

COMUNICAÇÃO CIENTÍFICA

DESENVOLVIMENTO MICELIAL *IN VITRO* DE *PLEUROTUS* SP. EM PALHA DE ARROZ SUPLEMENTADA COM SERRAGEM DE COUROE. Minotto¹, E. Bernardi², F.O. Rosa³, J.S. do Nascimento²

¹Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Departamento de Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Laboratório de Micologia, Rua Sarmiento Leite, 500, CEP 90050-170, Porto Alegre, RS, Brasil. E-mail: elisminotto@yahoo.com.br

RESUMO

O presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar a produção de biomassa, crescimento micelial e a colonização do substrato palha de arroz por *Pleurotus ostreatus* e *Pleurotus ostreatoroseus*, sob o efeito da adição de serragem de couro curtida ao tanino vegetal. O experimento 1 constituiu-se na formulação de meios de cultura, à base de palha de arroz adicionada de serragem de couro, nas concentrações 0, 5, 10, 15, 20, 25 e 30%. Discos de micélio de *P. ostreatus* (BF24) e *P. ostreatoroseus* (POR01/06) foram transferidos para o centro de placas contendo meios previamente preparados. Eles foram incubados a 28° C. No segundo experimento, o substrato palha de arroz foi submetido as mesmas condições experimentais acima descritas. O substrato inoculado com as duas cepas foi acondicionado em tubos de ensaio e incubado a 28° C. A biomassa fúngica foi avaliada pela diferença de massa seca e massa úmida, enquanto que para o crescimento do micélio realizaram-se mensurações em períodos pré-determinados até a completa colonização do meio ou do substrato. Verificou-se que os tratamentos com adição de 5, 15 e 25% e 15% deste suplemento para *P. ostreatus* proporcionaram redução da biomassa e do crescimento micelial, respectivamente. Na fase de miceliação o acréscimo de 5% deste suplemento a palha de arroz apresentou efeito positivo para o desenvolvimento de *P. ostreatus*.

PALAVRAS-CHAVE: Cogumelos, aproveitamento de resíduos, curtume.

ABSTRACT

MYCELIUM GROWTH OF *PLEUROTUS* SPP. IN RICE STRAW SUPPLEMENTED WITH LEATHERSAWDUST. The objective of this study was to evaluate the biomass production, mycelial growth and colonization of rice-straw substrate by *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus ostreatoroseus* under the effect of adding vegetable-tanned leather sawdust. The first experiment consisted of the formulation of the culture media based on rice straw with the addition of leather sawdust at the concentrations of 0, 5, 10, 15, 20, 25 and 30%. Discs of mycelium of *P. ostreatus* (BF24) and *P. ostreatoroseus* (POR01/06) were transferred to the center of plates containing previously prepared media. They were incubated at 28° C. In the second experiment rice straw substrate underwent the same experimental conditions described above. The substrate inoculated with the two strains was placed in test tubes and incubated at 28° C. The fungal biomass was evaluated by the difference between wet weight and dry weight, while for the mycelial growth, measurements were performed at predetermined times until the complete colonization of the medium or substrate. For *P. ostreatus*, it was found that the treatments with the addition of 5, 15 and 25% and 15% of this supplement led to a lower biomass and mycelial growth, respectively. In the mycelial growth phase the addition of 5% of this supplement to the rice straw had a positive effect on the development of *P. ostreatus*.

KEY WORDS: Mushroom, utilization of residues, tanin.

Os cogumelos são apreciados pela humanidade desde a antiguidade não somente por sua textura e paladar, mas principalmente por suas propriedades químicas e nutricionais. O gênero *Pleurotus* apresenta altos teores de proteínas e algumas

propriedades medicinais, como: anticancerígenas, anti-inflamatória, antibacteriana, antiparasitária, ações antivirais, efeitos positivos sobre hipoglicemia e funções cardíacas, entre outras (YILMAZ *et al.*, 2006).

²Universidade Federal da Paraíba, Departamento de Fisiologia e Patologia, João Pessoa, PB, Brasil.

³Universidade Federal do Rio Grande, Instituto de Oceanografia, Rio Grande, RS, Brasil.

Os cogumelos comestíveis são amplamente empregados como agentes eficientes na biorremediação ambiental (NAKAGAWA; ANDREA, 2006), reciclagem de resíduos agroindustriais (GONCALVES *et al.*, 2010), tratamento de efluente (SOUSA; ROSADO, 2009) e como também na alimentação animal (SCHMIDT *et al.*, 2003).

