiento similar entre CON y R12 (84.23 % vs 67.4 % respectivamente) (P=0.0265), sin encontrarse diferencias respecto al R10 (71.7 %) (P=0.595). La exposición de los rastrojos de maíz al hongo *P. brasiliense*, durante 10 y 12 semanas, no mejoró la PG, ni la DIVMS, respecto a un rastrojo control en cultivos ruminales.

Palabras clave: hongos, enzimas, lignina, forrajes, rumiantes

SUMMARY

Gas production (GP) and *in vitro* digestibility of dry matter (IVDDM) of corn stover exposed to the fungus *Paraconiothyrium brasiliense* were evaluated. Two samples of forage were kept in contact with the pure strain of the fungus for 10 weeks (R10) and 12 weeks (R12) in an aqueous medium under anaerobiosis. Their performance were compared against an intact stover, control group (CON). Culture was made with 0.99 g dry matter of each stover, 10 ml of ruminal liqueur and 90 ml of artificial saliva during 12 hours at 39 °C. The PG and IVDDM, were assessed under comparatives means and proportions respectively. Higher PG was found in CON (266.6 cm³), than the stover exposed to fungus, although without difference to R10 (247.99 cm³) (P= 0.2021), but being higher to R12 (219.5 m³) (P=0.0139). In the IVDDM, was observed a similar situation between CON and R12 (84.23 % vs 67.4 % respectively) (P=0.0265), without finding differences to R10 (71.7 %) (P=0.595). The exposition of corn stover to *P. brasiliense* fungus, during 10 and 12 weeks, did not improve PG, neither IDD, compared to an intact stover in ruminal culture.

Key words: fungus, enzymes, lignin, forage, ruminants.

1. INTRODUCCIÓN

El maíz (*Zea Mays*) es una gramínea que se cultiva a nivel nacional y mundial, se produce en los ciclos agrícolas primavera-verano y otoño-invierno, siempre que existan condiciones agroclimáticas que oscilen entre los 25 °C y 30 °C de temperatura y una humedad relativa de 40-80 % (SIACON-SIAP, 2011). Anualmente se destinan alrededor de 7.8 millones de hectáreas para la producción de maíz en México, que representa el 49.7 % de la superficie nacional cultivable. La producción nacional, durante el periodo 2008-2011 tuvo un promedio anual de 21.3 millones de toneladas de grano y 25.5 millones de toneladas de residuos (rastrojo), los cuales constituyen el 68 % de este cultivo. Se estima que por cada kilogramo de grano que se cosecha, se produce al menos 1 kg de residuos (Macedo *et al.*, 2001; Muñoz, 2011; SIACON-SIAP, 2011). Los residuos de cosecha, también conocidos como rastrojos o esquilmos agrícolas, están constituidos principalmente por los polímeros, celulosa, hemicelulosa y lignina. Dichos polímeros forman parte de la pared celular de la plantas, dándoles soporte, rigidez y resistencia contra factores climáticos y ambientales (Fuentes *et al.*, 2001).

El rastrojo de distintas plantas desempeña un papel preponderante en los sistemas agrícolas y pecuarios, y ha sido estudiado desde diferentes perspectivas temáticas y metodológicas a nivel mundial (Macedo, 2000). Son utilizados en la alimentación de los rumiantes, ya que son un complemento de energía en la ración, pero sobre todo proveen suficiente materia seca para complementar los requerimientos diarios del ganado (Herrera *et al.*, 2008). En este sentido, el rastrojo de maíz es el esquilmo agrícola más importante de México, ya que es accesible por su precio y disponibilidad en la época de estiaje, además de que es fácil de conservar, procesar y almacenar (Villegas *et al.*, 2001; SAGARPA, 2009). Sin embargo, es uno de los forrajes con menor digestibilidad, la cual oscila entre el 45 y 55 % (Fuentes *et al.*, 2001). Esto resulta de una baja disponibilidad de sus nutrientes, que además son escasos, siendo sus contenidos de proteína cruda 5.9

%, energía metabolizable 1.58 Mcal/kg, fibra bruta 39.5 %, de la cual la fibra detergente acida representa alrededor del 46.75 %. Valores que lo definen como un forraje de baja calidad, que además posee una baja palatabilidad en ausencia de granos saborizantes, edulcorantes u otros tratamientos que mejoren el consumo del animal y su digestibilidad (Castañeda y Monroy, 1984; Howard *et al.*, 2004). Ante dicha situación se han desarrollado algunos métodos para mejorar el aprovechamiento del rastrojo, tales como el picado (entre 3-5 cm de largo), la molienda (≤ 2 cm), y el uso de altas temperaturas y presión con vapor, con la finalidad de hacer más accesible la pared de la fibra de rastrojo a la flora microbiana del rumen (Fuentes *et al.*, 2001). El tratamiento de la pared celular del rastrojo facilita su degradación sin mayor uso de energía por parte del animal al consumir, masticar y fermentar el alimento (Yescas *et al.*, 2004). Igualmente existen algunos métodos químicos, como el uso de álcalis o ácidos fuertes para romper los enlaces que unen a la celulosa y hemicelulosa a lignina, mejorando su tasa de degradación ruminal. Los químicos más usados son: hidróxido de calcio (CaOH_2), amoníaco gaseoso (NH_3), hidrólisis de la urea o del ácido úrico en amoníaco (amonificación) y ácido sulfúrico (H_2SO_4) (Pandey *et al.*, 1999; Lynd *et al.*, 2002). Los tratamientos con amoníaco en exceso pueden causar problemas de salud a los animales con sintomatologías en el sistema nervioso, además de que 2/3 se volatiliza causando contaminación del aire y afectando la salud del hato. El uso de urea en exceso en el rastrojo da como resultado un adelgazamiento de las paredes ruminales provocando un envenenamiento y la consiguiente muerte del animal (Pandey *et al.*, 1999).

Por su parte las alternativas biotecnológicas reducen riesgos y permiten un mayor aprovechamiento de la fibra de rastrojo mediante el uso de microorganismos como los hongos, entre los que se han estudiado las especies que sintetizan enzimas lignolíticas como, lacasa, lignin-peroxidasa y manganeso-peroxidarasa, (Lynd *et al.*, 2002). Estas especies pueden ser mesófilas o termófilas, produciendo la catálisis en condiciones favorables de temperatura, iluminación y humedad. Dichos hongos utilizan los componentes de la pared celular del rastrojo como fuente de energía para su metabolismo (Juárez, 2002).

A la fecha no se ha evaluado la capacidad de especies del género *Paraconiothyrium*, para delignificar la pared celular del rastrojo no obstante que se ha documentado la producción de enzimas lignolíticas extracelulares en algunas de estas (Verkley, 2004).

Las enzimas aisladas de algunas especies de hongos se han utilizado en distintos procesos agroindustriales como la clarificación de los jugos de frutas y vegetales, en la extracción de aceites, como antioxidantes, como facilitadores en el proceso de maltado para la producción de cerveza y en la nutrición animal, produciendo cambios estructurales en la composición de forraje (Márquez *et al.*, 2005).

Algunas investigaciones realizadas para el tratamiento de esquilmos de maíz y bagazo de caña, se han realizado con enzimas de hongos de pudrición blanca del grupo de los basidiomicetos, entre los que destacan las especies de los género se mencionan los del género *Trametes*, *Pleurotus* etc. Estos estudios han demostrado resultados favorables en la degradación de la pared celular de la fibra por parte de algunas de las cepas fúngicas evaluadas que los convierten, una herramienta biotecnológica para la degradación de la fibra (Verkley, 2004).

Por las que las investigaciones realizadas con el grupo de los ascomicetes concernientes a los *Paraconiothyrium*, poseen actividad de destrucción de la pared externa de las plantas (Crous *et al.*, 2000). Encontrándose enzimas como la lacasa en mayor proporción que lignin peroxidasa y manganeso peroxidasa que se han aislado de huéspedes leñosos (Lynd *et al.*, 2002).

Estudios de digestión en forrajes con cepas de hongo *Paraconiothyrium brasiliense* se han realizado, pretendiendo aprovechar sus propiedades descritas como degradadores de fibra vegetales, esto para tratar rastrojos de maíz, dada la importancia en la industria pecuaria de dicho sustrato.

Hipótesis

La inoculación de rastrojo de maíz con el hongo *Paraconiothyrium brasiliense* mejora su digestibilidad y producción de gas en sistemas de fermentación ruminal *in vitro*.

Objetivo general

Evaluar la digestibilidad y producción de gas *in vitro* de rastrojo de maíz inoculado con el hongo *Paraconiothyrium brasiliense*, como una herramienta para mejorar su calidad en la nutrición del ganado.

2. REVISIÓN DE LA LITERATURA

2.1. NUTRICIÓN DE LOS RUMIANTES

Los rumiantes se caracterizan por poseer tres pre-estómagos y un estómago verdadero o glandular, su dieta es a base de pastos, forrajes, granos, y los residuos de cosecha, conformados por material fibroso (Cronje, 2000), que es degradado por microorganismos que se alojan en la cavidad ruminal proveyéndolo de nutrientes (Mendoza et al., 2008). La nutrición se designa como el proceso en el que organismo utiliza los distintos elementos de la materia orgánica de los alimentos para la digestión, liberando energía (calor), debido a la oxidación de las sustancias orgánicas, (hidratos de carbono, grasas y proteínas) contenida en los forrajes (Martínez, 2007), con la finalidad de cubrir las necesidades fisiológicas de crecimiento, desarrollo, mantenimiento, desarrollo corporal, preñez, y estado reproductivo (Haro y Haro, 2007). Este aprovechamiento del forraje depende del estado óptimo del rumen, del funcionamiento de la flora bacteriana, de la relación energía-proteína, del consumo de agua que depende de la edad, así como del clima predominante y consumo de la materia seca. (Araujo, 2002; Gasques, 2008). Al ser hidrolizados y metabolizados por microorganismos ruminales, los forrajes producen amoníaco (N_2), productos finales de la fermentación AGV (acético, propiónico y butírico), metano CH_4 , dióxido de carbono CO_2 e hidrogeno H_2 (Relling y Mattioli, 2003).

2.2. MICROBIOLOGÍA

2.2.1. EL ECOSISTEMA RUMINAL

La mayoría de los microorganismos presentes en el rumen funcional son anaerobios estrictos los cuales son bacterias, protozoarios y hongos (Abner y Rodríguez, 2008), responsables de la degradación de los componentes

estructurales de las plantas en el que el número dependerá de la composición y estructura de la dieta, así como de las interacciones entre los mismos rumiantes y el ambiente en que se encuentren (Cros, 1991). La interacción entre los microorganismos y el ambiente gástrico del animal constituyen una simbiosis, la cual el rumen otorga un ambiente propicio de 39.5 °C, para la multiplicación y actividad metabólica microbiana (Vargas y Kolver, 1997). Mientras que los microorganismos aportan al rumiante los productos finales de la fermentación (AGV), síntesis de proteína bacteriana, aminoácidos esenciales y no esenciales, así como vitaminas hidrosolubles, como fuente de energía principal para el animal (Pinos *et al.*, 2002).

