

Utilização de diferentes substratos para a produção de inóculo de *Pleurotus ostreatoroseus* Sing¹

Use of different substrate for inoculum production of *Pleurotus ostreatoroseus* Sing

Eduardo Bernardi¹, Lorena Pastorini Donini², Elisandra Minotto³ e José Soares do Nascimento⁴

Resumo - Este trabalho teve por objetivo avaliar o crescimento do micélio de *Pleurotus ostreatoroseus* (linhagem POR 01/03) em diferentes substratos, buscando viabilizar a produção de inóculo (“spawn”) deste fungo. Os substratos pré-cozidos, aveia preta, aveia branca, aveia descascada, azevém, girassol, milho, soja, trigo, casca de arroz, serragem, arroz em casca e impureza de arroz foram acondicionados em tubos de ensaio (2,5 x 20 cm), sendo posteriormente autoclavados a 121°C por 30 minutos. Discos de micélio de 10 mm de diâmetro foram repicados para os tubos, os quais foram incubados a 28°C até a completa colonização. As medições de crescimento foram realizadas a cada 48 horas. Dentre os substratos avaliados a aveia preta e a serragem adicionada de 20% de farelo de soja foram os mais indicados para a produção de inóculo de *Pleurotus ostreatoroseus*.

Termos para indexação: shimeji, crescimento de micélio, substrato, spawn

Abstract - The objective of this work was to evaluate the mycelium growth of *Pleurotus ostreatoroseus* (strain POR 01/03) in different substrata, trying to make possible the output of this mushroom. The substrata of black oats, white oats, peeled oats, ryegrass, sunflower, corn, soy, wheat, peel of rice, sawdust, rice in peel and impurity of rice were cooked and conditioned in test tubes (2,5 x 20 cm), being later sterilized at 121°C for 30 minutes. Disks of mycelium with 10mm of diameter were peeled for the tubes, which were incubated at 28°C until the complete colonization. The growth measurements were accomplished every 48 hours. Among the evaluated substrata, the black oats and the sawdust added with 20% of soy crumb were the most suitable for the production of inoculum of *Pleurotus ostreatoroseus*.

Index terms: shimeji, mycelium growth, substrate, spawn

¹ Recebido para publicação em 28/11/2005; aprovado em 01/09/2006

² Biólogo, Mestrando do Curso de Pós-graduação em Agronomia-Produção Vegetal/FAEM/UFPEL, Bolsista CNPq. Dep. de Microbiologia e Parasitologia/IB/UFPEL. Cx. Postal 354, CEP 96001-970, Pelotas/RS, e-mail: bernardieduardo@yahoo.com.br

³ Bióloga, Mestranda do Curso de Pós-graduação em Agronomia-Produção Vegetal/FAEM/UFPEL, Bolsista CAPES. Dep. de Microbiologia e Parasitologia/IB/UFPEL. Cx. Postal 354, CEP 96001-970, Pelotas/RS, e-mail: lorenadonini@yahoo.com.br

⁴ Acadêmica do curso de Ciências Biológicas. Dep. de Microbiologia e Parasitologia/IB/UFPEL. Cx. Postal 354, CEP 96001-970, Pelotas/RS, e-mail: elisminotto@yahoo.com.br

⁵ Eng. Agrônomo, D.Sc., Prof. do Dep. de Microbiologia e Parasitologia/IB/UFPEL. Cx. Postal 354, CEP 96001-970, Pelotas/RS, e-mail: jose@ufpel.tche.br

Introdução

A fase de crescimento do micélio dos fungos sobre o substrato é de fundamental importância para a produção de cogumelos, para evitar riscos de contaminação, por outros fungos ou bactérias, que possam vir a comprometer a produção (Royse, 2002). A maioria dos cogumelos comestíveis apresenta bons índices de desenvolvimento miceliano em diferentes tipos de matéria-prima, sendo, portanto imprescindível a seleção do substrato onde o micélio em questão desenvolva-se rapidamente e com vigor, visando maior produtividade do cogumelo.

