

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS  
CAMPUS DE BOTUCATU

**POTENCIAL DE USO DE GRAMÍNEAS COMO SUBSTRATO  
PASTEURIZADO NO CULTIVO DO COGUMELO *Pleurotus ostreatus*  
(Jacq.) P. Kumm.**

**FABRÍCIO ROCHA VIEIRA**

Dissertação apresentada à Faculdade de  
Ciências Agronômicas da UNESP –  
Campus de Botucatu, para obtenção do  
Título de Mestre em Agronomia (Energia  
na Agricultura)

BOTUCATU-SP  
Julho de 2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS  
CAMPUS DE BOTUCATU

**POTENCIAL DE USO DE GRAMÍNEAS COMO SUBSTRATO  
PASTEURIZADO NO CULTIVO DO COGUMELO *Pleurotus ostreatus*  
(Jacq.) P. Kumm.**

**FABRÍCIO ROCHA VIEIRA**

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dra. Marli Teixeira de Almeida Minhoni

Dissertação apresentada à Faculdade de  
Ciências Agronômicas da UNESP –  
Campus de Botucatu, para obtenção do  
Título de Mestre em Agronomia (Energia  
na Agricultura)

BOTUCATU-SP  
Julho de 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - SERVIÇO TÉCNICO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

V658p Vieira, Fabricio Rocha, 1982-  
Potencial de uso de gramíneas como substrato pasteurizado no cultivo do cogumelo *Pleurothus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm / Fabricio Rocha Vieira. - Botucatu : [s.n.], 2012  
xv, 115 f. : gráfs., tabs., fots. color.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2012  
Orientador: Marli Teixeira de Almeida Minhoni  
Inclui bibliografia

1. Cogumelos - Cultivo. 2. Farelo de trigo.  
3. Gramínea. 4. Palha - Utilização. 5. Pasteurização.  
6. Substratos. I. Minhoni, Marli Teixeira de Almeida. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agrônômicas. III. Título.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS  
CAMPUS DE BOTUCATU


CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: "POTENCIAL DE USO DE GRAMÍNEAS COMO SUBSTRATO  
PASTEURIZADO NO CULTIVO DO COGUMELO *Pleurotus ostreatus*  
(Jacq.) P. Kumm.

ALUNO: FABRÍCIO ROCHA VIEIRA

ORIENTADORA: PROFª DRª MARLI TEIXEIRA DE ALMEIDA MINHONI

Aprovado pela Comissão Examinadora



PROFª DRª MARLI TEIXEIRA DE ALMEIDA MINHONI



PROFª DRª CECÍLIA SALES DA GAMA CAMPOS



PROFª DRª MEIRE CRISTINA NOGUEIRA DE ANDRADE

Data da Realização: 30 de julho de 2012.

**DEDICO**

Aos meus pais Dorival e Nilza, à minha irmã pela apoio, incentivo e amor  
dedicados...  
E por último ao silêncio e aos fungos...

## AGRADECIMENTOS

À Professora Dra. Marli Teixeira de Almeida Minhoni pela amizade, orientação, e paciência durante o curso de mestrado e a realização deste trabalho.

Aos responsáveis pelo Programa de Pós-Graduação A/C: Energia na Agricultura FCA/UNESP, pela oportunidade de realização deste projeto e auxílio financeiro constante para a realização do trabalho, em especial ao Coordenador Professor Dr. Marco Antonio M. Biaggione.

Ao Professor Dr. Edson Luis Furtado por algumas sugestões a respeito deste trabalho.

Aos funcionários do Módulo de Cogumelos, José Antonio Fogaça, Ivando Roberto Fogaça, pelo auxílio constante durante os experimentos.

À técnica de laboratório, Maria de Fátima Almeida Silva do Departamento de Produção Vegetal – FCA/UNESP pelo auxílio durante os experimentos.

Aos estagiários de graduação, em especial Guilherme Lambertim de Oliveira Guimarães e ao Eduardo Pinheiro Sampaio Risso pelo apoio nas atividades de campo deste trabalho.

À todos os funcionários da Fazenda Lageado da FCA/UNESP, que colaboraram na aquisição e transporte de materiais.