2.2.2. BACTERIAS RUMINALES

Las bacterias son microorganismos unicelulares (procariotas), sin núcleo definido y pared celular formada por peptidoglucanos (Abner y Rodríguez, 2008). Son los microorganismos más abundantes del complejo retículo-rumen, existiendo alrededor de 10^9 y 10^{10} células bacterianas por g de contenido ruminal (Contreras y Noro, 2010), e incluyen 32 géneros y 63 especies, siendo 16 géneros y 28 especies consideradas importantes por su número y capacidades metabólicas (Abner y Rodríguez, 2008). Los productos metabólicos resultantes de la fermentación del forraje por parte de las bacterias ruminales son los ácidos grasos volátiles (AGV), principalmente acético, propiónico y butírico (Blanco, 1999). Estos ácidos representan la principal fuente de energía para el rumiante siendo absorbidos a través de la pared ruminal y transportados al hígado los cuales son absorbidos a través de la pared ruminal y transportados al hígado en donde se metabolizan para ser distribuidos a los tejidos del cuerpo de los rumiantes (Cronje, 2000).



Ilustración 1. Tipos morfológicos de bacterias ruminales.

A).cocos. B). bacilos. C. espirilos (Abner y Rodríguez, 2008).

2.2.2.1. Bacterias hemicelulíticas; son las que hidrolizan la hemicelulosa que contienen pentosas además de hexosas entre los azúcares que forman la molécula (Blanco, 1999; Contreras y Noro, 2010).

2.2.2.2. Bacterias amilolíticas; hidrolizan y digieren el almidón que se incrementa considerablemente cuando la dieta es a base de almidones (Blanco, 1999; Contreras y Noro, 2010).

2.2.2.3. Bacterias proteolíticas; hidrolizan las proteínas y se utilizan como fuente primaria de energía que utilizan los azúcares mono y disacáridos (Blanco, 1999; Contreras y Noro, 2010).

2.2.2.4. Bacterias lipolíticas; hidrolizan el glicerol en moléculas de grasa, los ácidos grasos no saturados y los que se metabolizan de cadena larga y los cuerpos cetónicos (Blanco, 1999; Contreras y Noro, 2010).

2.2.2.5. Bacterias metano-génicas; son las que producen metano a partir de la reducción del dióxido de carbono o el ácido fórmico, en este grupo destaca *Methanobacterium ruminantium*, y son capaces de utilizar diferentes ácidos

organicos como láctico, succínico, málico, fumárico, oxálico (Blanco, 1999; Contreras y Noro, 2010).

2.2.2.6. Bacterias que utilizan aminoácidos, como fuente de energía son incapaces de utilizar otra fuente de energía y generalmente se incluyen dentro de las bacterias proteolíticas (Blanco, 1999; Contreras y Noro, 2010).

Tabla 1. Clasificación de las principales bacterias del rumen según el tipo de sustrato que fermentan (adaptado de Yokohama y Johnson, 1988).

Principales grupos celulíticas. <i>Fibrobacter</i> <i>Succinogenes</i> <i>Ruminococcus flavefaciens</i> <i>Rutyrvibrio fibrisolvens</i>	Principales especies proteolíticas. <i>Ruminobacter</i> <i>Amylophilus</i> <i>Prevotella ruminicola</i> <i>Atreptococcus bovis</i> <i>Butyrvibrio fibrisolvens</i>
Principales especies hemicelulíticas. <i>Butyrvibrio fibrisolvens</i> <i>Prevotella ruminicola</i> <i>Ruminococcu. Sp</i>	Principales especies utilizadoras de lípidos. <i>Anaerovibriolipolytica</i> <i>Eubacterium sp</i> <i>Butyrvibrio</i> <i>Fibrisolvens</i> <i>Fusocillus sp</i> <i>Treponemas</i> <i>Bryantii</i> <i>Micrococcus sp</i>
Principales especies pectinolíticas.	Principales especies productoras de

<i>Butyrivibrio</i> <i>Fibrisolvens</i> <i>Succinivibrio dextrinosolvens</i> <i>Prevotella</i> <i>Ruminicola</i> <i>Treponema bryantii</i> <i>Streptococcus bovis</i>	metano. <i>Methanobrevibacter ruminantium</i> <i>Methanobacterium formicicum</i> <i>Methanomicrobium mobile</i>
Principales especies amilolíticas. <i>Ruminobacter amylophilus</i> <i>Atreptococcus bovis</i> <i>Succinomonas amylolyticas</i> <i>Prevotella ruminicola</i>	Principales especies de amoniaco. <i>Prevotella ruminicola</i> <i>Megasphaera elsdenii</i> <i>Selenomona ruminantium</i>
Principales especies utilizadoras de azúcares. <i>Treponema bryantii</i> <i>Lactobacillus vitulinus</i> <i>Lactobacillus ruminus</i> Principales especies utilizando ácidos <i>Megasphaera eelsdenii</i> <i>Selenomonas ruminantium</i>	Principales especies ureolíticas. <i>Succinivibrio dextrinosolvnes</i> <i>Selenomonas sp</i> <i>Prevotella ruminicola</i> <i>Ruminococcus bromii</i> <i>Butyrivibrio sp</i>

2.2.3. Protozoarios ruminales

Los protozoarios ciliados forman parte de la biomasa del rumen en un 50 %, contribuyendo con 20 % de la proteína microbiana dependiendo del tipo de dieta

que se le suministre al rumiante (Vargas y Kolver, 1997). Su contribución es pequeña en el metabolismo en comparación con las bacterias, ya que ninguna acción de los protozoarios parece esencial para el metabolismo de los pre-tomagos (Blanco, 1999). El número de protozoarios es de aproximadamente 10^4 a 11^6 células por g / ml de contenido ruminal, siendo anaeróbicos estrictos, los cuales no pueden sintetizar proteína a partir del nitrógeno no proteico (Abner y Rodríguez, 2008). Estos tampoco pueden degradar la celulosa, pero en compensación están capacitados para almacenar hidratos de carbono en forma de polisacáridos somáticos, los cuales son utilizados como fuente de energía durante los intervalos de ingesta utilizando sus cilios como medio de locomoción y adhesión para la degradación de los sustratos accesibles (Vargas y Kolver, 1997).

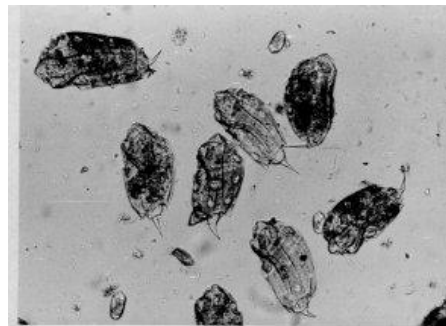


Ilustración 2. Protozoarios que habitan en el complejo retículo-rumen. (Abner y Rodríguez, 2008).

2.2.4. Hongos ruminales

Se descubrió la presencia de hongos en el rumen de los animales en los años 70, entre los géneros más frecuentes están, *Neocallimastix*, *Caecomyces*, *Pyromyces*, *Orpinomyces* (Díaz *et al.*, 2008). El hecho de que los hongos no predominen en el rumen se debe a su tiempo lento de generación en comparación con las bacterias (Vargas y Kolver, 1997). Esto representan el 8 % de la masa microbiana, reduciendo su número en el rumen con dietas ricas en concentrado e inhibidos por algunas bacterias ruminales (Fondevila, 1998). Los hongos producen un complejo enzimático para degradar la fibra con actividad celulítica,

para degradar la fibra, cuando los forrajes son demasiados maduros y encañados (Cronje, 2000), dirigiendo además parte de la lignina, la cual se asocia con su capacidades fibrolíticas o degradativas favorecidas por sus rizoides ramificados que penetran el sustrato y facilitan la degradación de la pared celular (Díaz *et al.*, 2008). Sin embargo no pueden degradar la pectina y el ácido poligalacturiano, (Estrada *et al.*, 1993).

2.3. DIGESTIÓN DE LAS SUSTANCIAS ORGÁNICAS

2.3.1. Digestión de las proteínas en el rumiante

La proteína es un nutriente esencial en la nutrición de los rumiantes debido a que cubren las necesidades de nitrógeno de los microorganismos ruminales, al mismo tiempo que aportar aminoácidos y péptidos al animal (Bruni y Chilbroste, 2001). Los microorganismos del rumen requieren nitrógeno proteico y nitrógeno no proteico, obteniendo este último a partir del amoníaco (Pereira, 2008), el cual es metabolizado en el hígado a urea por acción de la enzima ureasa y secretado en la saliva, para la síntesis de aminoácidos (McAllister *et al.*, 1996). Una disminución de amoníaco para las bacterias reduce la digestibilidad de los forrajes consumidos y por consiguiente se tiene una menor producción de AGV, que representa la principal fuente de energía para el animal (Rodríguez y Rodríguez, 2007).

2.3.1.1. Hidrolisis y metabolismo de los aminoácidos

La hidrolisis de la proteína consta de varias etapas en las que los microorganismos bacterianos se adhieren a la proteína soluble del forraje con actividad proteolítica en un medio de pH de 5.5-7 (Mc Allister *et al.*, 1993), es en este punto en que la cadena peptídica es atacada por diversas exo y endo

proteasas liberando péptidos y aminoácidos, los cuales son absorbidos por los microorganismos para incorporarlos a la síntesis proteica produciendo AGV, CO₂ y amoniaco para cubrir los recubrimientos de energía y proteína (Martínez *et al.*, 2012).

La actividad proteolítica de los protozoarios es diez veces menor que la de la bacteria en condiciones de pH 6-7 con una actividad de cisteína proteasa actuando sobre el sustrato para que puedan ser engullidos fácilmente (Rodríguez y Rodríguez, 2007). Los aminoácidos se sintetizan intracelularmente por la degradación de los péptidos (Bruni y Chilbroste, 2001) Así mismo, los aminoácidos libres en el líquido ruminal del animal proceden mayoritariamente de la lisis de los mismos microorganismos y de la síntesis microbiana (Klopfestein *et al.*, 1972). La energía destinada a la síntesis microbiana deriva de la fermentación de carbohidratos (Contreras y Noro, 2010), que determinan la cantidad de AGV y energía producida durante la fermentación la cual no será aprovechada en su totalidad por el rumiante, sino que una parte se destina a la producción de ATP para los microorganismos ruminales en la síntesis microbiana (Martínez *et al.*, 2012).

2.3.2. Digestión y metabolismo de lípidos en los rumiantes

Los lípidos son un grupo de diversos compuestos orgánicos presentes en los tejidos vegetales y animales, insolubles en agua pero solubles en solventes orgánicos como el éter (Marín *et al.*, 2010). El extracto etéreo no refleja el verdadero valor nutricional de la fracción lipídica de los forrajes, ya que parte de estos están compuestos de sustancias saponificables (ceras, terpenos) de nulo valor energético para los rumiantes (Palmquist y Jenkins, 2003). Los lípidos incluyen a los ácidos grasos unidos a glicerol, triglicéridos, glicolipidos y fosfolípidos de las materias primas no forrajeras y los glicolipidos y fosfolípidos que predominan en los forrajes (Palmquist, 1996). Siendo los ácidos grasos insaturados mayoritarios en los lípidos de los forrajes, cereales y subproductos,

mientras que en los forrajes verdes predominan los ácidos linolínico y linoléico que representa el 10 y 20 % del total de los ácidos grasos (Monson, 2004). Este grupo de compuestos sufren dos importantes transformaciones en el rumen las cuales son la lipólisis y la hidrogenación. La lipólisis es la liberación por hidrólisis de los ácidos grasos esterificados que se da en dietas ricas en almidón los cuales contienen, triglicéridos, glicolípidos y fosfolípidos. La hidrogenación consiste en la reducción de los enlaces dobles existentes en los ácidos grasos liberados, que se relaciona negativamente con la proporción de concentrado en la dieta y se intensifica con la abundancia de forraje (Sauvant y Van-Milgen, 1995; Kucuk *et al.*, 2001;). Por lo que el glicerol es rápidamente fermentado en ácido propiónico y la lactosa en ácido acético (Hobson y Mann, 1961).

