

## COMUNICAÇÃO CIENTÍFICA

CRESCIMENTO MICELIANO *IN VITRO* DE *PLEUROTUS OSTREATOROSEUS* E COLONIZAÇÃO DO SUBSTRATO CAPIM-ELEFANTE (*PENNISETUM PURPUREUM* SCHUM.) SUPLEMENTADO COM DIFERENTES FARELOS

E. Minotto\*\*, E. Bernardi\*, L.P. Donini, J.S. do Nascimento

Universidade Federal de Pelotas, Instituto de Biologia, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Laboratório de Micologia, CP 354, CEP 96010-900, Pelotas, RS, Brasil. E-mail: elisminotto@yahoo.com.br

## RESUMO

Cogumelos do gênero *Pleurotus* desenvolvem-se em diferentes substratos ou compostos à base de resíduos celulósicos ou lignificados, sendo que conforme a formulação do meio de cultivo e do substrato, maior colonização poderá ser obtida. Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar o crescimento miceliano *in vitro* de *P. ostreatoroseus* em diferentes meios de cultura e a sua colonização no substrato capim-elefante, suplementado com diferentes farelos. O experimento 1 consistiu na utilização de meios de cultura estéril à base de capim-elefante suplementados com farelos de soja, trigo, arroz e milho nas concentrações de 0, 10 e 20%, distribuídos em placas de Petri, inoculados com a linhagem POR01/03 de *P. ostreatoroseus* e incubados a 28° C, visando a avaliação da massa e do crescimento miceliano. O experimento 2 constituiu-se na utilização do substrato capim-elefante previamente umedecido, o qual recebeu a mesma suplementação do experimento 1. Este foi acondicionado em tubos de ensaio, esterilizado, inoculado com a mesma linhagem e conduzido nas mesmas condições que o experimento anterior. O meio de cultivo à base de capim-elefante suplementado com 20% de farelo de soja e 20% de farelo de arroz proporcionou, respectivamente, maior desenvolvimento de massa e crescimento miceliano, quando comparado aos demais tratamentos. Enquanto que a colonização do substrato capim-elefante ocorreu de forma mais rápida no tratamento sem a suplementação do substrato com os farelos de soja, trigo, arroz e milho.

PALAVRAS-CHAVE: Basidiomiceto, massa miceliana, suplementação, velocidade de crescimento.

## ABSTRACT

MYCELIUM GROWTH *IN VITRO* OF *PLEUROTUS OSTREATOROSEUS* AND COLONIZATION OF THE ELEPHANT GRASS SUBSTRATE (*PENNISETUM PURPUREUM* SCHUM.) SUPPLEMENTED WITH DIFFERENT BRANS. Mushrooms of the genera *Pleurotus* develop in different substrates or compounds based on cellulosic or lignified residues. As crop yield depends on the formulation of the culture media, the present study was aimed at measuring and evaluating the *in vitro* mycelium growth of *P. ostreatoroseus* in different culture media and its colonization of elephant-grass substrate supplemented with different brans. Experiment 1 consisted of the mushroom strains cultured in elephant-grass culture media supplemented with soy, wheat, rice and corn brans in the concentrations 0, 10 and 20%, distributed in Petri plates, inoculated with the strain POR01/03 of *P. ostreatoroseus* and incubated at 28° C. Mass and mycelium growth were evaluated. Experiment 2 involved the use of the previously moistened elephant-grass substrate, which received the same supplementation as that of experiment 1. This was packaged in test tubes, sterilized, inoculated with the same strain and then maintained under the same conditions of experiment 1. The elephant-grass culture media supplemented with 20% soy bran and 20% rice bran provided, respectively, larger development of the mass and mycelium growth, when compared with the other treatments. However, colonization took place the quickest on the elephant-grass substrate without addition of the soy, wheat, rice and corn brans.

KEY WORDS: Basidiomiceto, mycelium mass, supplementation, growth speed.

\*Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Sistemas de Produção Agrícola Familiar- FAEM- UFPel/ Bolsista Capes.

\*\*Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade - FAEM - UFPel/ Bolsista Capes.