Aos funcionários da biblioteca da FCA, pelos importantes serviços prestados a elaboração desta Dissertação.

Aos colegas de Pós-Graduação, em especial ao João Paulo Furlan de Jesus, Meire Cristina Nogueira de Andrade, e a todos que de alguma forma contribuíram com a realização deste trabalho.

À FUNDUNESP pelo apoio financeiro na realização das análises bromatológicas deste trabalho.

À CAPES pela auxílio da bolsa.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b>	X
<b>SUMMARY</b>	XIII
<b>INTRODUÇÃO GERAL</b>	1
<b>REVISÃO DE LITERATURA</b>	3
<b>Cogumelos comestíveis e o gênero <i>Pleurotus</i></b>	3
<b>Métodos de produção de cogumelos</b>	4
<b>Substrato de cultivo</b>	6
<b>Substrato à base de capim</b>	10
<b>Suplementação do substrato</b>	12
<b>Tratamento do substrato</b>	13
<b>Características bromatológicas dos basidiomas de cogumelos comestíveis</b>	14
<b>REFERÊNCIAS GERAIS</b>	16
<b>CAPÍTULO 1. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE LINHAGENS COMERCIAIS DE <i>Pleurotus ostreatus</i> PELA TÉCNICA RAPD</b>	22
<b>INTRODUÇÃO</b>	22
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	24
<b>RESULTADO E DISCUSSÃO</b>	27
<b>CONCLUSÃO</b>	31
<b>REFERÊNCIAS</b>	32
<b>CAPÍTULO 2. CRESCIMENTO MICELIAL DE LINHAGENS DE <i>Pleurotus ostreatus</i> EM MEIOS DE CULTURA À BASE DE SUBSTRATOS DE GRAMÍNEAS</b>	34
<b>INTRODUÇÃO</b>	34
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	36
<b>RESULTADO E DISCUSSÃO</b>	39

<b>CONCLUSÃO</b>	47
<b>REFERÊNCIAS</b>	48
<b>CAPÍTULO 3. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E FÍSICA DO SUBSTRATO DURANTE A COMPOSTAGEM NAS FASES I E II</b>	50
<b>INTRODUÇÃO</b>	50
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	52
<b>RESULTADO E DISCUSSÃO</b>	59
<b>CONCLUSÃO</b>	75
<b>REFERÊNCIAS</b>	76
<b>CAPÍTULO 4. PRODUÇÃO E CARACTERÍSTICAS BROMATOLÓGICAS DE LINHAGENS DE <i>Pleurotus ostreatus</i> CULTIVADAS EM DIFERENTES SUBSTRATOS COM OU SEM SUPLEMENTAÇÃO</b>	80
<b>INTRODUÇÃO</b>	80
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	83
<b>RESULTADO E DISCUSSÃO</b>	97
<b>CONCLUSÃO</b>	110
<b>REFERÊNCIAS</b>	111
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	114
<b>APÊNDICE - A</b>	115



## Lista de tabelas

### REVISÃO DE LITERATURA

Tabela 1	Umidade (%), carbono (%), nitrogênio (%) e relação C/N de diversos materiais para o substrato de cultivo.	8
Tabela 2	Composição de basidioma de <i>Lentinula edodes</i> e <i>Auricularia polytricha</i> em função do substrato de cultivo.	11
<b>Capítulo 1</b>	<b>CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE LINHAGENS COMERCIAIS DE <i>Pleurotus ostreatus</i> PELA TÉCNICA RAPD</b>	
Tabela 1	Linhagens de <i>Pleurotus ostreatus</i> utilizadas nos experimentos.	24
<b>Capítulo 2</b>	<b>CRESCIMENTO MICELIAL DE LINHAGENS DE <i>Pleurotus ostreatus</i> (Jacq) P. Kumm EM MEIOS DE CULTURA À BASE DE SUBSTRATO DE GRAMÍNEAS</b>	
Tabela 1	Formulação dos substratos utilizados na elaboração dos meios de cultura.	37
Tabela 2	Comparação estatística do parâmetro alfa do modelo de regressão não linear <sup>1</sup> , referente à cinética de crescimento micelial de <i>Pleurotus ostreatus</i> , segundo meio de cultura e linhagem (teste não paramétrico de Student-Newman-Kills).	40
Tabela 3	Comparação estatística do parâmetro beta do modelo de regressão não linear <sup>1</sup> , referente à cinética de crescimento micelial de <i>Pleurotus ostreatus</i> , segundo meio de cultura e linhagem (teste não paramétrico de Student-Newman-Kills).	40
Tabela 4	Comparação estatística do parâmetro gama do modelo de regressão não linear <sup>1</sup> , referente à cinética de crescimento micelial de <i>Pleurotus ostreatus</i> , segundo meio de cultura e linhagem (teste não paramétrico de Student-Newman-Kills).	41
Tabela 5	Comparação estatística do parâmetro alfa do modelo de regressão não linear <sup>1</sup> , referente à cinética de crescimento micelial de <i>Pleurotus ostreatus</i> , segundo meio de cultura e linhagem. (pelo teste não paramétrico de Student-Newman-Kills).	41
Tabela 6	Comparação estatística do parâmetro beta do modelo de regressão não linear <sup>1</sup> , referente à cinética de crescimento micelial de <i>Pleurotus</i>	