2.3.2.1. Catabolismo de los lípidos

La obtención de energía de los lípidos se da por medio de la oxidación de los ácidos grasos obtenidos de los triglicéridos por hidrólisis mediante la acción de la lipasa para que se incorporen al ciclo de Krebs (Kucuk *et al.*, 2001). Mientras más largo sea el ácido graso mayor será la cantidad de energía se obtiene de su oxidación (Marín *et al.*, 2010). Algunas grasas se encapsulan en forma de pequeñas gotas de aceite, lo que les confiere protección contra los microorganismos del rumen, siendo los ácidos grasos insaturados que posteriormente se liberan en el intestino delgado los que están disponibles para la digestión (Palmquist, 1996). Un descenso en la digestibilidad de las grasas podría ser causa de la limitada capacidad de producción de la bilis, que es dependiente exclusivamente de las sales biliares y de la lisolectina para la absorción de los lípidos (Marín *et al.*, 2010).

2.3.3. Digestión de los carbohidratos en el rumen

Los carbohidratos (CHOs) son los principales constituyentes la materia seca (MS) del forraje aportando energía tanto para los microorganismos y como para los rumiantes (Bach y Calsamiglia, 2006), los cuales se clasifican de acuerdo a su contenido celular, como de almacenamiento y estructurales (Mataix, 2015). Los CHOs son fermentados en el retículo-rumen hasta glucosa, la cual es utilizada para el metabolismo propio de los microorganismos ruminales. La glucosa pasa a piruvato, durante la glucólisis y por distintas vías metabólicas, es transformado en acetato, propionato o butirato que son los desechos del metabolismo anaeróbico de los microorganismos. Dichos metabolitos son precursores para la síntesis de grasas. Otra parte es transformado en metano (CH_4), que no aportan energía siendo los AGV los únicos utilizados como energía para el animal (Yescas *et al.*, 2004). El dióxido de carbono (CO_2) es producto final del metabolismo aeróbico el cual no es aprovechado y es eliminado mediante el eructo (Mendoza *et al.*, 2008). La formación del acetato, se da mediante la síntesis de acetil-coenzima A (acetil-CoA) a partir del piruvato con pérdida posterior de un carbono y descoplamiento de la acetil-CoA para generar el acetato, en el proceso equivalente del butirato se utilizan 2 moléculas de Acetil-CoA, ambos procesos proveen ATP a los microorganismos y el metabolismo energéticos de los animales (Ochoa y Noguera, 2014).

2.3.3.1. Degradación de la celulosa

Los microorganismos pueden degradar la celulosa en glucosa, utilizando dos complejos enzimáticos que incluyen en primer término al complejo de multiprotéico de celulasas extracelulares, las moléculas de celobiosa generadas, son hidrolizadas las enzimas celobiosas para dar moléculas de glucosa (Ochoa y Noguera, 2014). Este proceso hidrolítico es realizado por diversas especies de bacterias, protozoarios y hongos, cuyas vías metabólicas actúan de manera concertada ya que el producto final del metabolismo de un grupo constituye el

sustrato de otro grupo (Mc Allister *et al.*, 1993). Por otra parte los AGV no son utilizados por los microorganismos quedando disponibles para los rumiantes como energía principal, además de la formación de ácido fórmico, isobutírico y valérico esenciales para la síntesis de lípidos de cadena larga (Contreras y Noro, 2010). La concentración de los AGV depende de la dieta y es más alta cuando está basada en el forraje (Calsamiglia, 1997). En alimento fibroso el patrón de fermentación predominante genera ácido acético, que va en relación directa la producción de metano, esto implica que si produce menos metano se tiende a producir más propionato, por la aportación de almidón concentrado hasta un 45%, provocando un efecto negativo en la salud de las vacas (Yescas *et al.*, 2004).

Gráfica 1. Porcentaje de AGV con forraje y concentrado
(Wattiaux, 2000).

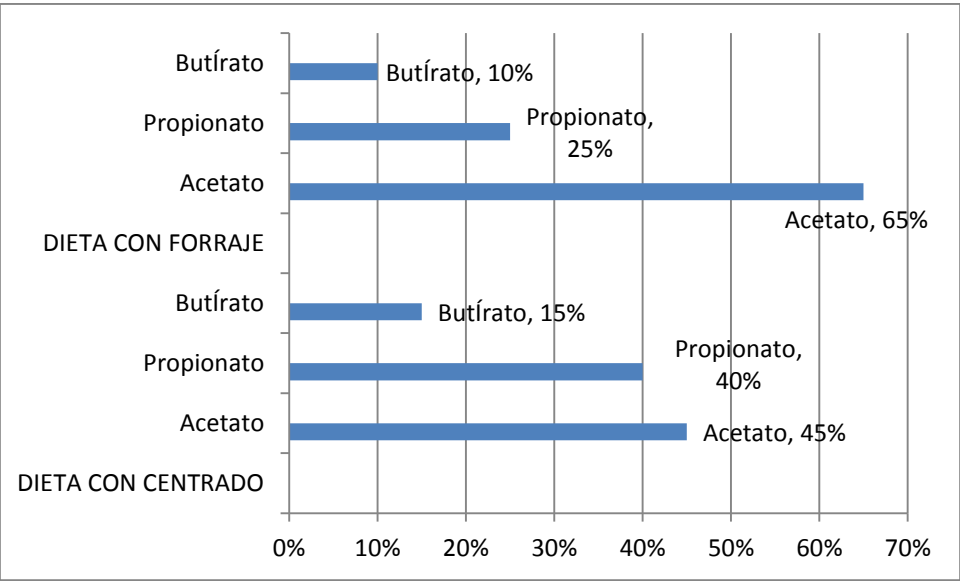


Tabla 2. Clasificación de los carbohidratos adaptado por (Van Soest, 1982).

Carbohidratos	Composición
No fibrosos	

Azúcares solubles	Mono y disacáridos
Carbohidratos de reserva	
Almidón	Polímeros de glucosa unidos a en la se alfa 1-4 y alfa 1-6
Fructosanos	Polímero de fructosa
Ievanos	Enlace B2-6 forrajes verde y granos de cereal
Inulinas	Enlace B 2-1 en los tubérculos
Pectinas	Ácidos galacturónicos arabinosa galactosa
Ácidos orgánicos	Productos de la fermentación de otros carbohidratos (ensilados)
Fibrosos	
Celulosa	Polímero de glucosa por enlace B 1-4
Hemicelulosa	Xilanos, glucosa, arabinosa, manosa, galactosa, ácido galacturonico.
Lignina	Polímero fenólicos generados por distintos tipos de enlaces.

2.4. ESQUILMOS AGRÍCOLAS

2.4.1 Esquilmo agrícola

Los esquilmos agrícolas son definidos como el material vegetal que permanece en el campo después de la cosecha es utilizado como alimento para los rumiantes, pese a que posee poco valor alimenticio, baja digestibilidad, debido a su estado de lignificación y la gran cantidad de fibra que contiene (Bidlack y Buxton, 1992). La fibra de los esquilmos solo puede ser degradada por los microorganismos que se alojan en el rumen (Pinos *et al.*, 2002). La fibra que forma parte de los rastrojos es un agregado de componentes que no se constituye

como una entidad propia, componiéndose de un tramado tridimensional de hemicelulosa, celulosa y lignina en el que se le asocian minerales y demás componentes (SAGARPA, 1990). Los esquilmos se consideran de lenta digestión debido a la disponibilidad de la fibra que es reducida por su alto contenido de lignina (Van Soest, 1964). La lignina es un compuesto que da soporte estructural a las paredes celulares de las plantas, considerado un polímero amorfo, constituido de derivados de fenil propano, que se encuentra en los rastrojos, plantas leñosas, raíces, tallos y hojas (Tuomela *et al.*, 2000). El contenido de lignina de la pared celular aumenta conforme la planta madura, dando protección a la celulosa y hemicelulosa, es estructuralmente heterogénea, que resisten la degradación química o enzimática (Bidlack y Buxton, 1992;).

La celulosa es el biopolímero más abundante en el reino vegetal, siendo el mayor componente de las paredes estructurales y fuente potencial de azúcares dicho polímero está constituido por 3500 unidades de glucosa con el enlace B-1,4 que forman cadenas que al agruparse constituyen microfibrillas (Cullen y Kersten, 1992). La celulosa es insoluble en agua y resistente a la acción enzimática propia de los rumiantes; sin embargo, puede hidrolizarse un 43 % mediante la acción de ácidos fuertes. En el rumen se hidrolizan por la acción enzimática de bacterias, hongos y protozoarios cuales producen mediante endo-b-glucanasas y glucanohidrolasas que rompen los enlaces b-glucosídicos para el aprovechamiento de los carbohidratos (Van Soest, 1964). Las hemicelulosas se localizan en las paredes formando parte de la forma amorfa considerándose como una mezcla compleja y heterogénea de un gran número de polímeros de monosacáridos, que incluyen glucosa, xilosa, manosa, arabinosa y galactosa (Pérez *et al.*, 2002). La hemicelulosa es menos resistente a la degradación química por poseer grupos polares en sus azúcares son fácilmente solubles en agua (Howard *et al.*, 2004)

2.4.2 Factores que limitan el uso de residuos de cosecha

El uso de los residuos de rastrojo está limitado por su bajo contenido de nitrógeno y alto contenido de fibra lo que origina una baja digestibilidad debido a los niveles de lignina que conforman una estructura de protección de la célula vegetal junto con la hemicelulosa, y celulosa (Bidlack y Buxton, 1992). La dureza del rastrojo está dada por el grosor de la pared secundaria, que abarca hasta 76 % de su volumen total (Jiménez *et al.*, 1980). Es por esto que se debe de mejorar la calidad nutricional del rastrojo mediante diversos tratamientos que permiten una mejor asimilación por parte de los microorganismos del rumen.

2.4.3. Método físico en el tratamiento del rastrojo

Consiste en tratar mecánicamente los residuos de cosecha mediante acción mecánica picado y moliendo. Estos tratamientos no mejoran la digestibilidad pero el consumo voluntario si se incrementa, el cual está regulado por la rapidez de degradación y por el tamaño de partícula para pasar el retículo-omasal (Castañeda y Monroy., 1984). Otro método físico, que a diferencia de los anteriores si incrementa considerablemente la digestión de los forrajes es el tratamiento con vapor caliente, el cual promueve la de lignificación y la liberación de los ácidos orgánicos derivados de los grupos acetil de la estructura de la lignocelulosa (Fuentes et al., 2001).