Os cogumelos do gênero *Pleurotus* são consumidos pelos europeus, desde a antiguidade. Porém, foi por volta de 1945, ao final da segunda Guerra Mundial, que houve notícia do primeiro cultivo industrial desta espécie, em palha de trigo (JOB, 2004).

Estes cogumelos crescem em substratos nutricionalmente pobres e apresentam bom desenvolvimento em condições rústicas (SCHMIDT *et al.*, 2003). No cultivo de *Pleurotus* utiliza-se uma grande variedade de resíduos agrícolas, como palhas, gramíneas, serragens, cascas de coco, sabugo de milho, bagaço de cana-de-açúcar, entre outros de natureza orgânica (SALAS, 2005; DONINI *et al.*, 2006). O desenvolvimento rápido do fungo comestível deve-se a produção de uma série de enzimas lignocelulases, que degradam facilmente a lignina e a celulose da madeira, assim como de outros substratos vegetais utilizados para o seu cultivo (CAPELARI, 1996). Este aparato enzimático permite-lhe converter compostos agrícolas de baixo valor econômico em produtos alimentícios de elevado teor protéico (SCHMIDT *et al.*, 2003). Por isto, os cogumelos comestíveis estão sendo apontados como uma alternativa para suprir deficiências protéicas na alimentação humana em países com grande índice de desnutrição (BORAS, 1996; EIRA; MINHONI, 1997).

DONINI *et al.* (2006) indicaram o capim-elefante (*Pennisetum spp.*) como uma das gramíneas para o cultivo de *P. ostreatus*. Como este substrato apresenta uma relação C/N alta a autora recomenda a suplementação com materiais que apresentem maior teor de nitrogênio. A suplementação do substrato é comumente utilizada, pois aumenta a produtividade e a eficiência biológica (MODA *et al.*, 2005). Entre os suplementos mais utilizados no cultivo estão os farelos de cereais, os quais atuam como fonte de substâncias nutritivas, de N orgânico necessário ao aumento da massa miceliana, bem como interferência na produtividade e eficiência biológica do fungo (MONTINI, 2001).

Este trabalho teve como objetivo avaliar o desenvolvimento miceliano *in vitro* de *Pleurotus ostreatoroseus* em diferentes meios de cultura e a sua colonização no substrato capim-elefante, suplementado com diferentes farelos.

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório Experimental de Micologia - LEMICO - Departamento de Microbiologia e Parasitologia - DEMP - Instituto de Biologia - IB - Universidade Federal de Pelotas, RS.

A cultura inicial foi obtida a partir da linhagem POR01/03 de *P. ostreatoroseus* oriunda da UFSC, depositada na micoteca do Lemico/DEMP/IB/UFPel e preservada em óleo mineral. A linhagem foi repicada para meio de cultura CDA, à base de capim-elefante + dextrose + ágar (DONINI *et al.*, 2005), e incubada a 28° C por 10 dias, até ser recuperada e apresentar crescimento miceliano adequado. Transcorrido o cresci-

mento miceliano, a linhagem foi novamente transferida para o referido meio de cultivo e incubada a 28° C por 7 dias, até obtenção de crescimento para a realização do experimento.

Para a realização dos dois experimentos utilizou-se como base o substrato capim-elefante, suplementado com 0, 10 e 20% de farelo de soja, trigo, arroz e milho em relação a sua massa seca. O capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum) foi cortado durante o outono, quando se encontrava em estado vegetativo jovem; posteriormente foi fragmentado em tamanho de 2cm, e seco à temperatura ambiente (22 - 25° C).

Para o preparo dos meios de cultura utilizou-se o capim-elefante (30 g) adicionado ou não dos farelos de soja, trigo, arroz e milho nas concentrações de 0, 10 e 20%, conforme o tratamento. Estes foram fervidos em 1 L de água destilada por 15 minutos e, em seguida, filtrados em um pedaço de gaze e o volume completado 1 L. Logo após foram adicionados 15 gL<sup>-1</sup> de ágar e 10 gL<sup>-1</sup> de dextrose para posterior esterilização em autoclave por 20 minutos a 121° C. O pH dos meios foi ajustado para 5,5 (EIRA; MINHONI, 1997), sendo depois vertido em placas de Petri (90 x 15 mm) previamente esterilizadas.