	<i>ostreatus</i> , segundo meio de cultura e linhagem (teste não paramétrico de Student-Newman-Kills).	42
Tabela 7	Comparação estatística do parâmetro gama do modelo de regressão não linear <sup>1</sup> , referente à cinética de crescimento micelial de <i>Pleurotus ostreatus</i> , segundo meio de cultura e linhagem (teste não paramétrico de Student-Newman-Kills).	42
<b>Capítulo 3</b>	<b>CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E FISÍCA DO SUBSTRATO DURANTE A COMPOSTAGEM NAS FASES I E II</b>	
Tabela 1	Teores de umidade (%), nitrogênio (%), carbono (%) e relação C/N dos materiais utilizados nos substratos.	53
Tabela 2	Formulações (base seca) dos substratos utilizadas no cultivo de <i>Pleurotus ostreatus</i> .	53
Tabela 3	Procedimentos adotados na Fase I de compostagem.	54
Tabela 4	Perda de massa fresca (%) dos diferentes substratos no período entre o final da Fase I e II de compostagem (média de dez análises).	64
Tabela 5	Índice pH dos substratos ao final das Fases I e II de compostagem.	67
Tabela 6	Valores de F obtido na análise de variância para as variáveis fibra total, proteína total, celulose, hemicelulose e lignina dos diferentes substratos nos dois níveis de relação C/N ao final das Fases I e II de compostagem.	67
Tabela 7	Teor de fibra total dos substratos ao final das Fases I e II de compostagem.	69
Tabela 8	Teor de proteína total dos substratos ao final das Fases I e II de compostagem.	70
Tabela 9	Teor de celulose dos substratos com relação C/N de 60:1 e 90:1 ao final das Fases I e II de compostagem.	71
Tabela 10	Teor de hemicelulose dos substratos (relação C/N de 60:1 e 90:1) ao final das Fases I e II de compostagem.	73
Tabela 11	Teor de lignina dos substratos (relação C/N de 60 e 90:1) ao final das Fases I e II de compostagem.	74