A interação entre substratos e fontes nutricionais diferentes pode ser mais propício ao desenvolvimento de uma linhagem do que de outras, bem como fatores externos como temperatura, luminosidade, dentre outros, exercem influências. Em vista, deve-se fazer a seleção do material disponível mais adequado a ser utilizado para produção de inóculo ou “spawn”, assim como a utilização de linhagens mais adaptadas ao clima da região, onde posteriormente se realizará a produção (Sagir & Yildiz, 2004).

A maioria dos cogumelos comestíveis necessita de condições climáticas, como temperatura oscilando entre 25 e 30°C, na fase de crescimento do micélio, sendo que variações bruscas destes valores levam a estagnação do crescimento e em alguns casos pode ocorrer a inativação do micélio, ainda, linhagens não adaptadas ao clima onde serão cultivadas não apresentarão potencial satisfatório de crescimento miceliano e produção de cogumelos (Rossi et al., 2001).

Obodai et al. (2003) citam a utilização de diferentes produtos lignocelulósicos como palha de arroz, folhas de bananeira, capim-elefante e serragem, para o cultivo de *Pleurotus ostreatus*. Hernández et al. (2003) utilizaram composto à base de capim e polpa de café no preparo do substrato para o cultivo deste cogumelo. Já Sagir & Yildiz (2004) relataram o estudo do crescimento do micélio de cinco espécies de *Pleurotus* spp. em grãos de sorgo e de trigo, e de acordo com Moda et al. (2005), uma série de resíduos da agricultura podem ser utilizados para produção do cogumelo comestível *Pleurotus* spp., dentre os quais citam-se, o bagaço de cana-de-açúcar, o sabugo de milho, as folhas de bananeira e os resíduos de algodão.

O Estado do Rio Grande do Sul é um dos maiores produtores de grãos do país, destacando-se especialmente a produção de arroz na metade sul do Estado. Com o beneficiamento dos grãos é gerada uma considerável quantidade de resíduos, como grãos sem valor comercial, pa-

lhas e casca de arroz, impurezas, todos com potencial de serem utilizados no cultivo de cogumelos. A indústria madeireira também gera quantidade expressiva de serragem, a qual em países onde a cultura do cogumelo está estabelecida, também tem sido utilizada na produção de inóculo e no cultivo dos cogumelos (Eira & Minhoni, 1997). Considerando-se a importância da obtenção de substratos que sejam mais rapidamente colonizados e que apresentem aspectos qualitativos indicadores de uma colonização mais vigorosa, este trabalho teve como objetivo avaliar o crescimento miceliano de *P. ostreatoroseus* (linhagem POR 01/03), em diferentes substratos, buscando viabilizar a produção de “spawn” deste cogumelo, bem como a agregação de valor aos subprodutos da agroindústria regional.

Material e Métodos

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Micologia do Departamento de Microbiologia e Parasitologia do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas.

Foram utilizados como substrato para produção de inóculo de *P. ostreatoroseus*: aveia preta, aveia branca, aveia descascada, azevém, girassol, milho, soja, trigo, farelo de trigo, farelo de soja (adquiridos no comércio da cidade de Pelotas, RS) casca de arroz, serragem (obtidos de um moinho de arroz e de uma serraria), arroz em casca e a impureza de arroz (doados pela Embrapa-Semente Básica, Pelotas-RS).

Os materiais foram pré-cozidos, exceto quando foi adicionada a serragem, e acrescidos de gesso agrícola (1%) (p/p). Já para os tratamentos com adição de serragem seca e peneirada receberam 20% de farelos, além do gesso agrícola (1%) e água (60%). Em seguida os materiais foram acondicionados em tubos de ensaio (2,5 x 20 cm), com volume que completasse 11 cm de altura do tubo e vedados com algodão, sendo posteriormente autoclavados a 121°C por 30 minutos.

Os tratamentos utilizados consistiram em: 1= mistura de todos os substratos em igual proporção de peso, 2=serragem + 20% de farelo de trigo, 3= serragem + 20% de farelo de soja, 4= milho, 5= arroz com casca, 6= soja, 7= aveia preta, 8= impureza de arroz, 9= trigo, 10= azevém, 11= aveia branca, 12= casca de arroz, 13= aveia descascada e 14= girassol.