Em câmara de fluxo laminar, discos de cultura de *P. ostreatoroseus*, com sete dias de incubação e 10mm de diâmetro, previamente preparados, foram repicados para o centro das placas de Petri contendo o referido meio de cultivo, usando-se a mesma metodologia para todos os tratamentos.

As variáveis analisadas foram: crescimento e massa miceliana. O crescimento miceliano foi medido com o auxílio de uma régua, em oito direções ortogonais, a cada 24 horas, a partir de 48 horas, durante a incubação até o momento que uma colônia atingiu a proximidade da borda da placa em um dos tratamentos. Após a última avaliação do crescimento, o meio de cultura foi dissolvido em água fervente, aproximadamente 500 mL por repetição, recolhendo-se a massa miceliana em pedaços de papel manteiga previamente pesados (Peso inicial - Pi), a qual foi seca em estufa a 50° C por 24h, obtendo-se a massa seca (Peso final - Pf). Através da diferença entre Pf e Pi obteve-se a biomassa miceliana para cada tipo de meio de cultivo utilizado sob os diferentes tratamentos.

Para avaliar a colonização do substrato lignocelulósico, experimento 2, o capim-elefante foi previamente umedecido por 24 horas e aplicada a mesma suplementação do experimento 1. O substrato foi acondicionado em tubos de ensaio de dimensão 2,5 x 20 cm. Previamente, no fundo de cada tubo, foi colocado um chumaço de algodão umedecido com água destilada, seguido de uma coluna de 13 cm de substrato. Estes foram identificados de acordo com o tratamento, fechados com algodão, cobertos com papel alumínio e autoclavados à temperatura de 121° C (1 atm) por 45 minutos.

Tabela 1 - Massa miceliana (g) e crescimento miceliano (cm) da linhagem POR01/03 de *Pleurotus ostreatoroseus*, cultivadas em placas de Petri com meios à base de capim-elefante suplementados com farelos de soja, trigo, arroz e milho, nas concentrações de 0, 10 e 20%, após 96 horas de incubação.

Farelo	Massa miceliana		
	Concentração (%)		
	0	10	20
Soja	0,0156 a C	0,0606 a B	0,0794 a A
Trigo	0,0156 a B	0,0392 b A	0,0360 b A
Arroz	0,0156 a B	0,0194 c B	0,0272 c A
Milho	0,0156 a A	0,0196 c A	0,0176 d A

  

Farelo	Crescimento miceliano		
	Concentração (%)		
	0	10	20
Soja	6,816 a A	6,782 b AB	6,628 c B
Trigo	6,816 a A	6,448 c C	6,622 c B
Arroz	6,816 a B	6,972 a AB	7,050 a A
Milho	6,816 a A	6,870 ab A	6,846 b A

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

Tabela 2 - Crescimento miceliano (cm) da linhagem POR01/03 de *Pleurotus ostreatoroseus* cultivado em placas de Petri com meios à base de capim-elefante suplementados com farelos de soja, trigo, arroz e milho nas concentrações 0, 10 e 20%, durante 96 horas de incubação.

Concentração	Leituras em horas de incubação			
	24	48	72	96
0%	2,582 a	4,112 a	5,787 a	6,816 a
10%	2,377 b	3,888 b	5,623 b	6,768 a
20%	2,402 b	3,916 b	5,535 c	6,786 a

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

Em câmara de fluxo laminar, discos de cultura com sete dias de incubação e 10 mm de diâmetro, previamente preparados em meio de cultura CDA, foram repicados para os tubos de ensaio contendo substrato. Após a inoculação, os tubos foram marcados externamente com quatro retas equidistantes do início ao fim e incubados em estufa a 28°C. Foram realizadas medições do crescimento a cada 48h de incubação, a partir de 72 horas após a inoculação, até a completa colonização do substrato em algum dos tratamentos, o que aconteceu no décimo nono dia de incubação.

Os resultados obtidos foram submetidos à análise da variância e ao teste de Duncan para comparação das médias, utilizando-se o programa estatístico SANEST (ZONTA; MACHADO, 1984).

