

EVALUACIÓN *IN VITRO* DEL TAMO DE ARROZ, DEGRADADO POR *PLEUROTUS OSTREATUS* PARA LA ALIMENTACIÓN EN RUMIANTES

EVALUATION *IN VITRO* OF RICE STRAW, DEGRADATED BY *PLEUROTUS OSTREATUS*, AS A RUMINANT FEED

*Tapie C. William A. y ¹ Sánchez G. Hugo¹.

¹ Zootecnista MSc. *Profesor asociado Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira Departamento de Ciencia Animal. Correo electrónico: *watapiec@unal.edu.co; hsanchezqu@unal.edu.co. Colombia.*

Recibido 21 de Octubre 2015; aceptado 30 de Marzo de 2016

RESUMEN

El tamo de arroz es un material altamente lignificado que puede ser usado alternativamente como alimento para rumiantes; sin embargo la despolimerización de los hidratos de carbono en este material celulósico se ve obstaculizada por el alto contenido de lignina, por tanto se plantea como objetivo hacer un tratamiento al tamo de arroz con *Pleurotus ostreatus* y evaluar su uso potencial en la alimentación de rumiantes, mediante la técnica de producción de gas *in vitro* y composición química; se encontró un importante efecto a los 20 días de tratamiento con el hongo sobre la calidad nutricional del tamo, reflejada en el aumento de proteína cruda (PC) hasta un 37 % más, así como en la reducción del

contenido de lignina (LDA) y fibra detergente neutra (FDN) de 54 % y 27 % respectivamente. Finalmente la modificación de estos compuestos por el hongo, se vio manifestado en un 40 % más de producción de gas frente al testigo. De esta manera el tratamiento del tamo de arroz con el hongo lignolítico, se constituye en una alternativa viable para mejorar el valor nutricional de este tipo de subproductos y poder aprovechar mejor este material, especialmente en época de escases forrajera.

*Autor a quien debe dirigirse la correspondencia. Tapie C. William A.
E-mail: watapiec@unal.edu.co

Palabras clave: *fibra, hongo, lignina, subproducto.*

ABSTRACT

Rice straw is a material highly lignified that can be used as ruminant feed alternative; however, the carbohydrates depolymerization of this cellulosic material is hindered by its high lignin content. Therefore, the objective of this study was to treat rice straw with *Pleurotus ostreatus* and evaluate its potential as a ruminant feed through the in vitro gas production and chemical composition technique. After 20 days of treatment, an important effect on the nutritional quality of the rice straw was found, there was an increase in the raw protein up to 37 %, also there was a reduction on the lignin content and on the neutral detergent fiber (NDF) of 54 and 27 %, respectively. Finally, the modification of these compounds by *P. ostreatus* was reflected by 40 % more gas production than the control. The treatment of rice straw with this ligninolytic fungi can be incorporated as a viable alternative to improve the nutritional value of these type of byproducts and take advantage of this material, especially when there is a foliage shortage.

Key Words: fiber, fungi, lignin, byproduct.

INTRODUCCIÓN

El material celulósico como la paja de arroz es una biomasa abundante (Abdel-Hamid *et al.*, 2013; FAO, 2012), puede proporcionar una fuente alternativa de alimento para ganado rumiante, debido a la capacidad de éstos para consumir y nutrirse de subproductos con alto contenido de fibra (Montañez *et al.*, 2004; FAO, 2012; Abdel-Hamid *et al.*, 2013). Sin embargo, el alto contenido de lignina y bajo contenido de proteína de estos residuos minimiza su aprovechamiento al reducir significativamente su digestibilidad (Hungate, 1988; Peláez, 2010; Akin *et al.*, 1993), ya que la despolimerización de los hidratos de carbono en este material celulósico se ve obstaculizada por el alto contenido de lignina, a causa de que esta es resistente a la degradación química y biológica por su compleja estructura química (Abdel-Hamid *et al.*, 2013).