2.4.4. Métodos químicos en el tratamiento del rastrojo

Consiste en tratar los forrajes fibrosos con sustancias alcalinas como amoníaco (NH_3), hidróxido de sodio (NaOH) y urea, que permiten incrementar el consumo, la digestibilidad y productividad del animal (Asmud y Lars, 1983). Los tratamientos por humedecimiento con soluciones básicas o ácidas, combinadas con el molido y

el picado, provocan la ruptura de las paredes celulares por medio de la solubilización de la hemicelulosa que se rompe de forma intermolecular (Klopfenstein *et al.*, 1972). En este proceso la hidrólisis de los ésteres de ácidos urónicos y acéticos realizan una pre-digestión, por lo que se aprovecha de un modo más eficiente y estando disponible a los microorganismos del rumen, se mejora la producción animal (Garriz y López, 2002). La urea puede ser utilizada como una fuente de amoníaco incrementando la disponibilidad de la fracción de fibra de rastrojo de maíz y mejorando la digestibilidad, así como el consumo del rastrojo (Jayasura y Pereira, 1982). La urea es degradada por la acción de la ureasa, que es de origen bacteriano asociada a la fase líquida salivar que se asocia a la pared ruminal en la producción de amoníaco (Klopfenstein *et al.*, 1972). La urea actúa en las paredes celulares, facilitando el acceso de bacterias a los polisacáridos e incrementando el contenido de nitrógeno para el metabolismo propio de las bacterias ruminales (Fernández, 2014). Al igual que el hidróxido de sodio se asocia a la solubilización parcial de la hemicelulosa y lignina (Martínez *et al.*, 2012). El álcali rompe los enlaces de hidrógeno de la celulosa, mediante la hidratación alcalina que contribuye a mejorar la digestión entre el 5 y 10 % incrementando así el consumo voluntario del rastrojo (Brown y Montezinos, 1976).

2.4.5. Método biológico con hongos en el tratamiento del rastrojo

De acuerdo con el tipo de polímeros que degradan principalmente de la pared celular vegetal, los hongos saprófitos pudren la materia orgánica (MO) (Díaz, 2011). Estos se clasifican en hongos de pudrición blanca aquellos que degradan principalmente la lignina, hongos de pudrición y café, que degradan principalmente a la lignina y los hongos de pudrición blanda, los cuales descomponen residuos vegetales en condiciones de saturación de humedad (Benítez *et al.*, 1998). El nombre de color (blanca y café) dado a los dos primeros grupos se debe a la coloración que adquiere el sustrato cuando los hongos actúan sobre este. Los géneros de hongos que han sido más estudiados en relación a su mecanismo de degradación de material vegetal son los basidiomicetos de los géneros *Pleorut*, *Trametes* y *Phanerochaete* (Hatakka and Hammel, 2010).

Estos hongos mineralizan la lignina basados en la producción de radicales libre por acción de enzimas extracelulares (Ortega *et al.*, 2005), como lacasa, lignina peroxidasa (LiP) y manganeso peroxidasa (MnP), con capacidades de despolimerizar a través del mecanismo de transferencia de electrones del sustrato al oxígeno que es reducido a agua y proporcionando una dieta alta en carbono propicia para los rumiantes (Gao, 2011).

2.5. MICROORGANISMO BIOTECNOLÓGICOS (HONGOS) DEGRADADORES DE SUSTRATOS

2.5.1. Hongos como agente degradadores de esquilmos agrícolas

Los hongos lignolíticos son de fundamental importancia en los procesos para la biodegradación de los residuos vegetales los cuales poseen la capacidad de degradar los complejos de lignocelulosa (Elisashvili *et al.*, 2008), que degradan la lignina mediante la producción de radicales libres generados por las enzimas extracelulares, lignin peroxidasa, manganeso peroxidasa, y lacasas, (Pointing, 2001). La utilización de los hongos de podrición blanca productores de enzimas lignolíticas, mejora la degradación de compuestos fibrosos (Morales, 2006). El tratamiento del rastrojo con estos hongos permiten mejorar su digestibilidad *in-vitro* principalmente con la utilización de especies como *Trametes versicolor*, *Bjerkandera adusta*, *Fomes fomentarius* y *Pleurotus ostreatus*, los cuales tienen un alto potencial para su utilización en el procesamiento de forrajes (Dávila y Vásquez, 2006).

Aunque los estudios sobre la capacidad de especies de hongos para degradar lignina se han centrado particularmente en especies de Basidiomycetes de pudrición blanca, también se ha reportado la actividad lignolítica en especies del grupo de los Ascomycetes. Trabajos recientes muestran que ascomicetes como

Aspergillus (teleomorfo=*Emericella*) spp, *Trichoderma* spp (teleomorfo=*Hipocrea*) y *Fusarium* (teleomorfo=*Gibbrella*) spp, son capaces de descomponer el material lignocelulósico de plantas (Lundell et al., 2010). Entre las especies de hongos Ascomycetes en los que recientemente se ha reportado la actividad de enzimas lignolíticas, se encuentran algunas del género *Paraconiothyrium* (Forootanfar et al., 2011).

2.6. ENZIMAS LIGNOLITICAS EN HONGOS

2.6.1. Enzima lacasa

La enzima lacasa (benzenediol oxygen oxoreductase. EC 1. 10.3.2) es una oxidasa que contienen cobre y cataliza la reducción del oxígeno molecular a agua (Thurston, 1994). Considerado el componente más importante del complejo enzimático de los hongos degradadores de madera, es capaz de catalizar la oxidación de una amplia variedad de compuestos orgánicos especialmente aromáticos (Arana et al., 2002). La enzima lacasa involucrada en el ataque a la lignina es extracelular, aunque los hongos presentan una isoenzima intracelular relacionada con la morfogénesis y la síntesis de pigmentos entre otros procesos celulares (Arora y Sharma, 2010). El mecanismo catalítico de la lacasa comienza con la unión del sustrato en una pequeña cavidad en el sitio activo cargada negativamente, en el que son oxidados en el sitio mononuclear y los electrones son transferidos al sitio trinuclear, donde el oxígeno molecular se reduce a agua (Quintana et al., 2007).

2.6.2. Enzima lignin peroxidasa (LiP)

La enzima lignin peroxidasa (LiP diarilpropano peroxidasa. EC 1. 11.1 .14) requiere de peróxido de hidrogeno H_2O_2 para su actividad, la cual cataliza la

oxidación de Mn^{+2} a Mn^{+3} (Arana y Telles, 2002). La LiP es capaz de oxidar compuestos aromáticos no fenólicos y dímeros de lignina (Guillén *et al.*, 2005). La enzima es oxidada por H_2O_2 para generar un intermediario deficiente, de un par de electrones, conocido como componente (I), que puede ser oxidado por Mn^{2+} o por sustratos fenólicos, generando el componente (II). En hongos ligninolíticos esta enzima se ha descrito exclusivamente en basidiomicetos de pudrición blanca (Hofrichter, 2002).

2.6.3 Enzima manganeso peroxidasa (MNP)

La enzima manganeso peroxidasa (MnP. EC 1. 11.1. 13), es una hemo proteína que presenta un potencial de oxidación suficiente para absorber electrones de estructuras fenólicas (Márquez *et al.*, 2007). La enzima es oxidada por peróxido de hidrógeno (H_2O_2) para generar un intermediario deficiente de un par de electrones (Bumpus y Aust, 1987). Esta enzima juega un papel importante en la degradación de la lignina y un amplio rango de compuestos orgánicos tóxicos a metabolitos no tóxicos por estos hongos ligninolíticos en las que sus enzimas son reguladas por carbonos e hidrógenos (Castillo, 2010).

2.7. METODOS PARA EVALUAR LA DIGESTIBILIDAD EN LOS RUMIANTES

2.7.1. Técnica de digestibilidad *in-vivo*

El contenido de energía digerible se determina mediante ensayos de balances nutritivos *in-vivos*, e incluye la medición de la ingestión de una determinada ración mediante la colecta total de las excreciones fecales de los rumiantes (Posada *et al.*, 2012). Estos ensayos miden más exactamente la digestibilidad aun que

representan un sesgo respecto a la digestibilidad real debido al material endógeno que se elimina a través de las heces (Lachmann y Febres, 1999). Para realizar los ensayos es necesario habituar al animal a la ración que se quiere estudiar durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la adaptación, para este método se utilizan jaulas de digestibilidad individuales de madera o metálicas que tienen como objetivo limitar los movimientos del animal con un piso ranurado para evitar el exceso de humedad (Colombatto, 2000). Se puede también realizar la recolección de heces mediante la ayuda de sacos atados al animal llamadas bolsas colectoras conteniendo en su interior bolsas de polietileno (Travieso *et al.*, 1999). Las muestras del alimento ofrecido, al igual que las del rechazo como base de la determinación de la digestibilidad es representada por coeficiente de digestibilidad expresado en forma porcentual, (Coeficiente de digestibilidad (%) = $[(NI - NH) / NI] \times 100$), (Rosero y Posadas, 2009). Este método representa la pérdida de metano por medio del eructo, producto de la fermentación ruminal de los carbohidratos, (Ortega *et al.*, 2005). El periodo de recolección de heces debe durar de 3 a 14 días, mientras más largo sea el periodo más exactos serán los resultados obtenidos (Colombatto, 2000). Se considera además la necesidad de obtener datos más precisos realizados de tres repeticiones como mínimo, (García *et al.*, 2009).

2.7.2. Pruebas de digestibilidad *in vitro*

La técnica *in-vitro* ha sido la más utilizada para ensayos de digestibilidad y en ésta se incluye la técnicas de solubilidad en liquido ruminal-pepsina la cual es conocida como el método de Tiller y Terry que fue patentada en 1963, (Giraldo *et al.*, 2006). Esta técnica se basa en una fase fermentativa con microorganismos contenidos en el líquido ruminal de animales canulados y luego en fase enzimática con pepsina en medio ácido añadiendo ácido clorhídrico (HCL) (Rosero y Posadas, 2009). La técnica es confiable, segura y precisa para un amplio rango de forrajes, sin embargo su aplicación tiene la desventaja de necesitar animales canulados en el rumen para proveer de líquido ruminal (Posada *et al.*, 2012). El método de Tiller y Terry, precursor del método de fermentación *in vitro*, fue modificada por Goering

y Van Soest usando el quipo Daisys Ankom Technology que permite la incubación simultánea de hasta 100 muestras distribuidas en cuatro jarras que permiten mantener el calor uniforme de 39 °C y la agitación constante durante el proceso de incubación (De-Figuerido *et al.*, 2000). Con este método el material que desaparece de las bolsas durante la incubación es considerado digerible, en el proceso se incluyen soluciones compuestas por minerales, fuentes de nitrógeno y agentes reductores que ayudan ala anaerobiosis necesaria en el proceso de digestibilidad (Giraldo *et al.*, 2006).

2.7.3. Pruebas de digestibilidad *in situ*

Constituye un procedimiento alternativo, dentro de los que se realiza, bajo condiciones *in vivo* el método de las bolsas de nylon o *in situ*, en el que la muestra es fermentada en el rumen del animal fistulados, (Olivera, 2001). Teniendo como objeto determinar el valor de digestibilidad de las muestras a estudiar o para determinar la tasa de degradación de los forrajes y de sus componentes nutritivos en el rumen (Villalobos, *et al.*, 2002). Para este proceso se requiere de una bolsa lo suficiente mente grande en relación a las muestras que asegure la entrada del líquido ruminal y le permita mezclarse con las muestras al mismo tiempo debe de ser lo suficientemente pequeña, para que pueda ser retirada sin dificultad a través de la cánula, presentándose una pérdida pasiva del 1 % de la muestra a través de la bolsa (Burgosa *et al.*, 2012). Otro punto importante es el tiempo de fermentación, en el que se, indica que para los concentrados se requiere de 12 a 36 h, forrajes de alta calidad de 24-48 h, y forrajes de menor calidad 48-72 h (Olivera, 2001). Este método es útil cuando se desea estudiar el efecto de la suplantación sobre la degradabilidad de la fibra en forrajes (Cano, 2006). También se emplea para evaluar materiales que poseen sustancias anticoagulantes que afectan la degradabilidad de los forrajes. Este método se trabaja con un sistema cerrado sin flujo o recambio de los residuos liberados entre los que podrían encontrarse esas sustancias que llevan a la estimación de la digestibilidad (Madero, 2000).