A linhagem de *P. ostreatoroseus* POR 01/03 foi multiplicada em meio de cultura CDA, formulado com extrato de capim-elefante (30 g.L⁻¹), dextrose (10 g.L⁻¹) e

ágar-ágar (15 g.L^{-1}). Este meio foi esterilizado a 121°C por 15 minutos e em seguida vertido em placas de Petri esterilizadas. Discos de micélio com 10 mm de diâmetro foram repicados para o meio de cultivo acima especificado, o qual foi incubado a 26°C até o crescimento atingir as bordas da placa. Após o crescimento do micélio, discos (10 mm) da nova cultura foram repicados para os tubos contendo os tratamentos, sendo um disco para cada tubo. A incubação foi nas mesmas condições anteriores.

As avaliações consistiram em medições de crescimento ao longo do tubo (quatro retas longitudinais), a primeira ocorreu após 72 horas de incubação e as demais, sucessivamente a cada 48 horas até um dos tratamentos apresentasse completo crescimento, até o fundo do tubo, o que ocorreu após 15 dias de inoculação.

O experimento foi delineado inteiramente ao acaso e constou de um fatorial 14×6 , sendo os fatores representados pelos tratamentos e pelas leituras, com seis repetições/tratamento, onde a unidade experimental constou de um tubo. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Duncan, utilizando-se o programa estatístico SANEST (Zonta & Machado, 1984).

Resultados e Discussão

O crescimento do micélio de *Pleurotus ostreatoroseus* variou nos substratos testados (Figura 1) e a maior velocidade de crescimento ocorreu em casca de

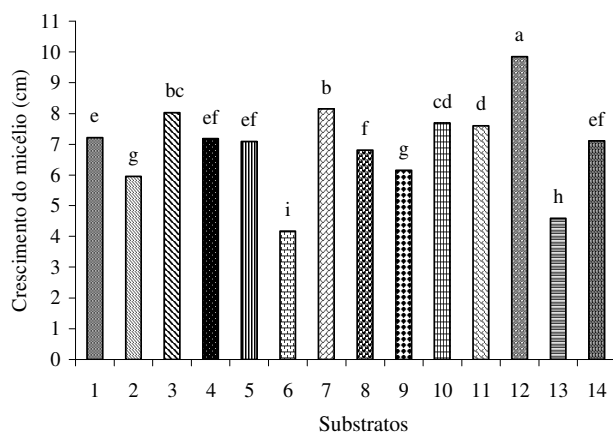


Figura 1 - Média de crescimento (cm) da linhagem POR 01/03 de *Pleurotus ostreatoroseus* em diferentes substratos, após 15 dias de incubação a 26°C , UFPel, Pelotas, 2005. (1= mistura de todos os substratos, 2=serragem + 20% de farelo de trigo, 3= serragem + 20% de farelo de soja, 4= milho, 5= arroz com casca, 6= soja, 7= aveia preta, 8= impureza de arroz, 9= trigo, 10= azevém, 11= aveia branca, 12= casca de arroz, 13= aveia descascada, 14= girassol)

arroz, seguido por serragem suplementada com 20% de farelo de soja, que não diferiu da aveia preta.

Os tratamentos compostos por grãos sem casca, apresentaram as menores velocidades de crescimento, fato que pode ser relacionado à baixa relação C/N (carbono/nitrogênio) destes substratos, onde a semente de soja apresenta 24,5% de carbono e 6,06% de nitrogênio, aproximadamente 4:1 (Eira & Minihoni, 1997) e provavelmente a supressão enzimática. Os fungos possuem capacidade de degradar materiais à base de celulose a partir da produção de enzimas lignocelulíticas, conforme evidenciado Schmidt et al. (2003a,b), para *Pleurotus* spp. ao avaliar a ação enzimática deste fungo em feno de *Brachiaria decumbens*, diminuindo o teor de hemicelulose do substrato.

A curva da velocidade de crescimento do micélio de *Pleurotus ostreatoroseus* (linhagem POR 01/03) foi ajustada a um modelo quadrático e as equações descritas juntamente com as curvas de crescimento ($\alpha=0,05$) (Figura 2).