Durante la cosecha del arroz; una de las prácticas más frecuente realizada por los agricultores es la de eliminar la paja, la cual es quemada en el campo debido a la dificultad y elevado costo de su retirada, nulo aprovechamiento (Abril *et al.*, 2009) y baja digestibilidad este último a causa de su composición nutricional con valores de 82 % de FDN (Van Soest, 2006), 90 % de materia seca (MS), 44 % de nutrientes digestibles

totales (TDN), 4.3 % de (PC), 0.2 % de calcio (Ca) y 0.08 % de fósforo (P) (Drake, 2002).

Con el propósito de mejorar las condiciones de este subproducto, se han utilizado métodos químicos, físicos y biológicos para producir la deslignificación o ruptura del complejo carbohidrato lignina y favorecer así el acceso de los microorganismos ruminales a los carbohidratos estructurales, mejorando su digestibilidad (Montañez *et al.*, 2004; Díaz, *et al.*, 2014). En los cuales los procesos biológicos han sido considerados como una alternativa a la generación de bienes y servicios debido a la forma de transformar los residuos en productos útiles (Ferreira, 2009). Dentro de este contexto los hongos lignocelulolíticos como *Pleurotus* spp, juegan un papel importante en el proceso de deslignificación formando mejores productos de interés para la alimentación animal (Barros, 2009). Este tipo de tratamiento tiene un gran potencial para mejorar la digestibilidad de la paja de arroz, pues estos hongos tienen la capacidad de disminuir los componentes de la pared celular, por medio de la producción de enzimas extracelulares como las peroxidasas y lacasas, ya que estas enzimas fúngicas pueden oxidar compuestos fenólicos como la lignina (Moreira, 2006; Pompeu, 2010; Higuchi, 2004), las cuales

han llamado la atención por sus valiosas aplicaciones biotecnológicas especialmente en el pretratamiento de la biomasa lignocelulósica (Abdel-Hamid *et al.*, 2013; Moreira, 2006; Cohen, 2002; Eggen, 2000); de este modo se puede aumentar la digestibilidad de los subproductos agrícolas fibrosos, como la paja de arroz (Peláez, 2010; Akin *et al.*, 1993), lo que permite la revalorización de los mismos, además debido a su alta disponibilidad y de ser aprovechado de la mejor manera, sería una alternativa de alimentación para el ganado

bovino, especialmente en situaciones de déficit forrajero. Por lo tanto, se plantea como objetivo realizar un tratamiento a la paja de arroz con *P. ostreatus* para degradar los componentes de la pared celular y la evaluación de la misma mediante la técnica de producción de gas *in vitro* en rumiantes.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reproducción y almacenamiento de *P. ostreatus*

Se seleccionó una cepa del hongo, *P. ostreatus* proveniente del laboratorio de insumos biológicos FUNGICOL S.A.S. Palmira Valle del Cauca. Colombia. La multiplicación del hongo se realizó en un medio de Potato Dextrose Agar (PDA), de acuerdo a la metodología propuesta por Ferreira (2009). En 1 litro de agua se adiciono 30g de extracto de malta, 3g de peptona de harina de soja y 15g de agar, se llevó al autoclave a 121 °C /15minutos, seguidamente se pasó a cajas de Petri con 10 ml del medio y se incubo por 7 días a 30 ± 2 °C. Luego para su almacenamiento y posterior uso, se inoculó 3 cajas de Petri en bolsas de polipropileno con 500g de trigo

previamente humedecido (65 ± 5 %) y esterilizado.

Cultivo de *P. ostreatus* en el tamo de arroz

El tamo, fue reducido de tamaño (3 a 4cm), humedecido (65 ± 5 %) y esterilizado (15 lb, 121 °C/1h). seguidamente se inoculó el tamo con el hongo dispuesto en el trigo, 250g en 5kg de tamo de arroz y se dejó que este colonice por un periodo de 20 días en recipientes sin presencia de oxígeno. Transcurrido este tiempo, al tamo de arroz usado como sustrato para el cultivo del hongo y al tamo control, se determinó el contenido de: MS y Cenizas (AOAC, 1990); PC (Kjeldahl, 1983); FDN y LDA (ANKOM) y producción de gas *in vitro* (Menke y Steingass, 1988).