2.7.4. Producción de gas

La técnica de producción de gas es un método *in vitro* que permite determinar la cinética de digestión del alimento mediante el volumen de gas producido durante el proceso fermentativo (Bocanegra y Rochinotti, 2012). La fermentación se mide a través de la producción de gases, principalmente metano dióxido de carbono e hidrogeno (Carmona *et al.*, 2005). El fundamento de la producción de gas es proporcional a la masa microbiana, donde la mayor cantidad del gas producido deriva fundamentalmente de los carbohidratos (Reyes *et al.*, 2012). La muestra a estudiar se coloca en pequeños frascos de 100 ml con varias repeticiones, simulando las condiciones de rumen, a 39 °C asegurándose un medio de anaerobiosis por el cual se gasifica con CO₂ (McAllister *et al.*, 1996). En estas incubaciones se puede registrar la cantidad de gas producido a diferentes tiempos. Cada botella se conecta, a través de una válvula de triple entrada, al traductor y a una jeringa de plástico graduada de 5 o 10 ml de capacidad (Menke y Steingass, 1988) Las lecturas de gas acumulado se realizan con un transistor de presión que mide la presión originada por los gases acumulados en la parte superior de los frascos de fermentación (Posada *et al.*, 2012).

2.8. FIBRAS DETERGENTES

2.8.1. La fibra detergente neutra (FDN)

Es el material insoluble en una solución detergente neutra que representa la sustancia menos digerible de los forrajes que incluye celulosa, hemicelulosa y lignina, los cuales se digieren lentamente, (Rubio *et al.*, 2004). La fibra detergente neutro es solo parcialmente digerible por cualquier especie, pero en mayor grado por los rumiantes los cuales dependen de la digestión microbiana para aprovechar la mayoría de los componentes fibrosos (Van Soest, 2015). El detergente

solubiliza las proteínas mediante el sulfito sódico que se añade a eliminar la materia nitrogenada al romper los enlaces disulfuro (Crespo, 2007). El ácido etilendiamintetracético (EDTA) es empleado como quelante del calcio así como para eliminar las pectinas a la temperatura de ebullición. El trietilenglicol ayuda a eliminar parte de la materia no fibrosa de los alimentos concentrados y la amilasa termo estable para eliminar el almidón (Maya *et al.*, 2006). La amilasa ayuda a mejorar la precisión de la determinación y sobre todo facilita la filtración (Treviño y Arosemena, 2011).

2.8.2. Fibra detergente acida (FDA)

Es el material insoluble en una solución detergente ácida constituida por la celulosa y lignina pero se presentan además otros componentes como nitrógeno y minerales (Méndez *et al.*, 1985). Este procedimiento utiliza un detergente catiónico en una solución de ácido sulfúrico (H_2SO_4) que disuelve o remueve los carbohidratos lábiles, habiendo una limitación en la acción de la solución detergente ácido cuando la muestra posee un contenido de lípidos superior al 5 % (v/v) (Ochoa *et al.*, 2008). Este procedimiento permite hidrolizar casi toda la hemicelulosa que dando la porción cristalina de la celulosa, lignina, residuos insolubles denominados como fibra detergente acida (Rubio *et al.*, 2004). Su medición tiene como objetivo predecir la digestibilidad o el valor energético de los forrajes (Romero, 2011). Además de que es importante que la determinación de FDA se realice sobre el residuo de FDN, en forma secuencial de lo contrario los valores de FDA pueden estar sobre estimados debido a la presencia de residuos de pectinas u otros compuestos que son solubilizados en la FDN pero no en la FDA (Treviño y Arosemena, 2011). Este método puede ser usado al igual como un paso preparatorio para la determinación de lignina, nitrógeno insoluble en detergente ácido (NIDA), cenizas insolubles en detergente ácido (CIDA), celulosa y sílice (Maya *et al.*, 2006).

2.8.3. Ácidos grasos volátiles (AGV)

Los AGV son la principal fuente de energía para los rumiantes constituyen el producto final del metabolismo de los carbohidratos en el rumen, y su importancia radica en que proveen cerca de 70 % de la energía metabolizable requerida para los bovinos (Calsamiglia, 1997). Siendo de importancia el ácido acético, propiónico y butírico además de otros en menor grado de importancia tales como el láctico, succínico, etanol, (Haro y Haro 2007). Los cuales se obtienen a partir de la glucosa o fructosa que se liberan de los carbohidratos (Allen *et al.*, 1967), fermentados por las bacterias siguiendo las vías catabólicas de la glucólisis, los cuales son absorbidos y metabolizados principalmente por el epitelio estratificado queratinizado que cubre las papilas de la mucosa ruminal (Macy *et al.*, 1978). La reacción predominante en la producción del ácido acético y del butírico son reacciones fosfoclasticas en las que el ácido pirúvico es convertido en acetato de acetilo, ácido fórmico, hidrógeno y dióxido de carbono habiendo desprendimiento de hidrógenos por el proceso oxidativo que son utilizados de distinta manera según la bacteria que realice la fermentación (Baldiwin *et al.*, 1969). De igual manera, el ácido propiónico se produce a partir del ácido pirúvico o del láctico, siguiendo dos vías, llevándose a cabo en la vía principal la formación de oxaloacetato y succinato mientras que en la segunda se requiere la formación de acrilato que se presenta en animales donde la ración alimenticia es deficiente en azufre en parte por el cambio en la población microbiana debido a la base de granos (Calsamiglia, 1997). El gas producido durante la fermentación *in vitro* representa la suma del producido por la descarboxilación oxidativa del piruvato (CO_2 y CH_4), o gas directo, y el producido por la reacción entre el tampón y los AGV para mantener el pH del medio, o gas indirecto (Van-Soest, 2015). Cambios en el patrón de fermentación que incrementen la proporción de ácido butírico y acético y disminuya la proporción de propiónico, pueden resultar en un incremento en el volumen de gas (Lynd *et al.*, 2002). Contrariamente cambios en la estequiometria de las reacciones que aumenten la proporción de propiónico a expensas del butírico y acético, que resultarían en menos producción de gas a partir de la fermentación (Allen *et al.*, 1967). Por esto la proporción molar de AGV

debe ser tomada en cuenta cuando se realizan comparaciones entre perfiles de producción de gas provenientes de diferentes sustratos (Barrera *et al.*, 2009).

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. Preparación de la cepa de *Paraconiothyrium brasiliense*

Se utilizó la cepa CMU-196 del hongo *P. brasiliense* perteneciente al Cepario Michoacano Universitario del Laboratorio de Biotecnología y Conservación de Microorganismos de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, el cual fue aislado y caracterizado previamente. El hongo se cultivó para su crecimiento y proliferación en cajas de Petri con medio sólido de agar dextrosa de papa (PDA), por un periodo de 7 días a 24 °C. Posteriormente se inoculó en medio líquido caldo dextrosa papa (PDB) incubándose a 24 °C y 250 rpm durante 15 días.

3.2 Inoculación del rastrojo

El rastrojo de maíz blanco, libre de grano y mazorcas, se deshidrató con luz solar a temperatura ambiente y se molió un tamaño de partícula menor de 1 cm de largo. Se colocaron 500 g de rastrojo sin esterilizar en bolsas plásticas herméticas, vertiéndose en las misma 100 ml de caldo de cultivo con la cepa CMU-196, posteriormente se adicionaron 1400 ml de agua destilada, sellando herméticamente para su posterior almacenamiento a un área a temperatura ambiente en ausencia de luz por un periodo de 10 y 12 semanas, tiempo establecido para que el hongo puede tener un mayor efecto sobre la degradación de la pared del sustrato tratado. Finalizando este proceso, las muestras de

rastrojo se colocaron en charolas perforadas para someterlas a deshidratación, en un horno a una temperatura de 65 °C durante 24 h.

3.3 Tratamientos y producción de gas *in vitro*

Los tratamientos fueron los siguientes: rastrojo control (RC), que consistió en una muestra del rastrojo molido que no fue inoculado con el hongo y se mantuvo almacenado en seco a temperatura ambiente. El siguiente grupo fue el de rastrojo 10 semanas (R10), el cual fue un rastrojo inoculado e incubado con el hongo por un periodo de 10 semanas. El último tratamiento fue el rastrojo 12 semanas (R12), que se expuso incubo con el hongo por un periodo de 12 semanas. Una vez deshidratados los tratamientos, éstos se sometieron a un análisis bromatológico proximal (AOAC, 1995).

Para el cultivo ruminal, se realizó la técnica de producción de gas *in vitro* descrita por Theodorou *et al.* (1994). Los animales donadores (*Bos Taurus*) de líquido ruminal fueron 2 novillos de aproximadamente 350 kg de peso. Los animales se tranquilizaron antes de la extracción de líquido ruminal con 0.2 mg/kg de clorhidrato de xilacina. El método de colecta fue por sondeo orogástrico con una sonda a traumática, con un diámetro de 0.5 conectada a una bomba de vacío. El líquido se filtró con un poro de 1mm, y se almacenó a 39 °C en condiciones de anaerobiosis. El cultivo ruminal se llevó a cabo en frascos de vidrio con capacidad de 125 ml, los cuales contenían 0.99 g de materia seca de rastrojo, 90 ml de un medio de cultivo (Solución saliva artificial) y 10 ml de líquido ruminal, sellando herméticamente los frascos con un tapón de goma a presión. Para la estimación de la producción de biogás (PG), se utilizó un manómetro digital desmontable (Lutton PS, Germany) con un transductor acoplado a una aguja. Se midió la presión de gas (PSI) cada hora, durante los primeros 8 muestreos, posteriormente, las mediciones se realizaron a intervalos de 4 h, hasta completar las 120 h de cultivo. Finalmente, los datos de producción de gas se convirtieron

en cm³ analizándose la producción de gas acumulada por cada gramo de materia seca según el tratamiento.

3.4 Digestibilidad in vitro de la materia seca

Toda vez que concluyó el proceso de producción de gas, se realizó el análisis de digestibilidad *in vitro* de la materia seca (DIVMS), a partir de los residuos fibrosos presentes en los frascos de cultivo. El contenido de cada frasco se sometió a filtrado en embudos que contenían filtros con poro No. 54 (Whatman, Reino Unido). Posteriormente se enjuagaron con agua destilada, y se bañaron con acetona para eliminar los residuos lipídicos. Sometiéndose a un proceso de deshidratación en una estufa de aire forzado a 65 °C durante 24 h. El % de DIVMS se obtuvo por la diferencia de peso entre la muestra inicial de forraje y el peso del residuo.

3.5 Análisis estadístico

Para el análisis de PG, se realizó una comparación múltiple de medias con mínima significancia estadística, en el caso de la DIVMS se realizó una prueba de comparación de proporciones. En ambos casos se utilizó el programa, Statgraphics Centurión XVI (2012)

4. RESULTADOS

En el análisis bromatológico no se encontraron cambios importantes entre el rastrojo control y los rastrojos expuestos al hongo, en cuanto a las proporciones de proteína cruda. Sin embargo, si se encontró una ligera reducción en la fibra cruda y un aumento en el extracto libre de nitrógeno (Cuadro 1).

Cuadro 1. Análisis bromatológico en rastrojos de maíz expuestos al hongo *Paraconiothyrium brasiliense* (cepa CUMU-196) durante 0 (CONTROL), 10 (R10) y 12 (R12) semanas.