<b>Capítulo 4</b>	<b>PRODUÇÃO E CARACTERÍSTICAS BROMATOLÓGICAS DE LINHAGENS DE <i>Pleurotus ostreatus</i> CULTIVADAS EM DIFERENTES SUBSTRATOS COM OU SEM SUPLEMENTAÇÃO</b>	
Tabela 1	Período de incubação das linhagens de <i>Pleurotus ostreatus</i> nos diferentes substratos e relações C/N.	98
Tabela 2	Produtividade (%), das linhagens de <i>Pleurotus ostreatus</i> nos substratos suplementados (C/N 60:1) e não suplementados (C/N 90:1).	100
Tabela 3	Eficiência biológica (%), das linhagens de <i>Pleurotus ostreatus</i> cultivados nos substratos suplementados (C/N 60:1) e não suplementados (C/N 90:1).	101
Tabela 4	Massa média dos cachos (g), de <i>Pleurotus ostreatus</i> cultivados nos substratos suplementados (C/N 60:1) e não suplementados (C/N 90:1).	103
Tabela 5	Numero de cachos de <i>Pleurotus ostreatus</i> cultivados nos substratos suplementados (C/N 60:1) e não suplementados (C/N 90:1).	104
Tabela 6	Valores de F obtidos na análise de variância da fibra total, proteína total e extrato etéreo das linhagens de <i>Pleurotus ostreatus</i> cultivados nos diferentes substratos com ou sem suplementação.	105
Tabela 7	Teor de Proteína total (% base seca) nos basidiomas das linhagens de <i>Pleurotus ostreatus</i> cultivadas nos diferentes substratos com suplementação (C/N 60:1) e sem suplementação (C/N 90:1).	106
Tabela 8	Teor de fibra total (% base seca) dos basidiomas das linhagens de <i>Pleurotus ostreatus</i> cultivadas nos diferentes substratos com suplementação (C/N 60:1) e sem suplementação (C/N 90:1).	107
Tabela 9	Extrato etéreo (% base seca) dos basidiomas das linhagens de <i>Pleurotus ostreatus</i> cultivadas nos diferentes substratos com suplementação (C/N 60:1) e sem suplementação (C/N 90:1).	109

### Lista de figuras

<b>Capítulo 1</b>	<b>CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE LINHAGENS COMERCIAIS DE <i>Pleurotus ostreatus</i> PELA TÉCNICA RAPD</b>	
Figura 1	Procedimento de isolamento das linhagens de <i>Pleurotus ostreatus</i> , dentro de câmara de fluxo laminar.	25
Figura 2	Produtos da amplificação das linhagens de <i>Pleurotus ostreatus</i> com os oligonucleotídeos MAP 10 e MAP 17.	27
Figura 3	Dendograma baseado no método UPGMA, de acordo com os perfis de amplificação gerados com os oligonucleotídeos MAP 10 e MAP 17 para as linhagens de <i>Pleurotus ostreatus</i> .	28
<b>Capítulo 2</b>	<b>CRESCIMENTO MICELIAL DE LINHAGENS DE <i>PLEUROTUS OSTREATUS</i> (Jacq) P. Kumm EM MEIOS DE CULTURA À BASE DE SUBSTRATOS DE GRAMÍNEAS</b>	
Figura 1	Velocidade de crescimento micelial estimada para as linhagens de <i>Pleurotus ostreatus</i> POS 98/38, POS 09/100, POS 09/101 e POS 09/102.	44
<b>Capítulo 3</b>	<b>CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E FÍSICA DO SUBSTRATO DURANTE A COMPOSTAGEM NAS FASES I E II</b>	
Figura 1	Compostagem Fase I: A. montagem e umedecimento das leiras; B. registro da temperatura; C, D. revirada da meda e liberação de vapor resultante de termogênese; E, F. acomodação do composto em caixas plásticas treliçadas.	54
Figura 2	Compostagem Fase II: A. disposição das caixas dentro da câmara Dalsem; B. sensor de temperatura no centro do substrato; C. painel de controle da pasteurização (59,5°C, 8 horas); D. painel de controle do condicionamento (46,5°C, 4 dias).	55
Figura 3	Dinâmica da umidade dos substrato ao final das Fases I e II e final do cultivo.	60
Figura 4	Temperatura das leiras durante a Fase I de compostagem.	62
Figura 5	Dinâmica da relação C/N dos substratos, desde a montagem das leiras até o final da Fase II de compostagem.	65

**Capítulo 4      PRODUÇÃO E CARACTERÍSTICAS BROMATOLÓGICAS DE  
LINHAGENS DE *Pleurotus ostreatus* CULTIVADAS EM  
DIFERENTES SUBSTRATOS COM OU SEM  
SUPLEMENTAÇÃO.**

Figura 1	Procedimentos para produção de matriz terciária.	85
Figura 2	Produção de inóculo.	87
Figura 3	Inoculação do substrato.	89
Figura 4	Incubação dos blocos de substrato.	90
Figura 5	Estufa de produção: A. vista externa; B vista interna.	91
Figura 6	Cachos de basidiomas com píleos parcialmente abertos.	92