Diseño experimental

Los tratamientos fueron: 1 Tamo de arroz tratado con *P. ostreatus*; 2 tamo control (sin tratamiento). El análisis estadístico se realizó bajo un modelo completamente al azar con 3 repeticiones.

Modelo estadístico:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + E_{ij}$$

Y_{ij} = FDN, LDA, MS, PC y cenizas

μ = Promedio

T_i = (i=1,2)

E_{ij} = Error experimental

Evaluación del grado de deslignificación

El grado de deslignificación, se estimó de acuerdo a la ecuación (1). El término lignina inicial y final se refiere a la concentración (%) antes y después del proceso de degradación del tamo de arroz por parte del hongo (Rangel, 2012).

(1) Grado de deslignificación

$$\frac{(\text{lignina inicial} - \text{lignina final}) * 100}{\text{Lignina inicial}}$$

Las características morfológicas (cualitativo) de la pared celular del tamo de arroz antes y después de ser sometido al proceso de degradación por *P. ostreatus*, se observaron

mediante la técnica de microscopía electrónica de barrido.

Equipo: Microscopio Electrónico de Barrido, Marca: FEI, Modelo: Quanta 200 – Metalizador. Esto se realizó en el Laboratorio de Microscopía Electrónica de Barrido de la Universidad Nacional de Colombia. Bogotá.

Producción de gas *in vitro* con la técnica de fermentación en Jeringas

El estudio de la cinética de degradación del tamo de arroz a través del volumen de gas producido durante el proceso fermentativo a diferentes tiempos (2, 5, 8, 12, 16, 20, 24, 48 y 72 horas), se realizó de acuerdo a la metodología de Menke y Steingass (1988). Los animales donantes del líquido ruminal fueron dos machos cebuinos con un peso promedio de 900 kg, en pastoreo con pasto estrella (*Cynodon plectostachium*), suplementados con torta de soya y sal mineralizada. Para estudiar la dinámica de producción de gas se utilizó el modelo propuesto por France *et al* (1993).

$$Y = A \left[1 - e^{(-b(t-L)) - c(\sqrt{t} - \sqrt{L})} \right]$$

Y= Volumen de gas en el tiempo (ml)

A= Volumen de gas acumulado proveniente de la fermentación del sustrato (asíntota)

b= Tasa constante de producción de gas (ml/h)

t= Tiempo de incubación (h)

c= tasa constante de producción de gases del material potencialmente degradable.

L= tiempo de retraso Lag/h

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Degradación del tamo de arroz por *P. ostreatus*.

Inicialmente se encontró que el tamo de arroz-control, tuvo un promedio de $13 \pm 0.8\%$ de lignina (tabla 1), que al ser tratado con *P. ostreatus* por un periodo de 20 días, se redujo a $6 \pm 1\%$ en promedio ($p < 0.01$), ya que este hongo tienen la capacidad de disminuir los componentes de la pared celular debido a que sintetiza enzimas fibrolíticas (Peláez, 2010).

Tabla 1. Prueba de Duncan, para la composición química del tamo de arroz tratado con *P. ostreatus* y sin tratar ($n=3$).

Componente (%)	Tamo de arroz-control	Tamo de arroz tratado
MS	92 ± 0.3^a	92 ± 0.2^a
Cenizas	13 ± 0.2^b	15 ± 0.1^a
PC	7 ± 0.5^b	11 ± 0.3^a
FDN	78 ± 0.5^a	57 ± 1.1^b
LDA	13 ± 0.8^a	6 ± 1.1^b

^{ab} valores con distinta letra en la fila difieren estadísticamente ($p < 0.01$)

La mayoría de los componentes estudiados exceptuado la MS presentaron diferencias altamente significativas ($P < 0.01$). Resultados similares son reportados al evaluar el efecto de la paja de trigo tratada con *Pleurotus florida*, encontrando que el contenido de MS en la paja tratada y sin tratar fue similar, a diferencia de los contenidos de FDN, PC, cenizas y LDA (Montañez *et al.*, 2004).