Apesar da casca de arroz ter propiciado o maior crescimento do micélio (Figura 3) observa-se que neste tratamento *P. ostreatoroseus* apresentou um micélio com menos vigor, demonstrado pela menor densidade visual das hifas (dado não mostrado). Este fato não é desejável na produção de inóculo de cogumelos. A casca de arroz caracteriza-se por um substrato pobre nutricionalmente, com elevada porcentagem de sílica e pouco nitrogênio. Por outro lado, este substrato nem retém água para obter-se umidade em torno de 60%. Provavelmente sua utilização seja viável em menor proporção no substrato. O crescimento do micélio do fungo *P. ostreatoroseus* em grãos de trigo foi considerado não satisfatório, diferentemente dos resultados obtidos por Sagir & Yildiz (2004) em diferentes espécies de *Pleurotus* spp. desenvolvendo-se em grãos de sorgo, cevada e trigo.

Outro aspecto indesejável no crescimento do micélio foi a formação de micélio “fluffy”, observado no tratamento composto por azevém. Este tipo de micélio, segundo Eira & Minihoni (1997) pode levar a variações genéticas e/ou perdas das qualidades desejadas do cogumelo a ser produzido. De acordo com Rossi et al. (2001), a velocidade de crescimento também pode ser alterada à medida que o fungo se aprofunda no substrato, onde a suplementação e dimensão das partículas podem dificultar trocas gasosas e possivelmente implicar sobre a velocidade de formação do micélio na parte inferior do substrato, características estas não verificadas. O fato pode estar relacionado provavelmente em função do pequeno volume de substrato utilizado.

Neste trabalho foram visualizadas diferenças de crescimento do micélio fúngico em grãos produzidos por