Vários resíduos agroindustriais são indicados para o cultivo de *Pleurotus* spp., pois, devido ao seu complexo aparato enzimático, esses fungos são capazes de se desenvolver em resíduos nutricionalmente pobres. O aproveitamento de resíduos agrícolas e agroindustriais no cultivo de cogumelos torna-se importante pela agregação de valores e, ao mesmo tempo, é uma alternativa inteligente para o descarte de resíduos, entre eles os de curtume, como, por exemplo, a serragem de couro proveniente do beneficiamento de peles.

A indústria coureiro-calçadista exerce importante influência na economia do Estado do Rio Grande do Sul. Porém, os curtumes geram uma quantidade considerável de resíduos com elevadas cargas orgânicas e inorgânicas, utilizadas no processo de curtimento do couro (CASTILHOS *et al.*, 2002).

Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a produção de biomassa e crescimento micelial e da colonização do substrato, formulado com palha de arroz adicionada de serragem de couro, por duas linhagens de *Pleurotus* spp. na expectativa de que a adição destes resíduos favoreça a colonização do substrato.

Os ensaios foram desenvolvidos no Laboratório Experimental de Micologia (LEMICO) do Departamento de Microbiologia e Parasitologia do Instituto de Biologia, da Universidade Federal de Pelotas (UFPel), RS. Na elaboração destes ensaios utilizou-se a espécie *P. ostreatus* (BF24), oriunda da UNESP/Botucatu-SP e a espécie *P. ostreatoroseus* (POR01/06), proveniente da UCS/Caxias do Sul-RS. Elas encontravam-se depositadas na micoteca do LEMICO/DEMP/IB/UFPel, preservadas em óleo mineral.

Para a realização dos testes *in vitro* utilizou-se a palha de arroz como base para o meio de cultivo e como substrato de colonização, adicionada com 0, 5, 10, 15, 20, 25 e 30% de serragem de couro curtida ao tanino vegetal, em relação à massa seca do substrato para realização dos meios e massa úmida para colonização de substrato.

No preparo do meio de cultura, a palha de arroz seca (30 g) foi umedecida e adicionada ou não da serragem de couro, de acordo com as concentrações acima mencionadas. Após a homogeneização de cada tratamento, eles foram fervidos em 1.000 mL de água destilada por 15 minutos, filtrados em gaze e algodão e o volume completado para 1.000 mL. Ao decoto adicionou-se 15 g L⁻¹ de ágar e 10 g L⁻¹ de dextrose, o qual foi submetido a esterilização em

autoclave a 121° C (1 atm) por 15 minutos. O pH dos meios foi ajustado para 5,5, e posteriormente vertidos em placas de Petri (90 x 15 mm). Asepticamente transferiu-se para o centro de cada placa um disco de meio (10 mm de diâmetro) contendo micélio obtido de culturas com 7 dias de crescimento e incubou-se a 28° C por 6 dias.

As leituras de crescimento radial foram realizadas a cada 24 horas em quatro direções ortogonais. A partir de 24 horas após a incubação, até a completa colonização do meio em uma das repetições. Após a última avaliação do crescimento, o meio de cultura foi dissolvido em água destilada fervente, aproximadamente 500 mL. A biomassa fúngica úmida (Mmu) foi recolhida com uma alça de platina, depositada em papel manteiga (4 x 4 cm) e seca em estufa a 45° C por 48h, para a obtenção da biomassa fúngica seca (Mms).

Para o ensaio de colonização de substrato, a palha de arroz seca foi previamente umedecidos por 24 horas e, posteriormente, suplementados com a serragem de couro nas mesmas concentrações anteriormente descritas. O substrato preparado foi acondicionado em tubos de ensaio (2,5 x 20 cm), preenchendo 13 cm do tubo. Na base de cada tubo colocou-se uma porção de algodão umedecido em água destilada. Estes foram fechados com papel alumínio e filme plástico, e posteriormente submetidos a esterilização à 121° C (1 atm) por 60 minutos. Um disco de cultura (10 mm de diâmetro) de cada uma das espécies, previamente multiplicadas em meio CDA, foi transferido para tubos contendo o substrato. Após a repicagem, os tubos foram fechados com papel alumínio e incubados a 26° ± 1 C. As leituras de crescimento micelial foram realizadas em quatro direções equidistantes, a cada 48 horas, a partir de 72 horas após a inoculação, até a completa colonização do substrato em uma das repetições.

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso, com fatorial A x B x C (A = espécie, B = concentração de serragem de couro e C = tempo de incubação) para crescimento micelial e colonização de substrato e A x B (A = espécie e B = concentração de serragem de couro) para biomassa. A unidade experimental constou de uma placa/tubo, sendo cinco repetições/tratamento. Os resultados obtidos foram submetidos à análise da variação e ao teste de Duncan para comparação das médias ($\alpha = 0,05$), utilizando-se o programa estatístico SANEST (ZONTA; MACHADO, 1987).