La FDN determinante en la alimentación de rumiantes, disminuyó en el tamo tratado ($p < 0.01$) equivalente a un 27 % en comparación con el control (tabla 1), por lo que el hongo pudo haber utilizado parte de estos componentes (celulosa hemicelulosa, lignina) para su crecimiento. Akinfemi y Ogunwole (2012), encontraron que el tratamiento del tamo de arroz con un hongo de este mismo género, hace que los componentes de la pared celular disminuyan, mostrando diferencias estadísticas significativas frente al control. Este efecto es una ventaja relevante, ya que la FDN está directamente relacionada con la digestibilidad de la materia seca. La cual

para ganado de leche debe encontrarse en los forrajes entre 35 – 45 % (DairyNZ, 2008).

El contenido de PC aumento del 7 % al 11 % en el tamo tratado. La biomasa de *P. ostreatus* rica en proteína presente en el tamo de arroz explica este importante hallazgo, lo que explicaría también el aumento de cenizas (Mushrooms, 2007). En estudios relacionados, se ha encontrado que al ser tratado el tamo de arroz con *Pleurotus* aumenta el contenido de PC de 4.69 a 7.69 % (Akinfemi y Ogunwole, 2012).

En términos porcentuales, el tratamiento con el hongo indicó tener una eficiencia de deslignificación del 54 % (Ecuación 2). En estudios referentes, Rangel (2012) evaluó el efecto del complejo enzimático sobre la degradación de *P. maximum* y obtuvo un grado de deslignificación del 25.5 %. Así mismo Taniguchi *et al.*, (2005) en pre tratamiento de cascarilla de arroz con *P. ostreatus*, encontraron un grado de deslignificación del 41 %.

(2)

Grado de deslignificación

$$= \frac{(13 - 6)}{13} * 100 = 54 \%$$

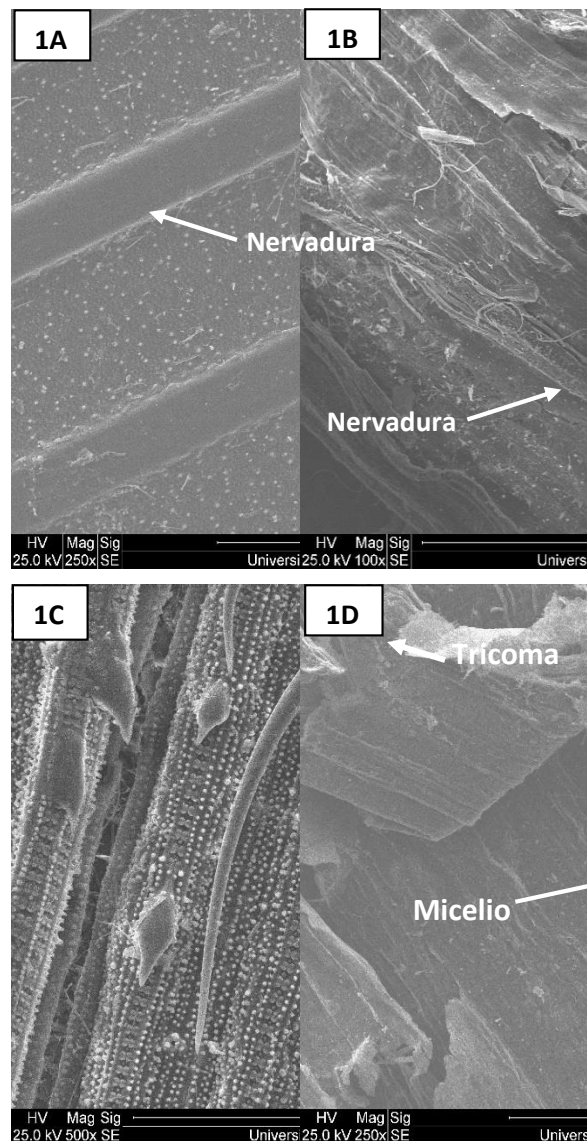


Figura 1. Microscopía electrónica de barrido, del tamo de arroz antes y después de tratamiento con *P. ostreatus*. 1A. Nervaduras de la hoja; 1B. Nervaduras de la hoja tratada 1C. Tricomas; 1D. Colonización del micelio en la hoja.