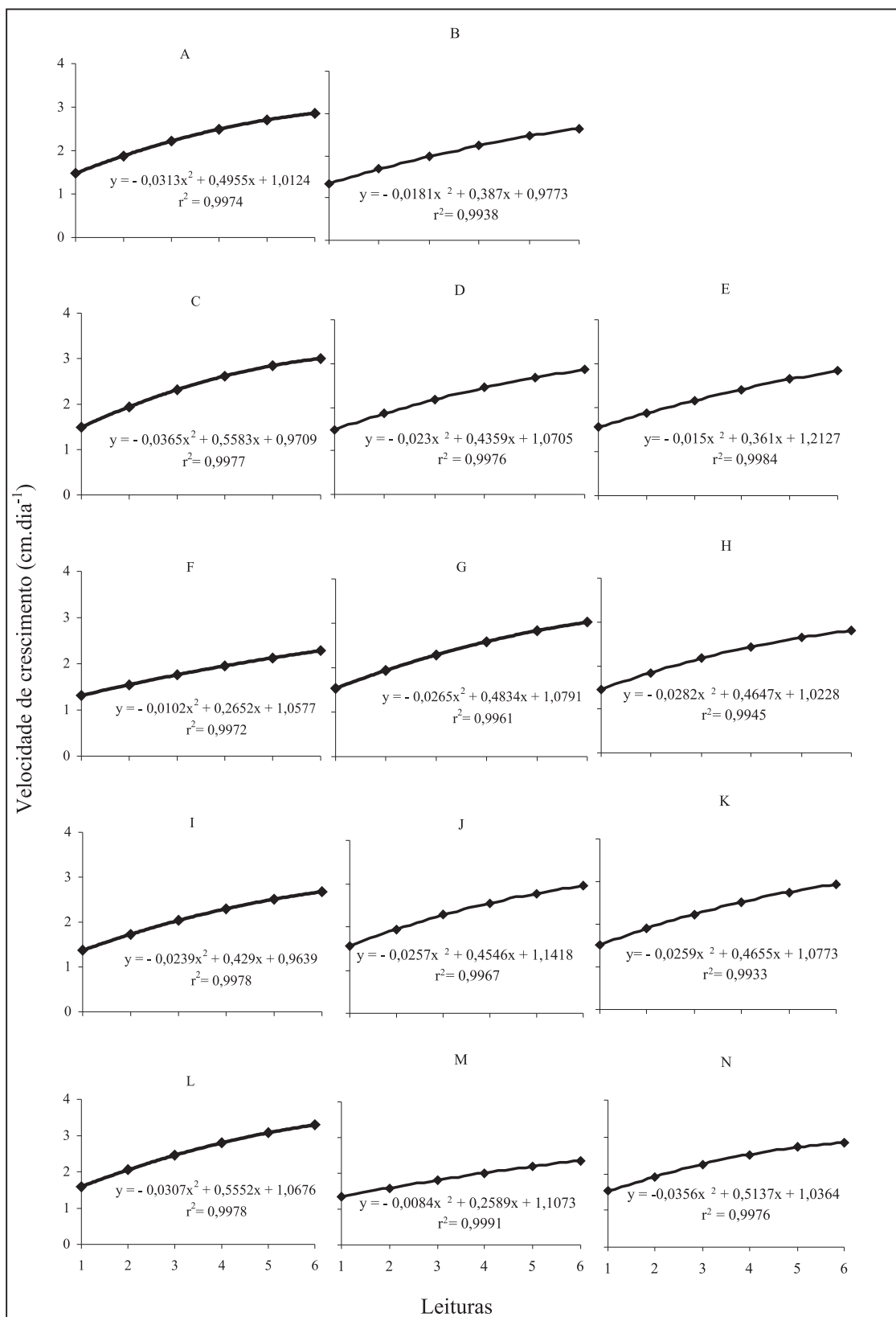


Figura 2 - Velocidade de crescimento (cm.dia⁻¹) de *Pleurotus ostreatoroseus* nos diferentes substratos: 1= mistura de todos os substratos, 2=serragem + 20% de farelo de trigo, 3= serragem + 20% de farelo de soja, 4= milho, 5= arroz com casca, 6= soja, 7= aveia preta, 8= impureza de arroz, 9= trigo, 10= azevém, 11= aveia branca, 12= casca de arroz, 13= aveia descascada e 14= girassol, Pelotas, 2005

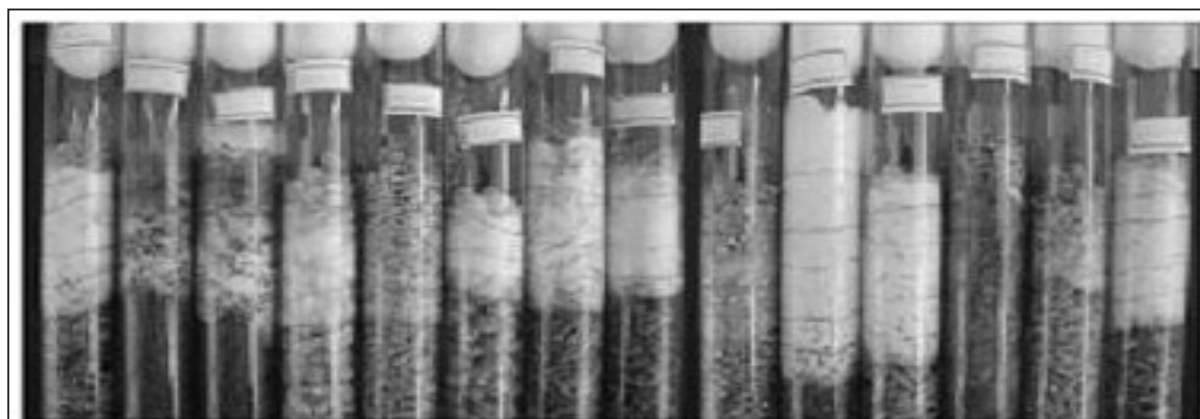


Figura 3: Crescimento do micélio de *Pleurotus ostreatoroseus* em grãos e serragem de eucalipto, Pelotas, 2005. (1= mistura de todos os substratos, 2=serragem + 20% de farelo de trigo, 3= serragem + 20% de farelo de soja, 4= milho, 5= arroz com casca, 6= soja, 7= aveia preta, 8= impureza de arroz, 9= trigo, 10= azevém, 11= aveia branca, 12= casca de arroz, 13= aveia descascada, 14= girassol)