A análise das médias de biomassa, através do teste de Duncan, mostrou que a suplementação do meio de cultivo com serragem de couro em concentração crescentes não proporcionou diferença significativa no aumento desta variável, para nenhuma das linhagens estudadas (Tabela 1).

Por outro lado, a espécie de *P. ostreatoroseus* apresentou médias mais elevadas para esta variável nas concentrações 15% e 30% quando comparada a espécie *P. ostreatus*. Os tratamentos com adição de 5, 15 e 25% deste suplemento para *P. ostreatus* proporcionaram redução na biomassa. Segundo DONINI *et al.* (2005), uma colonização adequada do meio de cultura exerce fundamental importância na obtenção da massa e crescimento miceliano, influenciando, diretamente, na formação de basidiomas e potencializando sua capacidade de produção.

No presente trabalho, a suplementação do meio de cultivo com serragem de couro curtida ao tanino vegetal em concentrações crescentes não estimulou de forma significativa o crescimento micelial das linhagens de *Pleurotus* sp. estudadas. No entanto, sua adição não impediu totalmente o seu desenvolvimento. CRUZ *et al.* (1999) observaram que a utilização de concentrações elevadas de farelo de aveia proporcionou redução indesejável da taxa de crescimento. Entretanto, para ROSSI *et al.* (2001), farelos de arroz e soja estimulam o crescimento miceliano de diversas espécies de cogumelo, sendo considerados fontes nutricionais, os quais podem ser utilizados como suplemento.

A análise das médias de crescimento micelial demonstrou que as duas espécies de *Pleurotus* apresentaram desenvolvimento semelhante, na maioria dos tratamentos. A excessão ocorreu para espécie *P. ostreatus* nos tratamentos adicionados de 5, 10 e 15% de serragem de couro, nos quais o seu crescimento foi significativamente inferior ao de *P. ostreatoroseus* (Tabela 2). É possível notar, também, que para *P. ostreatoroseus* não houve diferença entre os tratamentos e a testemunha, enquanto que para *P. ostreatus* (BF24) a adição de 15% de resíduos reduziu o crescimento (Tabela 2).

Tabela 1 - Biomassa (g) de *P. ostreatoroseus* e de *P. ostreatus* cultivadas em meios à base de palha de arroz, adicionados de diferentes concentrações de serragem de couro, após 6 de incubação a 28° C.

Concentração de serragem de couro (%)	Biomassa de <i>Pleurotus</i> sp. (g)	
	POR01/06	BF24
0	0,017 ab A	0,020 a A
5	0,014 b A	0,012 b A
10	0,020 a A	0,017 ab A
15	0,017 ab A	0,012 b B
20	0,019 ab A	0,016 ab A
25	0,014 b A	0,012 b A
30	0,022 a A	0,016 ab B
CV 23,4%		

Médias seguidas de mesma letra minúscula, nas colunas, e maiúscula, nas linhas, não diferem pelo teste de Duncan ($\alpha = 0,05$).

Os micro-organismos se adaptam aos meios de cultivo em função da disponibilidade de nutrientes, principalmente em relação às fontes de carbono e nitrogênio, e do seu potencial genético. Segundo SELBACH *et al.* (1991), as variações na composição dos resíduos de curtume dependem do tipo de curtimento empregado, ao tanino ou ao cromo. Os mesmos autores, ao analisarem a biodegradação do couro, observaram que o curtimento do couro ao tanino vegetal gerou um lodo com percentagem elevada de nitrogênio (5,04%). Ao avaliarem diferentes concentrações de tanino no meio de cultivo para *Pleurotus* spp., FAN *et al.* (2000) puderam constatar a redução do ácido tânico no meio BDA e ausência deste no interior do micélio, sugerindo a degradação do tanino adicionado ao meio.

A análise das médias de colonização do substrato mostrou que a adição da serragem de couro em concentrações crescentes propiciou redução significativa do crescimento do micélio para *P. ostreatoroseus*. Enquanto que, para *P. ostreatus*, a adição de 5% estimulou o desenvolvimento propiciando as maiores médias de colonização (7,3 g) (Tabela 3). DIAS *et al.* (2003) observaram resultados semelhantes ao utilizarem substrato puro e suplementado com farelos no cultivo de *P. sajor-caju*, onde a palha de feijão pura apresentou menor tempo de crescimento miceliano, quando comparada à palha suplementada com 10% de farelo de trigo.