La microscopía electrónica de barrido (análisis cualitativo), muestra de forma general la biomasa modificada después de la colonización del hongo durante 20 días; en la

figura "1A" se puede apreciar las nervaduras paralelas de la hoja, quienes sufrieron una degradación por parte del hongo, y su contraste "1B"; así mismo en la figura "1C" se observan los tricomas de la superficie de la hoja cuyas características de estos es que presentan paredes celulósicas, recubiertas de cutícula, o paredes secundarias lignificadas (González y Arbo, 2013), la cual pudo ser degradada por el complejo enzimático de *P. ostreatus* al ser colonizado como se muestra en la figura "1D" y de este modo contribuir a la disminución de LDA. Por último el cambio de las características morfológicas después del tratamiento es evidente, con lo que se puede soportar el porcentaje de deslignificación tan eficiente conseguido (54%). Estudios han demostrado que la variación en la textura observados bajo microscopia electrónica de material vegetal expuesto a hongos lignolíticos, facilita la penetración microbiana ruminal al tejido lignificado y en consecuencia aumenta la digestibilidad del mismo (Karunanandaa *et al.*, 1995)

Producción de gas *in vitro*

En la dinámica de producción de gas representada bajo el modelo propuesto por France *et al.*, (1993), se encontró que todos los parámetros fueron significativos ($p < 0.05$). La producción de gas acumulado fue de 46.3 y 28.1ml, tasa de producción de gas de 0.01 y 0.043 ml/h, lag de 0.003 y 2.03 (h), para el

tamo tratado y control respectivamente (figura 2). Esto debido a que el contenido de LDA y FDN en el tamo tratado fue menor (tabla 1). Ya que la despolimerización de los hidratos de carbono en la biomasa lignocelulósica se ve obstaculizada por la lignina que es resistente a la degradación química y biológica (Abdel-Hamid *et al.*, 2013).

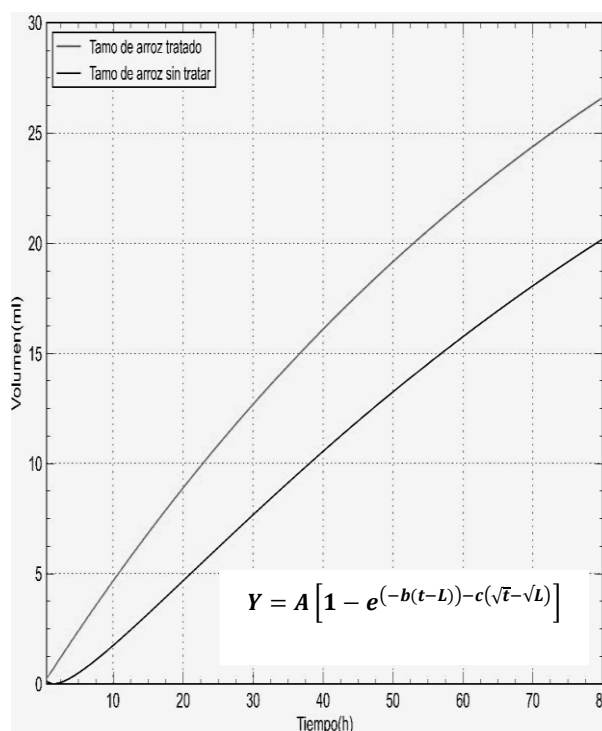


Figura 2. Cinética de producción de gas de tamo de arroz tratado con *P. ostreatus* y control.