plantas pertencentes à mesma família botânica, como é o caso da aveia preta e branca, azevém, milho, girassol, trigo e arroz, todos pertencentes à família Poaceae, demonstrando as diferenças nutricionais destes substratos. Labuschagne et al. (2000), em pesquisa com *P. ostreatus* 'Florida', já haviam observado crescimento variado do micélio durante a colonização de palhas de trigo de diferentes variedades. Resultado similar também visualizado neste trabalho quando comparados os substratos aveia preta, branca e aveia descascada, destacando-se o primeiro como sendo o de melhor qualidade para as condições deste experimento.

A suplementação de alguns substratos deve ser realizada principalmente como forma de adequar a relação C/N, onde para isso são utilizados, principalmente, materiais concentrados como farelos e tortas, sendo a quantidade a ser utilizada variável conforme o material. Neste caso, verificou-se que iguais quantidades (20%) de diferentes farelos de trigo e de soja adicionados a serragem, propiciaram diferenças significativas no crescimento da linhagem. Por outro lado, Rossi et al. (2003a) mostraram que com o aumento da suplementação do bagaço de cana-de-açúcar com farelo de arroz, o crescimento miceliano para produção de "spawn" de *Lentinula edodes* (Shiitake) apresentou decréscimo no desenvolvimento, sendo os melhores resultados obtidos com adição de 25 a 30% deste farelo. Já durante a fase de produção do *L. edodes*, Rossi et al. (2003b) obtiveram os melhores resultados na produtividade de cogumelos comercializáveis com a adição de 15% de farelo de arroz, o que comprova as diferentes necessidades do micélio durante as diferentes etapas de desenvolvimento.

Outro fato que deve ser levado em consideração são as exigências nutricionais das diferentes espécies e linhagens de cogumelos, sendo que cada espécie apresenta maior desenvolvimento miceliano em materiais com relações C/N específica. Curvetto et al. (2002), observaram para a produção de "spawn" de cinco linhagens de *P. ostreatus*, quando utilizaram sementes de girassol, diferentes resultados quanto ao desenvolvimento miceliano quando feita suplementação destas sementes com diferentes concentrações de NH_4^+ . Já para três linhagens de *L. edodes* (Le 95/01, Le 96/17 e Le 96/18) Queiroz et al. (2004) obtiveram melhores resultados no crescimento radial das linhagens quando os meios de cultivo foram suplementados com fontes de nitrogênio, demonstrando a dependência da relação C/N do micélio durante o desenvolvimento, fato que pode ser evidenciado neste trabalho principalmente quando levados em consideração os tratamentos compostos por serragem suplementados com farelos de soja e trigo. Poppe (2000) cita a avaliação de mais de 250 diferentes tipos de materiais como substratos para cogumelos e segundo o autor, para melhor utilização e obtenção de "spawn" o substrato deve ser facilmente degradado pelo fungo e propiciar rápido crescimento. Rinker (1991) também cita a importância de se buscar alternativas para diminuição de custos e agregação de valores, fatos estes demonstrados no presente trabalho.

Conclusões

A produção de inóculo de *P. ostreatoroseus* é satisfatória com aveia preta e serragem adicionada de 20% de farelo de soja, e insatisfatória com azevém, milho, gi-

rassol, mistura de todos os substratos, serragem + 20% de farelo de trigo, arroz com casca, soja, impureza de arroz, trigo, aveia branca, casca de arroz e aveia descascada.

A utilização de subprodutos agroindustriais para produção de inóculo de cogumelo é uma alternativa viável, principalmente visando maior retorno econômico no aproveitamento destes resíduos.