Embora os resíduos sólidos do beneficiamento do couro curtido ao tanino vegetal possam conter elementos tóxicos e fenóis, estes estão presentes na constituição dos substratos lignocelulósicos. WONG; WANG (1991) demonstraram em seus experimentos que *P. sajor-caju* foi capaz de degradar o tanino presente na casca de café.

Tabela 2 - Crescimento micelial (cm) de *P. ostreatoroseus* e de *P. ostreatus* cultivadas em meios à base de palha de arroz, adicionados de diferentes concentrações de serragem de couro, após seis dias de incubação a 28° C.

Concentração de serragem de couro (%)	Crescimento micelial de <i>Pleurotus</i> sp. (cm)	
	POR01/06	BF24
0	2,7 a A	2,5 a A
5	3,0 a A	1,9 ab B
10	2,9 a A	1,7 ab B
15	2,6 a A	1,6 b B
20	2,6 a A	1,8 ab A
25	2,3 a A	2,3 ab A
30	2,4 a A	1,8 ab A
CV 24,3%		

Médias seguidas de mesma letra minúscula, nas colunas, e maiúscula, nas linhas, não diferem pelo teste de Duncan ($\alpha = 0,05$).

As maiores médias de velocidades de crescimento diário foram observadas na concentração mais baixas (5%) ou na ausência deste suplemento, a partir do sétimo dia de incubação (Tabela 4). Por outro lado, a suplementação do substrato promoveu uma redução significativa da velocidade de crescimento a partir do quinto dia de incubação, nos tratamentos acrescidos das maiores concentrações (30%). Esta redução foi observada em todas as avaliações seguintes, de forma progressiva nos tratamentos com concentrações mais elevadas (25, 20, 15%) (Tabela 4).

O efeito negativo exercido sobre o crescimento micelial pode ter sido ocasionado, possivelmente, pela adição de serragem de couro ao substrato, podendo esta ter provocado alterações no metabolismo do fungo. Segundo CLASS; MAIA (1994), aparas de peles curtidas ao tanino são compostas por aproximadamente 17% de tanino. Conforme FAN; SOCOOL (2007), em seu trabalho de detoxificação da casca de café utilizando o fungo, constataram que concentrações de tanino inferiores a 100mg L⁻¹ são capazes de estimular o crescimento de *Pleurotus*. BERNARDI *et al.* (2008) observaram que a utilização de serragem de couro curtida ao tanino vegetal como substrato para cultivo de *P. ostreatus* reduziu significativamente a massa fresca, produtividade e eficiência biológica total.

A suplementação do meio de cultivo com serragem de couro curtida ao tanino vegetal, em diferentes concentrações, não proporciona efeito positivo no aumento de massa, de crescimento micelial e colonização de substrato para ambas as espécies de *Pleurotus*. No entanto, é possível que esses resíduos sólidos em adição a outros resíduos agroindustriais possam tornar-se uma alternativa viável ao seu tratamento impedindo o descarte desses, diretamente, no ambiente.

Tabela 3 - Crescimento micelial (cm) de *P. ostreatoroseus* e de *P. ostreatus* cultivadas em substrato palhas de arroz, adicionado de diferentes concentrações de serragem de couro, após 17 dias de incubação a 28° C.

Concentração de serragem de couro (%)	Crescimento micelial de <i>Pleurotus</i> spp. (cm)	
	POR01/06	BF24
0	6,3 a	6,8 b
5	6,1 b	7,3 a
10	5,9 c	6,7 b
15	5,7 c	6,6 bc
20	5,0 d	6,5 c
25	4,9 de	6,2 d
30	4,8 e	5,6 e
CV 7,15%		

Médias seguidas de mesma letra minúscula, nas colunas, não diferem pelo teste de Duncan ($\alpha = 0,05$).

Tabela 4 - Velocidade crescimento micelial (cm.dia⁻¹) de *Pleurotus* sp. cultivadas em substrato palhas de arroz, adicionado de diferentes concentrações de serragem de couro.

Concentração de serragem de couro (%)	Velocidade de crescimento (cm.dia ⁻¹)							
	Tempo de incubação (dias)							
	03	05	07	09	11	13	15	17
0	0,75a	2,26ab	4,06a	5,54ab	7,30ab	9,11ab	10,80a	12,56a
5	0,87a	2,33a	4,12a	5,67a	7,46a	9,41a	11,04a	12,84a
10	0,83a	2,17abc	3,85ab	5,27bc	6,99bc	8,80bc	10,38b	12,17b
15	0,82a	2,25ab	3,86ab	5,20bc	6,78c	8,50c	9,95c	11,83b
20	0,58a	2,01abc	3,62bc	4,95cd	6,29d	8,00d	9,57d	11,12c
25	0,69a	1,86bc	3,39cd	4,77d	6,23d	7,74d	9,13e	10,76c
30	0,70a	1,80c	3,21d	4,40e	5,60e	7,12e	8,55f	10,16d

Médias seguidas de mesma letra minúscula, nas colunas, não diferem pelo teste de Duncan ($\alpha = 0,05$).