## RESUMO

O cultivo de cogumelos comestíveis e medicinais pode ser realizado em diversos substratos lignocelulósicos em sistema axênico e pasteurizado. O gênero *Pleurotus* é conhecido principalmente pela espécie *Pleurotus ostreatus* conhecido popularmente como cogumelo ostra, shimeji ou hiratake. Neste trabalho, investigou-se a variabilidade genética de quatro linhagens de *Pleurotus ostreatus* pela técnica RAPD, o crescimento micelial em meio de cultura sólido, parâmetros da compostagem (umidade do substrato, dinâmica da relação C/N, pH, perda de massa fresca, celulose, hemicelulose, lignina, proteína total e fibra total), produtividade, eficiência biológica e qualidade nutricional dos basidiomas (proteína total, fibra total e extrato etéreo) cultivados nos diferentes substratos em duas relações C/N. As linhagens de *P. ostreatus* foram coletadas de produtores do Estado de São Paulo e os materiais utilizados para a elaboração dos substratos de cultivo foram: capim braquiária, capim tobiatã, capim brizantha, palha de cana-de-açúcar, palha de trigo, bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo. No primeiro experimento foi avaliado a variabilidade genética pela técnica RAPD das quatro linhagens de *P. ostreatus* coletadas de produtores do Estado de São Paulo. Assim foram divididos em dois grupos distintos, o primeiro grupo com as linhagens POS 09/100, POS 09/101 e POS 09/102 e o segundo grupo com a linhagem POS 98/38. Sendo que dentro do primeiro grupo as linhagens POS 09/100 e POS 09/101 apresentaram similaridade de 93%, ainda dentro deste grupo a linhagem POS 09/102 mostrou similaridade de 69% em relação as

duas linhagem citadas anteriormente. Já no grupo 2 a linhagem POS 98/38 apresentou similaridade de 36% em relação ao grupo 1. No segundo experimento foi avaliado o crescimento micelial em meios de cultura a base de substratos coletados ao final da fase II de compostagem. Usou-se a pontuação em períodos de tempos definidos (24 horas) para determinar o crescimento da colônia e o método não paramétrico de Student-Newman-Kills para a transformação dos valores em curvas de crescimento. As maiores velocidades de crescimento foram obtidas nos substratos a base de palha de cana-de-açúcar, capim brizantha e capim tobiatã independentemente da linhagem utilizada. A dinâmica da compostagem foi estudada avaliando-se a umidade, relação C/N, pH, perda de massa, proteína total, fibra total, teor de celulose, hemicelulose e lignina. A umidade dos substratos ao final das fase I e II de compostagem é um fator que pode ser corrigido com sucesso aplicando-se um manejo correto fato evidenciado nesta etapa deste experimento. A relação C/N do substrato é influenciada pela composição inicial dos substrato principalmente quando utiliza-se suplementos nitrogenado como foi o caso deste experimento que utilizou-se farelo de trigo. O estreitamento ou diminuição da relação C/N foi mais acentuada nos substratos suplementados assim como a perda de massa onde observou-se uma redução 16,5% de massa fresca ao final da Fase II de compostagem. A proteína total dos substratos foi maior ao final da Fase II de compostagem para os substratos com relação C/N de 60:1 (suplementados). A fibra total foi influenciada pela suplementação, onde os substratos mais pobres apresentaram menor teor de fibra total assim como o teor de lignina. Para a celulose e hemicelulose, não houve diferenças significativas em relação a suplementação e sim sobre o tipo de material utilizado. A produtividade média foi maior para a linhagem de POS 09/101 nos substratos suplementados, e menor com a linhagem POS 98/38 nos substratos sem suplementação, 33,50 e 1,2%, respectivamente. A eficiência biológica apresentou diferenças significativas em função da linhagem utilizada de *P. ostreatus*, obtendo-se a maior média com a linhagem POS 09/101 (substratos suplementados) e a menor com a linhagem POS 98/38 (substratos não suplementados), 145,9 e 4,3%, respectivamente. O número de cachos teve diferenças significativas em relação as linhagens de *P. ostreatus* utilizadas assim como o tipo de material utilizado e o nível de relação C/N. A proteína total dos basidiomas foi influenciada pela linhagens de *P. ostreatus* e pela relação C/N sendo que a linhagem POS 98/38 teve o maior