Analito	TRATAMIENTOS		
	CONTROL	R10	R12
Extracto etéreo (%)	1.39	0.95	1.27
Fibra cruda (%)	16.33	14.86	13.66
Proteína cruda (%)	2.67	2.76	2.93
Cenizas (minerales) (%)	9.62	10.39	10.39
E. L. N. (%)	69.99	71.04	71.75

En cuanto a la DIVMS, se encontró que la exposición al hongo *P. brasiliense*, no mejoró dicha variable, aun cuando, de acuerdo al análisis bromatológico se disminuyó la fibra cruda y se aumentó el extracto libre de nitrógeno.

De manera general, se pudo apreciar que el rastrojo expuesto al hongo durante 10 semanas, tuvo un mejor comportamiento como forraje, respecto al de 12 semanas, el cual mostró una digestibilidad significativamente menor, respecto al rastrojo control ($P < 0.05$).

Cuadro 2. Producción acumulada de gas y digestibilidad *in vitro* de la materia seca, en rastrojos de maíz expuestos al hongo *P. brasiliense* (cepa CUMU-196) durante 0 (CONTROL), 10 (R10) y 12 (R12) semanas.

	TRATAMIENTOS		
	Control	R10	R12
Producción de Gas in vitro (cm3)	266.66	247.99	219.55
Valor P		0.2021	0.0139
Digestibilidad in vitro de la Materia Seca (%)	84.23	71.74	67.40
Valor P		0.0595	0.0265

5. DISCUSIÓN

La composición química del rastrojo de maíz durante el tiempo de incubación con el hongo, incrementó ligeramente el porcentaje de proteína y ELN mientras que la FC, mostró una reducción, las diferencias observadas no fueron significativas.

Estudios previos realizados por Soto (1988), mostraron que la incubación de rastrojo con cepa de *Pleurotus ostreatus*, incrementó el porcentaje de proteína cruda, y disminuyó el porcentaje de fibra y extracto libre de nitrógeno después de 25 y 60 d de incubación, respecto al grupo control. Un efecto similar, se observó cuando se utilizó el hongo *P. pulminaris*.

Arias (2005). En su investigación de la biotransformación de residuos lignocelulósicos del residuo cañero con el hongo *Pleurotus ostreatus-pulmonaris* encontró un aumento significativo en el porcentaje proteína cruda que fue de (2.75 %) sin tratamiento a (5.56 %) con el hongo, disminuyendo de manera proporcional la fibra cruda de (37.95 %) a (31.58 %). También encontró un mayor valor en la

solubilidad del residuo, mostrando un mejoramiento de la digestibilidad relacionada con la remoción de la lignina incrementando la disponibilidad de la celulosa.

En ambos casos, los valores de digestibilidad reportados por Soto (1988) y Arias (2005), fueron superiores a los reportados en el presente trabajo. Entre los factores que pueden explicar estas diferencias se encuentran el hecho de que en los trabajos previos el rastrojo fue esterilizado proceso por el cual la lignina sufre reacciones de re-condensación y es relocalizada sobre la superficie de las fibras de celulosa, que resulta en una mayor área expuesta a la adhesión de los microorganismos (Basurto *et al.*, 2012). Otro factor que puede explicar los resultados de este trabajo son las cepas de hongos utilizadas en los trabajos previos, los cuales perteneciente al grupo de los *Basidiomycetes* considerados los más eficientes en degradar totalmente la lignina y esencial para su transformación logrando su mineralización (Davila y Vazquez, 2006). No obstante, la eficiente producción de lacasa por parte de la cepa de estudio (Arredondo-Santoyo *et al.*, datos no publicados) hacía suponer que podían obtener resultados más óptimos.

La PG resultó superior en el rastrojo control respecto a la observada en los rastrojos expuestos al hongo *P. brasiliense*, aunque en el R10, fue similar, en el R12, disminuyó significativamente ($P < 0.05$) (Cuadro 2), Algunos estudios previamente realizados con la misma cepa (Arredondo-Santoyo *et al.*, 2015) muestran que la fibra del rastrojo de maíz experimenta cambios estructurales en la fibra un incremento de la lignificación del rastrojo tratado de la 4 semana hasta el final del tratamiento 12 semanas. Dichos autores al someter los rastrojos a producción de gas *in vitro*, encontraron que aquellos que tenían entre 2, 4, 6 y 8 semanas de tratamiento, mostraron una mayor producción de gas que el rastrojo control (0 semanas). En otro estudio, realizado por Gamble *et al.* (1994), se encontró que al tratar pasto bermuda con el hongos *C. subvermispora*, también ascomicete como *P. brasiliense* se obtuvo una mayor producción de gas *in vitro* que el pasto control.

Soto, (1998), en sus dos tratamientos con las cepas de hongo a los 25 y 60 d presento la degradación de la materia seca (MS), del rastrojo original en 55.35 % y 54.61 %, 75.5% y 71 % obteniendo un aumento en la producción de gas y por consiguiente el aumento de la digestión. El estudio de Peña (2013) sobre la composición química y degradabilidad *in situ* de residuos agrícolas de maíz inoculados con dos cepas de hongos del genero *Pleurotus*, de mostró efectos positivos sobre la digestibilidad de los sustratos lignocelulosicos sometidos al efecto degradativo del hongo de 16.96 y 43.11 % de la MS de las 0 a las 72 h debiéndose al menor contenido de fibra del rastrojo. Estos trabajos indican claramente que la capacidad de incrementar la digestibilidad depende de la especie de hongos empleado. Por lo anterior, estudios futuros sería importante emplear cepas de hongos basidiomicetes depositadas en el Cepario Michoacano Universitario y contrastar los resultados con los obtenidos en el presente trabajo. De la misma manera, Fuentes *et al.* (2001) mencionan que la digestibilidad del rastrojo de maíz se encuentra entre los valores de 64.67 % sin tratamiento para posicionarse entre 71.94 % con tratamiento con amoníaco. Sin embargo, los trabajos antes mencionados contemplaron la esterilización de los forrajes sustrato antes de la inoculación de los microorganismos, proceso no realizado en la presente investigación, dado que ésta práctica contemplaría un mayor costo de mano de obra y procesamiento, en el caso de que estas metodologías de tratamiento de forrajes se pudieran aplicar.

7. CONCLUSIÓN

La producción de gas y digestibilidad *in vitro* de rastrojos de maíz expuestos al hongo *brasiliense* durante 10 y 12 semanas, no superaron a las del rastrojo control. En el rastrojo de 12 semanas se encontró que la digestibilidad y producción de gas se redujeron significativamente.

8. BIBLIOGRAFIA

- Abner, A., Rodríguez, C. P.H. D. 2008. Ruminantia. Microbiología ruminal [en línea] www.uprm.edu/ciag/inpe/ruminantia/ruminantia3-1-2008.pdf [consulta: 5 octubre 2015]
- Allen, S. H. G., Kellermeyer, R. W., Sto-Jernholm, R. L., Wood, F. G. 1967. Purification and properties of enzymes involved in the propionic acid fermentation. *Journal of Bacteriology*. 87: 171-178.
- Arana, A., Téllez, A., González, T., González, A. 2002. Aspectos generales de la biodegradación de la madera: aplicaciones industriales de las lacasas. *Bio-Tecnología*. 7(3): 40-55.
- Araujo, F. O. 2002. Recientes avances en nutrición de rumiantes. [en línea]: http://www.avpa.ula.ve/congresos/cd_xi_congreso/pdf/avancesnutricion.PDF [consulta: 4 septiembre 2015].
- Arias, C. G. M. O., García, G. B., Betancourt, D. 2005. Biotransformación de Residuos Lignocelulósicos con Hongos *Pleurotus*. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*. 36: 1-7
- Arora, D. S., Sharma, R. K. 2010. Ligninolytic fungal laccases and their biotechnological applications. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 160(6): 1760-1788.
- Asmud, E., Lars, V. M. 1983. De rastrojo de maíz. [en línea]: - www.mag.go.cr/rev_meso/v12n02_189.pdf. [consulta: 3 septiembre 2015].
- Bach, A., Calsamiglia, S. 2006. La fibra en los rumiantes química o física [en línea]: http://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/manejo_del_alimento/100-fibra_en_rumiantes.pdf [consulta: 8 septiembre 2015].
- Baldwin, R. L., Wood, W. A., Emery, R. S. 1969. Conversion of lactate C14 to propionate by the rumen microflora. *Journal Bacteriology*. 83(4): 907-913.

- Barrera, P., Villareal, X. S., Molano, L. C., Ortiz, C., Hernández, H. E. 2009. Estudio preliminar de la bioproducción de metano a partir de los residuos del proceso de beneficio del fique. *Revista Ion*. 22: 53-61.
- Basurto, G. R., Escamilla, M. A., Moya, V. S., Ramírez, R. E., Becerra, B. J. 2012. Composición química, digestibilidad y cinética ruminal de la digestión de residuos agrícolas tratados con explosión de vapor. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*. 3(4): 407-424.
- Benítez, C. F. A., Huerta, P. G., Sanchez, V. J. E. 1998. Producción de 18 cepas de *Pleurotus djamor* del Soconusco, Chiapas. [en línea]: http://www.dgip.unach.mx/images/pdf-revista-quehacercientifico/quehacercientifico-1998-agosto/produccion_de_%2018_cepas_de_pleurotus.pdf. [consulta: 15 octubre 2015].
- Bidlack, J. E., Buxton, D. R. 1992. Content and deposition rates of cellulose, hemicellulose, and lignin during regrowth of forage grasses and legumes. *Canadian Journal of Plant Science*. 72(3): 809-818.
- Blanco, M. R. 1999. Fisiología digestiva y manejo del alimento. Bacterias, ruminales. [en línea]: <Http://www.producción.animal.com.ar/información.tecnica/manejodelalimento/69-bacteriasruminales>. [consulta: 9 septiembre 2015].
- Bocanegra, D., Rochinotti, D. 2012. Estimación de la digestibilidad *in vitro* mediante la técnica propuesta por Theodorou et al., (1994). *Revista de Investigaciones Agropecuarias*. 38(2): 150-152.
- Brown, R. M., Montezinos, D. (1976). Cellulose microfibrils: visualization of biosynthetic and orienting complexes in association with the plasma membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 73: 143-147.
- Bruni, M. D. L. A. y Chilibróste, P. 2001. Artículo Invitado: Simulación de la digestión ruminal por el método de la producción de gas. *Producción Animal*. 9:43-51.

- Bumpus, J. A., Aust, S. D. 1987. Biodegradation of environmental pollutants by the manganese peroxidase by *Phanerochaete Chrysosporium*: involvement of the degrading system. *BioEssays*. 6(4): 166-170.
- Burgosa, A. J. A., Rivas, C. M. R., Capetillo, C. M., Leala, C. A. S. C. 2012. Evaluación del método de lavado de bolsas (manual vs lavadora) en la técnica de degradación ruminal *in situ*. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*. 41 (3): 337-342.
- Calsamiglia, S. 1997. Nuevas bases para la utilización de la fibra en dietas de rumiantes. [en línea]: http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_agronomia/Uso_de_Fibra_en_Rumiantes.pdf . [consulta:15 noviembre 2015].
- Cano, J. G. 2006. Aprovechamiento intestinal de la proteína de los alimentos en rumiantes. [en línea]: http://www.produccionbovina.com/informacion_tecnica/manejo_del_alimento/101-aprovechamiento_proteina.pdf . [consulta: 7 noviembre 2015].
- Carmona, J. C., Bolívar, D. M., Giraldo, L. A. 2005. El gas metano en la producción ganadera y alternativas para medir sus emisiones y aminorar su impacto a nivel ambiental y productivo. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. 18: 49-63.
- Castañeda, F. E. A., Monroy, V. J. 1984. Aprovechamiento de esquilmos y subproductos [en línea]: www.sagarpa.gob.mx/.../Aprovechamiento%20de%20esquilmos . [consulta: 12 septiembre 2015].
- Castillo, A. G. M. 2010. Aislamiento de hongos lignocelulíticos a partir de residuos agroindustriales. [en línea]: cdigital.uv.mx/bitstream/123456789/34007/1/antonioevueltabetsy . [consulta: 15 octubre 2015].
- Colombatto, D. 2000. Análisis de alimentos: Aplicaciones prácticas. [en línea]: <http://por.agro.uba.ar/sites/default/files/catedras/resumencolombatto.pdf> . [consulta: 15 octubre 2015].