Referências Bibliográficas

- CURVETTO, N. R.; FIGLAS, D.; DEVALIS, R.; DELMASTRO, S. Growth and productivity of different *Pleurotus ostreatus* strains on sunflower seed hulls supplemented with N-NH₄⁺ and/or Mn (II). **Bioresource Technology**, v.84, p.171-176, 2002.
- EIRA, A. F.; MINHONI, M. T. A. **Manual teórico-prático do cultivo de cogumelos comestíveis**. 2.ed. Botucatu: Fundação de Estudos e Pesquisas Agrícolas e Florestais, 1997. 115p.
- HERNÁNDEZ, D.; SANCHEZ, J. E.; YAMASAKI, K. A simple procedure for preparing substrate for *Pleurotus ostreatus* cultivation. **Bioresource Technology**, v.90, n.2, p. 145-150, 2003.
- LABUSCHAGNE, P. M.; EICKER, A.; AVELING, T. A. S.; MEILLON, S.; SMITH, M. F. Influence of wheat cultivars on straw quality and *Pleurotus ostreatus* cultivation. **Bioresource Technology**, v.71, p.71-75, 2000.
- MODA, E. M.; HORII, J.; SPOTO, M. H. F. Edible mushroom *Pleurotus sajor-caju* production on washed and supplemented sugarcane bagasse. **Scientia Agricola**, v.62, n.2, p.127-132, 2005.
- OBODAI, M.; CLELAND-OKINE, J.; VOWOTOR, K. A. Comparative study on the growth and yield of *Pleurotus ostreatus* mushroom on different lignocellulosic by-products. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v.30, n.3, p.146-149, 2003.
- POPPE, J. Use of agricultural waste materials in the cultivation of mushrooms. In: VAN GRIENSVEN, L.J.L.D. (Ed.). **Science and cultivation of edible fungi**. Rotterdam: Balkema, 2000. v.1, p.3-23.
- QUEIROZ, E. C.; MARINO, R. H.; EIRA, A. F. Mineral supplementation and productivity of the shiitake mushroom on eucalyptus logs. **Scientia Agricola**, v.61, n.3, p.260-265, 2004.
- RINKER, D. L. Alternative additives, supplements, and casing amendments for *Agaricus bisporus*. In: MAHER, M.S. (Ed.). **Science and cultivation of edible fungi**. Rotterdam: Balkema, 1991. v.2, p.781-789.
- ROSSI, I. H.; MONTEIRO, A. C.; MACHADO, J. O. Desenvolvimento micelial de *Lentinula edodes* como efeito da profundidade e suplementação do substrato. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.36, n.6, p.887-891, 2001.
- ROSSI, I. H.; MONTEIRO, A. C.; MACHADO, J. O.; BARBOSA, J. C. Supplementation of sugarcane bagasse with rice bran and sugarcane molasses for shiitake (*Lentinula edodes*) spawn production. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.34, n.1, p.61-65, 2003a.
- ROSSI, I. H.; MONTEIRO, A. C.; MACHADO, J. O.; ANDRIOLI, J. L.; BARBOSA, J. C. Shiitake *Lentinula edodes* production on a sterilized bagasse substrate enriched with rice bran and sugarcane molasses. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.34, n.1, p.66-71, 2003b.
- ROYSE, D. J. Influence of spawn rate and commercial delayed release nutrient levels on *Pleurotus cornucopiae* (oyster mushroom) yield, size, and time to production. **Applied Microbiology Biotechnology**, n.58, p.527-531 2002.
- SAGIR, A.; YLLDIZ, A. Growth of mycelium of *Pleurotus* spp. on different grains and determination of their competition with some contaminant fungi. **Acta Alimentaria**, Budapest, v.33, n.2, p.249-257, 2004.
- SCHMIDT, P.; WECHSLER, F. S.; NASCIMENTO, J. S.; VARGAS JUNIOR, F. M. Tratamento do feno de braquiária pelo fungo *Pleurotus ostreatus*. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.32, n.6, p.1866-1871, 2003a.
- SCHMIDT, P.; WECHSLER, F. S.; VARGAS JUNIOR, F. M.; ROSSI, P. Valor nutritivo do feno de braquiária amonizado com uréia ou inoculado com *Pleurotus ostreatus*. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.32, n.6, p.2040-2049, 2003b.
- ZONTA, E. P., MACHADO, A. A. **SANEST - Sistema de análise estatística para microcomputadores**. Pelotas: Universidade Federal de Pelotas, 1984. Registrado na Secretaria Especial de Informática sob nº 066060 - categoria A. A.