teor de proteína total nos substratos suplementados e a linhagem POS 09/101 cultivada nos substratos sem suplementação o menor valor, com 30,59 e 19,99%, respectivamente. Os maiores teores de fibra total dos basidiomas foram obtidos com a linhagem POS 09/101. Para o extrato etéreo os valores obtidos neste experimento não apresentaram diferenças significativas pelo teste de Tukey ao nível de 5 %. A variabilidade genética foi constatada nas linhagens comerciais mesmo quando estas tem o mesma origem; O crescimento micelial em meio de cultura sólido pode ser uma indicação para a escolha do material segundo resultados sugeridos neste experimento e na literatura; A dinâmica da compostagem e seus parâmetros envolvidos podem ajudar a estabelecer um protocolo para as Fases I e II resultando em um substrato seletivo para o cultivo de *P. ostreatus*. Estes parâmetros devem ser acompanhados e analisados visto que com a mudança do material base de modo geral estes parâmetros serão alterados durante o processo; O tipo de material e a suplementação mostrou diferenças estatísticas entre alguns tratamentos deste experimento possibilitando estudos futuros afim de estabelecer correlações entre composição do substrato e produtividade e composição dos basidiomas de *P. ostreatus*.

---

**Palavras-chave:** Substrato, suplementação de farelo de trigo, produtividade, Capins e palha, *Pleurotus ostreatus*, pasteurização.



POTENTIAL OF PASTEURIZED SUBSTRATE BASED ON GRASSES TO CULTIVATION OF MUSHROOM *Pleurotus ostreatus* (Jacq) P. Kumm. Botucatu, 2011. 117 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia A/C Energia na Agricultura) – Faculdade de Ciências agronômicas, Universidade Estadual Paulista.

Author: FABRÍCIO ROCHA VIEIRA

Adviser: MARLI TEIXEIRA DE ALMEIDA MINHONI

#### **ABSTRACT**

The cultivation of edible and medicinal mushrooms can be accomplished on various lignocellulosic substrates in system axenic or pasteurized. The *Pleurotus* genus is mainly known by the species as *Pleurotus ostreatus* popularly known oyster mushroom, shimeji or hiratake. In this study, we investigated the genetic variability of four strains of *Pleurotus ostreatus* by RAPD, the mycelial growth on solid medium, composting parameters (substrate moisture, dynamics of C/N ratio, pH, weight loss, cellulose, hemicellulose, lignin, total protein and total fiber), productivity and nutritional quality of mushrooms (total protein, total fiber and lipids) grown on different substrates in two C/N ratio. The strains of *P. ostreatus* were collected from producers of São Paulo State and the materials used for the preparation of substrates were: brachiaria grass, tobiatã grass, brizantha grass, sugar cane straw, wheat straw,

sugar cane bagasse and wheat bran. In the first experiment evaluated the genetic variability by RAPD of four strains of *P. ostreatus* collected from producers of São Paulo State. So were divided into two distinct groups: the first group with the strains POS 09/100, POS 09/101 and 09/102 and the second group with the strain POS 98/38. Since the first group within the strains POS 09/100 and POS 09/101 showed similarity of 69% over the two aforementioned strains. In second group the strain POS 98/38 showed similarity of 36% compared to with the first group. In the second experiment evaluated the mycelial growth in culture media based on the substrate collected at the end of Phase II composting. Was used the punctuation in defined time periods (24 hours) to determine colony growth and non-parametric method of Student-Newman-Kills for transforming the values in growth curves higher growth rates were obtained on substrates composed of straw of sugar cane, brizantha grass and tobiatã grass regardless of the strain used. The dynamics of composting was studied by assessing the moisture, C/N ratio, pH, weight loss, total protein, total fiber, content of cellulose, hemicellulose and lignin. The moisture of the substrates at the end of Phase I and II composting is a factor that can be successfully corrected by applying a correct management as evidenced in this stage of the experiment. The C/N ratio of the substrate is influenced by the initial composition of substrate is used particularly when supplementation nitrogen as in the case of this experiment was used wheat bran. The narrowing or reduction of the C/N ratio was more pronounced in the substrate supplemented as where the weight loss which showed a 16,5% reduction of weight at the end of Phase II composting. The total protein of the substrate was higher at the end of Phase II of composting to substrates with C/N ratio of 60:1 (supplemented). The total fiber was influenced by supplementation, where the poorest substrate had lower fiber content as well as the lignin content. For cellulose and hemicellulose, no significant differences in relation to supplementation, but on the type of material used. The average yield was higher for the strain POS 09/101 on substrates supplemented and with the strain and less POS 98/38 on the substrates without supplementation, 23.86 and 2.0%, respectively. The biological efficiency showed significant differences depending on the strain used in *P. ostreatus*, obtaining the highest average with strain POS 09/101 (supplemented substrates) and less with the strain POS 98/38 (non-supplemented substrates), 145.9 and 4.3%, respectively. The number of clusters had significant differences from the strains of *P. ostreatus* used and the type of material used