Estudios relacionados, han demostraron que el tratamiento con las enzimas ligninolíticas de *Pleurotus* aumenta la producción neta de gas y la digestibilidad de la FDN de las pajas de los residuos agrícolas. El tratamiento con *P. ostreatus* ayuda a la disminución de LDA,

y contribuye a mejorar la producción de gas y en consecuencia la digestibilidad de este material lignificado, debido al mayor y mejor acceso a la celulosa por parte de los microorganismos ruminales (Akin *et al.*, 1993; Kaur *et al.*, 2012).

Finalmente parece ser que *P. ostreatus* tiene la capacidad de mejorar las características de la paja de arroz, incluso mejor que otros hongos de su mismo género (*Pleurotus pulmonarius*, *Pleurotus tuber-regium*), como

lo demuestran Akinfemi y Ogunwole (2012), quienes evaluaron a estos hongos en tamo de arroz y encontraron resultados similares al este estudio, como mayor producción de gas, micro minerales y PC, así como un menor contenido de FDN y LDA. Con lo cual se soporta la idea de que el tratamiento de este tipo de subproducto bajo la simplicidad de este método propuesto, es viable para ser utilizado en producción animal, especialmente en ganado rumiante.

CONCLUSIÓN

Hay un importante efecto sobre la calidad nutricional del tamo de arroz tratado con *P. ostreatus*, reflejada en el aumento de PC y producción de gas, así como en la reducción del contenido de lignina y FDN, que lo convierte en un alimento potencial para

ganado bovino. Se abren interesantes áreas de investigación relacionada con el uso de enzimas para mejorar de la calidad nutricional de este subproducto de importancia regional y nacional.

REFERENCIAS

Abdel-Hamid, A.M., Solbiati, J.O., y Cann, I.K.O. (2013). Insights into Lignin Degradation and its Potential Industrial Applications. *Advances in Applied Microbiology*, 82,1-28.

Abril, D., Navarro. E., y Abril, A. (2009). La Paja de Arroz. Consecuencias de su Manejo y Alternativas de Aprovechamiento. *Agron*, 17(2), 69 – 79.

AOAC. (1990). Official methods of analysis of the association of official analytical chemists. 15th ed. Arlington. Virginia. USA. Method. 942.05.

Akin, D.E., Sethuraman, A., Morrison, W.H., Martin, S.A., y Eriksson, K. E. (1993). Microbial delignification with White rot

fungi improves forage digestibility. *Appl Environ Microbiol*, 59, 4272 -4282.

Akinfemi, A., y Ogunwole, O. A. (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.

Barros, P.V. (2009). Evaluación de un subproducto de destilería de alcohol (vinaza) como aditivo en la alimentación de pollos de engorde (Tesis de pregrado). Universidad de Riobamba. Riobamba. Ecuador.

Cohen, R., Persky, L., y Hadar, Y. (2002). Biotechnological applications and potential of wood degrading mushrooms of the genus *Pleurotus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 58, 582–594.

Dairy N. Z, (2008). Pastures and Supplements for Grazing Animals NZSAP: Milk Production from Pasture Holmes. Occasional Publication, 14. Disponible en: http://www.dairynz.co.nz/media/253603/1_2_Principles_of_Grazing_Management.pdf. Consultado: 26/02/2016.

Diaz, C. C., Medina, A., Villamizar A., Palencia, D., Efecto de un suplemento

líquido a base de *Saccharomyces cerevisiae* y *Lactobacillus casei* para la alimentación de mojarra roja. (*Oreochromis sp*) en la etapa de alevinaje y precria, (2014). @limentech, Ciencia y Tecnología alimentaria. ISSN: 1692-7125. Vol. 12. N°1. P. 86 -92.

Drake, D.J., Nader, G., y Forero, L. (2002). Feeding Rice Straw to Cattle. University of California, 8079,1-18. Disponible en: <http://anrcatalog.ucanr.edu/pdf/8079.pdf>. Consultado: 25/02/2016.

Eggen, T. (2000). Bioremediation of recalcitrant aromatic organic pollutants with white rot fungi (Doctor theses). Jordforsk, Norway. Agricultural University of Norway.