A análise das médias de massa miceliana, através do teste de Duncan, mostrou que o tratamento com suplementação de farelo de soja na concentração 20% apresentou os melhores resultados para está variável. Enquanto que a adição de farelo de milho não exerceu efeito no aumento da massa miceliana para esta linhagem de *P. ostreatoroseus* (Tabela 1).

CRUZ *et al.* (1999) observaram que a utilização de elevadas concentrações de farelo de aveia proporcionou a redução indesejável da taxa de crescimento miceliano de *P. ostreatus*. Já BISARIA *et al.* (1997) relataram que a suplementação orgânica ou mineral pode ser utilizada somente em pequenas quantidades, devido ao fato do excesso de nitrogênio poder inibir a síntese da lignina, retardando ou até inibindo completamente o crescimento do micélio. Aparentemente, isto não ocorreu no presente trabalho, pois as maiores médias de massa miceliana *in vitro* foram observadas em meios com maior concentração de farelos.

Conforme se observa na Tabela 1, os meios adicionados com farelo de trigo e de soja apresentaram resultados de crescimento miceliano inferiores ao meio sem adição de farelo (0%). No entanto, o farelo de arroz, na concentração 20%, demonstrou as maiores médias de velocidade de crescimento comparadas aos demais farelos. Resultado este contrário ao observado por MODA (2003), ao verificar que a adição de substâncias de rápida assimilação, como farelo de soja ou alfafa, ocasionou aumento da velocidade de crescimento miceliano. Já DONINI *et al.* (2006) observaram que para duas linhagens (BF24 e DF33) de *P. ostreatus* a maior velocidade de crescimento miceliano foi obtida à medida que se aumentou a concentração de farelos de soja e de trigo, porém constatou para uma terceira linhagem (HF19) efeito negativo em estimular a velocidade de crescimento, por estes suplementos.

Tabela 3 - Crescimento miceliano (cm) da linhagem POR01/03 de *Pleurotus ostreatoroseus* cultivada em tubos de ensaio com substrato capim-elefante suplementado com farelos de soja, trigo, arroz e milho nas concentrações 0, 10 e 20%, após 456 horas de incubação.

Farelo	Concentração (%)		
	0	10	20
Soja	11,696 a A	11,253 a B	10,786 b C
Trigo	11,696 a A	10,553 c B	10,131 c C
Arroz	11,696 a A	10,768 bc B	10,263 c C
Milho	11,696 a A	11,090 ab B	11,440 a AB

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

Tabela 4 - Crescimento miceliano (cm) da linhagem POR01/03 de *Pleurotus ostreatoroseus* cultivada em tubos de ensaio com substrato capim-elefante suplementado com diferentes farelos nas concentrações 0, 10 e 20%, durante 456 horas de incubação.

Concentração	Leituras em horas de incubação								
	72	120	168	216	264	312	360	408	456
0%	1,203a	2,518a	4,033a	5,956a	7,228a	8,671a	9,993a	10,590a	11,692a
10%	1,063a	2,243b	3,519b	5,207b	6,352b	7,680b	9,112b	9,808b	10,916b
20%	1,008a	2,122b	3,308c	4,905c	6,024c	7,294c	8,762c	9,524c	10,655c

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

A interação entre concentrações de farelos e as leituras em horas de incubação mostrou que a adição de farelos não foi significativa, não apresentando diferenças de quando estes não foram adicionados (Tabela 2).

A velocidade de crescimento miceliano, em tubos, apresentou médias significativamente superiores de desenvolvimento nos tratamentos sem acréscimo de farelos (0%), cultivados somente em substrato capim-elefante (Tabela 3). Tal resultado foi observado também em relação ao período de incubação, o qual não manifestou efeito positivo no desenvolvimento do micélio com a elevação das concentrações (Tabela 4).

Isso pode ter ocorrido, provavelmente, devido à maior disponibilidade de nitrogênio facilmente assimilável no substrato capim-elefante sem suplementação. Segundo DONINI *et al.* (2006), o substrato capim-elefante possui uma relação C/N elevada (162:1), enquanto que a suplementação deste, com farelos, diminui o valor da relação C/N à medida que a concentração deles se eleva.