REFERÊNCIAS

- BERNARDI, E.; MINOTTO, E.; NASCIMENTO, J.S. aproveitamento de resíduo de curtume como suplemento no cultivo de *Pleurotus ostreatus*. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v.75, n.2, p.243-246, 2008.
- CASTILHOS, D.D.; TEDESCO, M.J.; VIDOR, C. Rendimentos de culturas e alterações químicas do solo tratado com resíduos de curtume e crômio hexavalente. *Revista Brasileira de Ciências do Solo*, v.26, p.1083-1092, 2002.
- CLAAS, I.C.; MAIA, R.A.M. *Manual básico de resíduos industriais de curtume*. Porto Alegre: Senai, 1994. 664p.
- CRUZ, O.S.; CASTAÑEDA, G.S.; HACH, J.L.P.; ROJAS, M.G.; TORRES, E.F. Effect of substrate composition on the mycelial growth of *Pleurotus ostreatus*. An analysis by mixture and response surface methodologies. *Process Biochemistry*, v.39, p.127-133, 1999.
- DIAS, E.S.; KOSHIKUMO, E.M.S.; SCHWAN, R.F.; SILVA, R. Cultivo do cogumelo *Pleurotus sajor-caju* em diferentes resíduos agrícolas. *Ciência e Agrotecnologia*, v.27, n.6, p.1363-1369, 2003.
- DONINI, L.P.; BERNARDI, E.; MINOTTO, E.; NASCIMENTO, J.S. Desenvolvimento in vitro de *Pleurotus* sp. sob a influência de diferentes substratos e dextrose. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v.72, n.3, p.331-

338, 2005. Disponível em: <http://www.biologico.sp.gov.br/docs/arq/V72_3/donini.PDF> Acesso em: 15 jun. 2007.

FAN, L.; PANDEY, A.; SOCCOL, C.R. Production of mushrooms on brazilian coffee industry residues. In: SERA, T.; SOCCOL, C.R.; PANDEY, A.; ROUSSOS, S. (Org.). *Coffee biotechnology and quality*. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2000. v.1, p.427-436.

FAN, L.; SOCCOL, C.R. Detoxificação da casca de café utilizando fungo. 2007. Disponível em: <www.coffeebreak.com.br/ocafezal.asp>. Acesso em: 15 jun. 2007.

GONÇALVES, C.C.M.; PAIVA, P.C.A.; DIAS, E.S.; SIQUEIRA, F.G.; HENRIQUE, F. Avaliação do cultivo de *Pleurotus sajor-caju* (fries) sing. sobre o resíduo de algodão da indústria têxtil para a produção de cogumelos e para alimentação animal. *Ciência e Agrotecnologia*, v.34, n.1, p.220-225, 2010.

NAKAGAWA, L.M.; ANDREA, M. M. Efeito de alterações nas características do solo obre a degradação de hexaclorobenzeno. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v.30, n.3, p.575-582, 2006.

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.

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, 2003.

SELBACH, P.A.; TEDESCO, M.J.; GIANELLO, C.; CAVALLET, L.E. Descarte e biodegradação de lodos de curtume no solo. *Revista do Couro*, v.4, p.51-62, 1991.

SOUZA, A.F.; ROSADO, F.R. Utilização de fungos basidiomicetes em biodegradação de efluentes têxteis. *Revista em Agronegócios e Meio Ambiente*, v.2, n.1, p.121-139, 2009.

WONG, Y.S.; WANG, X. Degradation of tannins in spent coffee grounds by *Pleurotus sajor-caju*. *World Journal Microbiology and Biotechnology*, v.7, p.573-574, 1991.

YILMAZ, N.; SOLMAZ, M.; TÜRKEKUL, I.; ELMAS-TAS, M. Fatty acid composition in some wild edible mushrooms growing in middle Black Sea region of Turkey. *Food chemistry*, v.99, p.168-174, 2006.

ZONTA, E.P.; MACHADO, A.A. SANEST - Sistema de análise estatística para microcomputadores. Pelotas: DMEC/IFM/UFPel, 1987. 138p.

Recebido em 15/11/10

Aceito em 30/10/11