FAO. (2012). Crop residue based densified total mixed ration. A user-friendly approach to utilise food crop by-products for ruminant production, by T.K. Walli, M.R. Garg y Harinder P.S. Makkar. FAO Animal Production and Health Paper. 172. Rome, Italy.

Ferreira, L. R. (2009). Biodegradação de vinhaça proveniente do processo industrial de cana-de açúcaror fungos (Tese doutor). Universidade de São Paulo. São Paulo. Brasil.

France, J., Dhanoa, M.S., Theodorou, M.K., Lister, S.J., Davies, D.R., y Issac, D. A.

- (1993). Model to interpret gas accumulation profiles associated with in vitro degradation of ruminant feeds. *J Theoretical Biol*, 163. 99-111.
- González, A.M., Arbo. M. (2013). Botánica Morfológica Morfología de Plantas Vasculares Universidad Nacional del Nordeste Facultad de Ciencias Agrarias Argentina. Disponible en: www.biologia.edu.ar/botanica. Consultado: 26/02/2016.
- Hungate, R.E. (1988). Introduction: The ruminant and the rumen. In: Hobson, P.N. editor. *The Rumen Microbial Ecosystem*. Elsevier Applied Science. London and New York.
- Higuchi, T. (2004). Microbial degradation of lignin: Role of lignin peroxidase, manganese peroxidase, and laccase. *Proceedings of the Japan Academy*, 80, 204-214.
- Kaur, K., Wadhwa, M., Bakshi, M.P.S., y Kapoor, S. (2012). Nutritional evaluation of *Pleurotus florida* and *Pleurotus sajor-caju* harvested spent wheat-rice straw as livestock feed. *Indian Journal of Animal Sciences*, 82(9), 1033-1037.
- Karunanandaa, K., Varga, G. A., Akin, D. E., Rigsby, L. L., y Royse, D. J. (1995). Botanical fractions of rice straw colonized by white-rot fungi: changes in chemical composition and structure. *Animal Feed Science and Technology*, 55(3), 179-199.
- Menke, K. H., y Steingass, H. (1988). Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and in vitro gas production using rumen fluid. *Animal Research and Development*, 28, 7-55.
- Montañez O. D., Ortega C. M., Cobos, P. M., Larque, A. y Garca, M. J. E. (2004). Efecto de la alimentación con paja de trigo tratada con *Pleurotus florida* en la flora ruminal de ovinos. *Rev. Cub. Cienc. Agríc*, 38, 249-257.
- Moreira, S.L. (2006). Enzimas ligninolíticas produzidas por *Psilocybecastanella* CCB444 em solo contaminado com hexaclorobenzeno (Mestrado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente). Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente. São Paulo. Brasil.
- Mushrooms, F. O. E. (2007). Fortificación de hongos comestibles (*Pleurotus ostreatus*) con calcio, selenio y vitamina C. *Vitae*, 14(1), 16-24.
- Peláez, A. A. (2010). Producción de enzimas lacasas e isoformas del género *Pleurotus* spp sobre bagazo de caña de azúcar por cultivo sólido (Tesis doctoral). Colegia de postgraduados Institución de enseñanza

e Investigación en ciencias agrícolas.
Montecillo. México.

Pompeu, G.B. (2010). Comportamento enzimático de quatro fungos lignocelulolíticos crescidos em bagaço e palha de cana de açúcar e expostos a duas concentrações de nitrogênio, visando à produção de etanol (Tese doutorado). Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, Brasil.

Rangel, S. X. (2012). Estudio del efecto de enzimas ligninolíticas y celulolíticas obtenidas del hongo *Pleurotus ostreatus*

sobre una gramínea forrajera tropical (Tesis de maestría). Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. Colombia.

Taniguchi, M., Suzuki, H., Watanabe, D., Sakai, K., Hoshino, K., y Tanaka, T. (2005). Evaluation of Pretreatment with *Pleurotus ostreatus* for Enzymatic Hydrolysis of Rice Straw. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 100(6), 637-643.

Van Soest. P.J. (2006). Rice straw, the role of silica and treatments to improve quality. *Animal Feed Science and Technology*, 130, 137–171.