O tipo e a quantidade de farelo, adicionado ao substrato, interferiram na massa e no crescimento miceliano de *P. ostreatoroseus* (Tabelas 1 e 3). A adição de farelos ao substrato por ser rico em nitrogênio disponibiliza fonte deste nutriente e possivelmente estimula a ação enzimática do micélio fúngico em crescimento. De acordo com REGINA (2004), o desenvolvimento da habilidade lignocelulítica requer condições nutricionais e culturais, incluindo substrato metabolizável, altos teores de oxigênio, um limite de nitrogênio e outras condições de cultivo.

CAPELARI (1996) observou que a taxa de crescimento miceliano em um substrato sólido foi dependente de fatores ambientais e específicos da linhagem. Já MAIO (2003), ao utilizar palha e farelo de arroz no cultivo de *P. ostreatus*, observou que quando aumentou a concentração de 10% para 20% ocorreu um decréscimo na eficiência biológica. Entretanto, MODA *et al.* (2005), ao utilizarem bagaço de cana-de-açúcar suplementado com quirela de milho e com solução mineral no cultivo de *P. sajor-caju*, evidenciaram um melhor desempenho na eficiência biológica deste cogumelo.

O meio de cultivo à base de capim-elefante suplementado com 20% de farelo de soja e de arroz, respectivamente, favorece o aumento da massa e do crescimento miceliano de *P. ostreatoroseus*. Enquanto que o crescimento miceliano em substrato capim-elefante não é favorecido, pois sua colonização é mais rápida, em substrato, sem a adição dos farelos de soja, trigo, arroz e milho.

#### REFERÊNCIAS

- BISARIA, R.; MADAN, M.; VASUDEVAN, P. Utilization of agro-residues as animal feed bioconversion. *Bioresouse Technology*, v.59, p.5-8, 1997.
- CAPELARI, M. *Atividade biodegradadora e cultivo de três espécies comestíveis de basidiomicetos: Pleurotus sp. e Agrocybe perfecta (Rick) Sing.* 1996. Tese (Doutorado em Botânica), Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1996.
- CRUZ, O.S.; CASTANEDA, 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.
- 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.
- DONINI, L.P.; BERNARDI, E.; MINOTTO, E.; NASCIMENTO, J.S. Efeito da suplementação com farelos no crescimento *in vitro* de *Pleurotus ostreatus* em meio a base de capim-elefante (*Pennisetum spp.*). *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v.73, n.3, p.303-309, 2006.
- 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.

JOB, D. La utilización de la borra del café como substrato de base para el cultivo de *Pleurotus ostreatus* (Jacq.:Fr.) Kummer. *Revista Iberoamericana de Micología*, v.21, p.195-197, 2004.

MAIO, C.S.S. *Influência da composição do substrato sobre o valor nutricional do cogumelo Pleurotus ostreatus e seu potencial na redução da hipercolesterolemia experimental*. 2003. 88f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciências de Alimentos) - Departamento de Química, Fundação Universidade do Rio Grande, Rio Grande, 2003.

MODA, E.M. *Produção de Pleurotus sajor-caju em bagaço de cana-de-açúcar lavado e uso de aditivos visando sua conservação "in natura"*. 2003. 100f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

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, p.127-132, 2005.

MONTINI, R.M.C. *Efeito de linhagens e substratos no crescimento miceliano e na produtividade do cultivo axênico de Shiitake Lentinula edodes (Berk.) Pegler*. 2001. 97 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2001.

REGINA, M. *Atividade de enzimas lignocelulíticas no crescimento de Lentinula edodes em subprodutos energéticos*. 2004. 86f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2004.

SALAS, N. Cultivo de hongos comestibles potenciadores del sistema inmunológico. In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE MICOLOGIA, 5., 2005, Brasília. *Resumos*. Brasília, 2005. p.169-173.

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, 2003.

ZONTA, E.P.; MACHADO, A.A. *SANEST - SISTEMA DE ANÁLISE ESTATÍSTICA PARA MICRocomputadores*. Registrado na Secretaria Especial de Informática sob nº 066060 - categoria A. Pelotas, RS: Universidade Federal de Pelotas, 1984.

Recebido em 29/3/07

Aceito em 14/8/08