- Contreras, P. A.; Noro, N. 2010. Morfología trastornos y modulaciones de la actividad fermentativa. [en línea]: http://www.consorciolechero.cl/chile/documentos/publicaciones/rumen_web [consulta:12 septiembre 2015].
- Crespo, R. J., Castaño, J. A., Capurro, J. A. 2007. Secado de Forraje con el horno microondas: efecto sobre el análisis de calidad. Agricultura Técnica. 67(2): 210-218.
- Cronje, P.B. 2000. Digestion, Metabolism, Growth and Reproduction. [en línea]: <https://anatomiyplastinacion.wikispaces.com/file/view/Ruminant%20physiology....pdf/445906684/Ruminant%20physiology....pdf>. [consulta: 13 octubre 2015].
- Cros, P., Benchaar, C., Bayourhe, C., Vernay, M., Moncoulon R. 1991. *In-situ* evaluation of the ruminal and intestinal degradability of extruded whole lupin seed nitrogen, Reproduction Nutrition Development. EDP Sciences 31(5):575-583.
- Crous, P. W., Summerell, B. A., Taylor, J. E.; Bullock, S. 2000. Fungi occurring on Proteaceae in Australia: selected foliicolous species. Australasian Plant Pathology. 29(4): 267-278.
- Cullen, D., Kersten, P. 1992. Fungal enzymes for lignocellulose degradation.[en línea]: <http://originwww.fpl.fs.fed.us/documnts/pdf1992/culle92a.pdf>. [consulta: 5 septiembre 2015].
- Dávila, G., Vázquez, D. R. 2006. Enzimas ligninolíticas fúngicas para fines ambientales. [en línea]: https://www.researchgate.net/profile/Gustavo_Davila-Vazquez/publication/259781277_ENZIMAS_LIGNINOLITICAS_FNGICAS_PARA_FINES_AMBIENTALES/links/0f31752dd6945ab733000000.pdf. [consulta: 9 diciembre 2015].
- De Figueiredo, M., Mbhele, A., Zondi, J. 2000. An evaluation of the Daisy II-220 technique for determining *in vitro* digestibility of animal feeds in comparison

- with the Minson & McLeod technique. South African Journal of Animal Science. 30(4): 45-46.
- Díaz, J. C. Q. 2011. Revisión: Degradación de plaguicidas mediante hongos de la pudrición blanca de la madera. Revista de la Facultad Nacional Agraria de Medellín. 64: 5867-5882.
- Díaz, R. A., Laurencio, S. M., Pérez, Q. M. 2008. Factores que influyen en el desarrollo ruminal de terneros de 0 a 6 meses de edad. [en línea]: <http://monografias.umcc.cu/monos/2008/Agronomia/m081.pdf>. [consulta: 8 septiembre].
- Elisashvili, V., Kachlishvili, E., Penninckx, M. 2008. Effect of growth substrate, method of fermentation, and nitrogen source on lignocellulose-degrading enzymes production by white-rot *Basidiomycetes*. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 35(11): 1531-1538.
- Estrada, J. A., Gaviria, J. M., García, F. G. 1993. Hongos anaeróbicos del rumen. Archivos Latinoamericanos de Producción Animal. 1(2): 111-128.
- Fernández, M. A. 2014. Transformación de subproductos y residuos de agroindustria de cultivos templados, subtropicales y tropicales en carne y leche bovina. [en línea]: http://www.produccion-animal.com.ar/tablas_composicion_alimentos/120-Transformacion_de_subproductos.pdf. [consulta: 8 octubre 2015].
- Fondevila, M. 1998. Procesos implicados en la digestión microbiana de los forrajes de baja calidad. Revista de la Facultad de Agronomía. 15: 87-106.
- Forootanfar, H., Faramarzi, M. A., Shahverdi, A. R., Yazdi, M. T. 2011. Purification and biochemical characterization of extracellular laccase from the Ascomycete *Paraconiotyrium variabile*. Bioresource Technology. 102(2): 1808-1814.
- Fuentes, J., Magaña, C., Suárez, L., Peña, R., Rodríguez, S., de la Rosa, B. O. 2001. Análisis químico y digestibilidad *in-vitro* de rastrojo de maíz (*Zea mays* L.). Agronomía Mesoamericana. 12(2): 189-192.

- Gamble, G. R., Sethuraman, A., Akin, D. E., Eriksson, K. E. 1994. Biodegradation of lignocellulose in Bermuda grass by White rot fungi analyzed by solid state ^{13}C nuclear magnetic resonance. *Applied and Environmental Microbiology*. 60(9): 3138-3114.
- Gao, H., Wang, Y., Zhang, W., Wang, W., Mu, Z. 2013. Isolation, identification and application in lignin degradation of an ascomycete GHJ-4. *African Journal of Biotechnology*. 10(20): 4166-4174.
- García M. D., García B. P., Gatica B. F., Gatica E. Ma. A., Gornall C. V. 2009. Digestibilidad por el método del indicador en rumiantes. [en línea]: [file:///C:/Users/sony/Downloads/Digestibilidad por el Metodo del Indicador en Rumiantes.pdf](file:///C:/Users/sony/Downloads/Digestibilidad%20por%20el%20Metodo%20del%20Indicador%20en%20Rumiantes.pdf). [consulta: 5 noviembre 2015].
- Garriz, M., López, L. 2002. Suplementación con nitrógeno no proteico en rumiantes. [en línea]: http://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/suplementacion_proteica_y_con_nitrogeno_no_proteico/07-suplementacion_con_nitrogeno.pdf. [consulta: 8 octubre 2015].
- Gasque, G. R. 2008. Enciclopedia Bovina - FMVZ-UNAM. [en línea] www.fmvz.unam.mx/fmvz/e_bovina/Indice.pdf. [consultado: 5 de septiembre 2015].
- Giraldo, L. A., Gutiérrez, L. A., Sánchez, J., Bolívar, P. A. 2006. Relación entre presión y volumen para el montaje de la técnica *in vitro* de producción de gas en Colombia. *Investigaciones Ganaderas para el Desarrollo Rural*. 18(6): 46-50.
- Guillén, F., Martínez, M. J., Gutiérrez, A., Del Rio, J. C. 2005. Biodegradation of lignocellulose: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *International Microbiology*. 8: 195-204.
- Haro, J. M., Haro, I. M. 2007. Nutrición Proteica de Bovinos Productores de Carne en Pastoreo. *Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal (REDALYC)*. 17(2): 45-54.

- Herrera, M. L., WingChing, J. R., Rojas, B. A. 2008. Características fermentativas y nutricionales del ensilaje de rastrojo de piña (*Ananas comosus*). *Agronomía Costarricense*. 33: 1-15.
- Hobson, P. N., Mann, S. O. J. 1961. The isolation of glycerol-fermenting and lipolytic bacteria from the rumen of the sheep. *Journal of General Microbiology*. 25(2): 227-240.
- Hofrichter, M. 2002. Lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). *Enzyme and Microbial Technology*. 30(4): 454-466.
- Howard, R. I., Abotsi, E., Van Rensburg, E. J., Howard, S. 2004. Lignocellulose: issues of bioconversion and enzyme production. *African Journal of Biotechnology*. 2 (12): 602-619.
- Jayasuriya, M. C. N., Perera, H. G. D. 1982. Urea-ammonia treatment of rice straw to improve its nutritive value for ruminants. [en línea]: <file:///C:/Users/sony/Downloads/UMB%20treatment%20of%20rice%20straw.pdf>. [consulta: 3 octubre 2015].
- Jiménez, A., San Martín, H., Huamán, U., Ara, G., Arbaiza, F., Huamán, C. 2010. Efectos del tamaño de partícula y tipo de amonificación-conservación sobre la digestibilidad y consumo del rastrojo de maíz en ovinos. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*. 21: 19-25.
- Juárez, L. F. I. 2002. Evaluación nutricional de gramíneas forrajeras tropicales para bovinos. [en línea]: <http://tiesmexico.cals.cornell.edu/courses/shortcourse1/minisite/pdf/3/Evaluaci%C2%A2n%20Nutricional%20de%20Leguminosas%20Tropicales.pdf>. [consulta 4 de junio 2015].
- Klopfestein, T. G., Krause, V., Jonnes, M. G., Woods, W. 1972. Chemical treatment of low quality roughages. *Journal of Animal Science*. 35(2): 418-422.
- Kucuk, O., Hess, B. W., Ludden, A., Rule, D. C. 2001. Effect of forage concentrate ratio on ruminal digestion and duodenal flow of fatty acids in ewes. *Journal of Animal Science* 79(8): 2233-2240.

- Lachmann, M., Febres, O. A. 1999. La estimación de la digestibilidad en ensayos con rumiantes. [en línea]: <http://www.avpa.ula.ve/docuPDFs/xcongreso/Digestibilidadderumiantes.pdf>. [consulta: 7 noviembre 2015].
- Lewis, G. E., Hunt, C. W., Sánchez, W. K., Treacher, R., Pritchard, G. T., Feng, P. 1996. Effect of direct-fed fibrolytic enzymes on the digestive characteristics of a forage-based diet fed to beef steers. *Journal of Animal Science*. 74(12): 3020-3028.
- Lynd, L. R., Weimer, P. J., Van-Zyl, W. H., Pretorius, I. S. 2002. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 66(3): 506-577.
- Macedo, R., Galina, M., Zorrilla, J., Palma, J., Guerrero, J. P. 2001. Impacto económico de la introducción de tecnología en un sistema de producción agropecuario tradicional. *Revista de la Facultad de Agronomía*. 18(2): 149-162.
- Macy, J. M., Ljungdahl, L. G., Gottschalk, G. 1978. Pathway of succinate and propionate formation in *Bacteroides fragilis*. *Journal of Bacteriology*. 134: 84-91.
- Madero, G. S. 2000. Degradabilidad ruminal de la hierba en praderas aprovechadas bajo pastoreo rotacional, en la zona costera de Cantabria. *Investigación agraria. Producción y Sanidad Animal*. 15(3): 125-136.
- Marín, A. L. M., Hernández, M. P., Alba, L. P., Castro, G. G. 2010. Digestión de los lípidos en los rumiantes. *Sitio Argentino de Producción Animal*. 35(4): 240-246.
- Márquez, A. A. T., Mendoza, M. G. D.; González, M. S. S.; Buntinx, D. S. E.; Corral, O. L. 2007. Actividad fibrolítica de enzimas producidas por *Trametes spp.* EUM1, *Pleurotus ostreatus* IE8 y *Aspergillus niger* AD96.4 en fermentación sólida. *Interciencia*. 32(11): 780-785.
- Márquez, A. E., Torres, R., Arana, A., Téllez, A., Viniegra, G. G., Loera, O. 2005. Condiciones de producción de lacasas termoestables de *Trametes*. [en

línea]. http://www.smbb.com.mx/congresos%20smbb/merida05/TRABAJOS/AREA_VII/CVII-01.pdf [consulta: Junio 22 2015].

Martínez, M. A. L. 2007. Influencia de la nutrición sobre el contenido y tipo de ácidos grasos en la carne de los rumiantes. Archivos de. Zootecnia. 56: 45-66.

Martínez, T. G., Ortega, C. M., Landois, P. L. L., Pineda Osnaya, A., Pérez, P. J. 2012. Rendimiento productivo y las variables ruminales de corderos alimentados con rastrojo de maíz tratado con urea. Revista mexicana de ciencias agrícolas. 3(6): 1157-1170.

Mataix, V. J. 2015. Hidratos de carbon. [en línea]: http://www.uco.es/master_nutricion/nb/Mataix%20educadores/hidratos%20de%20carbono.pdf. [consulta: 27 eptiembre 2015].

Maya, G. E., Durán, C. V., Ararat, J. E. 2006. Valor nutritivo del pasto estrella solo y en asociación con leucaena a diferentes edades de corte durante el año. Acta Agronómica. 54(4): 41-46.

McAllister, T. A., Cheng, K. J., Okine, E. K., Mathison, G. W. 1996. Dietary, environmental and microbiological aspects of methane production in ruminants. Canadian Journal of Animal Science. 76(2): 231-243.

Mendoza, M. G. D., Plata, P. F. X., Espinosa, C. R., Lara, B. A. 2008. Manejo nutricional para mejorar la eficiencia de utilización de la energía en bovinos. Universidad y ciencia. 24:75-87.

Monson, F. D. 2004. Suplementación con lípidos en bovinos de carne: metabolismo, efectos sobre la calidad de la canal, de la carne y sobre la salud humana.[en línea]: <http://incainchi.es/pdf/metabolismo.pdf>. [consulta: 22 octubre 2015].

Morales, V. R. A. 2006. Medios de cultivo liquidos para el desarrollo de inoculos de hongos de pudricion blanca aplicables en biopulpaje kraft. [en línea]: http://repositorio.uchile.cl/tesis/uchile/2006/morales_r/sources/morales_r.pdf. [consulta:13 octubre 2015].

- Muñoz, F. 2011 Producción, valor nutricional y aprovechamiento del rastrojo de maíces nativos en la región de Libres-Serdán, Puebla, México. (Tesis de maestría). Colegio de Posgrados Instituto de Enseñanza e Investigaciones en ciencia Agrícola. Puebla, Puebla, Mexico.
- Ochoa, O. E. G., Infante, R. B., Rivera, C. J. 2008. Hacia una definición de fibra alimentaria. *Anales Venezolanos de Nutrición*. 21: 25-30.
- Ochoa, S. P., Noguera, R. 2014. Metanogénesis ruminal y estrategias para su mitigación. *Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*. 9(2): 307-323.
- Olivera, R. M. P. 2001. Estimación del valor nutritivo de los alimentos para rumiantes con énfasis en las técnicas *in sacco* y de producción de gas *in vitro*. *Producción Animal*. 13: 45-51.
- Ortega, M. G. A. C., Bueno, G. G., Betancourt, D.R., Álvarez, I., González, A. L. 2005. Biotransformación de Residuos Lignocelulósicos con Hongos *Pleurotus*. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*. 36: 2-8.
- Palmquist, D. L. 1996. Utilización de lípidos en dietas de rumiantes. [en línea]: https://www.researchgate.net/profile/Don_Palmquist/publication/28180431_Utilizacin_de_lpidos_en_dietas_de_rumiantes/links/0c96051811d213d3b0000000.pdf. [consulta 20 septiembre 2015].
- Palmquist, D. L., Jenkins, T. C. 2003. Challenges with fats and fatty acid methods. *Journal of Animal Science*. 81(12): 3250-3254.
- Pandey, A., Selvakumar, P., Soccol, C. R., Nigam, P. 1999. Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. *Current Science*. 77: 149-162.
- Peña, G. M. M. 2013. Composición química y degradabilidad *in situ* de residuos agrícolas de maíz inoculados con dos cepas del género *Pleurotus*. (Tesis de licenciatura). Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Facultad de Ciencias de la Ingeniería. Quevedo, Los ríos, Ecuador.
- Pereira, A. C. J. R. 2008. Formulación con Precisión: Mejorando la Eficiencia de Utilización de Nitrógeno. [en línea]

<http://66.147.240.184/~ganader1/articulos/?seccion=ver&categoria=manejo&nda=man063> [consulta: 4 octubre 2015].

- Pérez, J., Muñoz, D. J., de la Rubia, T. D. L. R., Martínez, J. 2002. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *International Microbiology*. 5(2): 53-63.
- Pinos, R. J. M. González, S. S., Mendoza, G. D., Bárcena R., Cobos, M. A., Hernández, A., Ortega, M. E. 2002. Effect of exogenous fibrolytic enzyme on ruminal fermentation and digestibility of alfalfa and rye-grass hay fed to lambs. *Journal of Animal Science*. 80(11): 3016-3020.
- Pointing, S. 2001. Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 57(2): 20-33.
- Posada, S., Rosero, R., Rodríguez, N., Costa, A. 2012. Comparación de métodos para la determinación del valor energético de alimentos para rumiantes. *Sitio Argentino de Producción Animal*. 17(3): 3184-3192.
- Relling, A., Mattioli, G. 2003. Fisiología digestiva y metabólica de los rumiantes. [en línea]: Ciencias Veterinarias. Argentina. A Relling, G Mattioli Fac. datateca.unad.edu. [consulta: 20 octubre 2015].
- Reyes, A. S. J., Soto, M. A. C., Ornelas, E. G., Treviño, E. M. R., Negrete, J. C., & Barragán, H. B. 2012. Estimación del valor nutricional de pastos tropicales a partir de análisis convencionales. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*. 47(1): 55-67.
- Rodríguez, R., Sosa, A., Rodríguez, Y. 2007. La síntesis de proteína microbiana en el rumen y su importancia para los rumiantes. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*. 41(4): 303-311.).
- Romero, N. 2011. Métodos de análisis para la determinación de nitrógeno y constituyentes nitrogenados en alimentos.[en línea]: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/010/ah833s/AH833S08.pdf>. [consulta: 18 noviembre 2015].

- Rosero, N. R., Posada, S. L. 2009. Modelación de la cinética de degradación de alimentos para rumiantes. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. 20(2): 174-182.
- Rubio, E., Rodríguez, D., Reyes, L., Buenfil, G. 2004. Evaluación del potencial forrajero de árboles y arbustos tropicales para la alimentación de ovinos. *Técnicas Pecuarias de México*. 42(2): 129-144.
- Ruiz, E. M., Arnoldo Ruiz, A., Pezo, D. 1980. Uso de Residuos de alimentación Animal. [en línea]: <https://idl-bnc.idrc.ca/dspace/bitstream/10625/6620/1/IDL-6620.pdf> . [consulta: 28 octubre 2015].
- SAGARPA. 2009. Aprovechamiento de esquilmos y subproductos en la alimentación de ganado. [en línea] <http://www.sagarpa.gob.mx/desarrolloRural/Documents/fichasaapt/Aprovechamiento%20de%20esquilmos.pdf> . [consulta: 2 julio 2015].
- Sauvant, D., Van, M. J. 1995. Les conséquences de la dynamique de la digestion des aliments sur le métabolisme ruminal et les performances animales. *INRA Productions Animales*. 8(5): 353-367.
- Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural Pesca y Alimentación (SAGARPA) .1990. Aprovechamiento de esquilmos [en línea]: <http://www.sagarpa.gob.mx/desarrolloRural/Documents/fichasaapt/Aprovechamiento%20de%20esquilmos.pdf> . [consulta: 15 septiembre 2015].
- SIACON-SIAP. 2011. SIAP. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera [en línea]. <http://www.siap.gob.mx/> [Consulta: 24 de Febrero de 2015].
- Soto, C. V. 1998. Efecto del crecimiento de los hongos *pleurotus ostreatus* y *p. pulmonarius* sobre la composición química y digestibilidad del rastrojo de maíz. (tesis de maestría). Universidad de Guadalajara, Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias División de Ciencias Veterinarias. Zapopan, Jalisco, Mexico.
- Thurston, F. C. 1994. The structure and function of fungal laccases . *Microbiology*. 140: 19-26.

- Travieso, M. D. C., López, S., González, J. S., Valdés, C., Bochi, B. O. 1999. Digestibilidad in vitro de forrajes y concentrados efecto de la ración de los animales donantes de líquido ruminal. Archivos de Zootecnia. 48(181): 51-61.
- Treviño, J., Arosemena, G. 2011. Determinación de la fracción fibra de los forrajes. [en línea]: <file:///C:/Users/sony/Downloads/1485-5232-1-PB.pdf>. [consulta 25 noviembre 2015].
- Tuomela, M., Vikman, M., Hatakka, A., Itävaara, M. 2000. Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. Bioresource Technology. 72(2): 69-183.
- Van Soest, P. J. 1964. Development of a comprehensive system of feed analysis and its application to forages Journal of Animal Science. 26: 119-128.
- Van Soest. 2015. Evaluación de forrajes y calidad de los alimentos para rumiantes. [en línea]: <http://tiesmexico.cals.cornell.edu/courses/shortcourse2/minisite/pdf/Calidad%20de%20Alimentos%20para%20Rumiantes/articulo%20Van%20Soest.pdf>. [consulta: 10 noviembre 2015].
- Vargas, G. E., Kolver. 1997. Microbial and animal limitation to fiber digestion and utilization. The Journal of Nutrition. 127(5): 819- 823.
- Verkley, G. J., da Silva, M., Wicklow, D. T., Crous, P. W. 2004. *Paraconiothyrium*, a new genus to accommodate the mycoparasite *Coniothyrium minitans*, anamorphs of *Paraphaeosphaeria*, and four new species. Studies in Mycology. 50(2): 323-335.
- Villalobos, G.C., Gonzalez, V. E., Ortega, S. J. A. 2002. Técnica para estimar la degradación de proteína y materia orgánica en el rumen y su importancia en rumiantes en pastoreo. [en línea]: <http://www.tecnicapecuaria.org.mx/trabajos/200212175725.pdf>. [consulta: 3 noviembre 2015].
- Villegas, G.; Bolaños, A.; Olguín, P. L. 2001. Rastrojos - CIMMYT. Agricultura de Conservación. [en línea]:

[file:///C:/Users/sony/Downloads/Rastrojos%20manejo,%20uso%20y%20mercados%20en%20el%20centro%20y%20sur%20de%20Me%CC%81xico1%20\(7\).pdf](file:///C:/Users/sony/Downloads/Rastrojos%20manejo,%20uso%20y%20mercados%20en%20el%20centro%20y%20sur%20de%20Me%CC%81xico1%20(7).pdf). [consulta: 6 julio 2015]

Yescas, Y. R., Bárcena, G. R., Mendoza, M. G., González, M. S. S., Cobos, P. M. 2004. Digestibilidad in situ de dietas de rastrojo de maíz o paja de avena con enzimas fibrolíticas. *Agrociencia*. 38: 23-31.

Yokoyama, M.T., Johnson, K.A. (1993). Microbiología del rumen e intestino. En: Church DC. El rumiante: fisiología digestiva y nutrición. Editorial Acribia S.A. Zaragoza, España, 137-156