and the level of C/N ratio. The total protein was influenced by the mushroom strains of *P. ostreatus* and C/N ratio being that the strain POS 98/38 had the highest total protein content in substrates supplemented and strain POS 09/101 on substrate without supplementation the lowest value, with 30.59 and 19.99%, respectively. The highest levels of total fiber of mushroom were obtained with the strain POS 09/101. To the ether extract values obtained in this experiment were not significantly different by Tukey test at 5%. The genetic variability was observed in commercial strains even when they have the same origin; Mycelial growth on solid medium can be an indication for the choice of material according to the results suggested in this experiment and literature; Dynamics of composting and its parameters involved may help to establish a protocol for Phases I and II, resulting in a selective substrate for growing *P. ostreatus*. These parameters should be monitored and analyzed since the change of the base material in general these parameters are changed during the process, the type of material and supplementation showed statistical differences between some treatments of this experiment possible future studies in order to establish correlations between composition and substrate composition and productivity of the mushroom *P. ostreatus*.

---

**Keywords:** substrate, supplementation of wheat bran, productivity, grasses and straw, *Pleurotus ostreatus*, pasteurization.

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

O cultivo e consumo dos cogumelos do gênero *Pleurotus*, especialmente o *Pleurotus ostreatus*, sempre estiveram em patamar inferior ao das espécies mais competitivas do mercado no ocidente, como o *Agaricus bisporus* e o *Lentinula edodes*. Contudo, atualmente, o cultivo e consumo de cogumelos deste gênero têm aumentado de modo acentuado em função de vários fatores como a comercialização garantida, a adaptação elevada do fungo as variações de clima brasileiro, a disponibilidade de vários tipos de insumos para a formulação de substratos, bem como a facilidade de cultivo e o baixo custo deste.

Dentre os cultivadores, uma minoria desenvolve todas as fases do cultivo, disponibilizando ou não substrato pronto para outros cultivadores. Outra minoria atua especialmente no preparo e inoculação de substratos, disponibilizando-os para a maioria dos produtores. As duas minorias de produtores dominam o mercado de produção de substratos, determinando o preço dos mesmos a valores que elevam o custo de produção da maioria dos produtores, geralmente em sistema de agricultura familiar. Além das dificuldades em relação ao preço e à oferta de substrato, existem problemas relacionados ao transporte deste.

Várias empresas ou cooperativas têm comercializado o inóculo (semente ou Spawn) de *P. ostreatus* ou o próprio substrato colonizado. No entanto, pouco se sabe a respeito da origem e da variabilidade genética dos isolados utilizados para na produção comercial de cogumelos dessa espécie.

A escolha de linhagens mais adaptadas a um determinado tipo de substrato é outro fator de fundamental importância para se obter sucesso no cultivo de *Pleurotus spp.*, pois estes podem diferir quanto à velocidade de crescimento micelial, à temperatura e a umidades ótimas de incubação e de frutificação, à resistência a fungos contaminantes, ao tamanho e forma dos basidiomas e a produtividade (BERNARDI, 2007; MARINO et al., 2008; CARVALHO et al., 2010).

No Brasil, o gênero *Pleurotus* também está conquistando espaço no mercado nacional por seu atrativo gastronômico (sabor) e também, devido a sua rusticidade e eficiência biológica elevada, adaptando-se bem à condição brasileira de clima tropical (COLAUTO et al., 1998).

A grande demanda e a qualidade dos alimentos têm sido motivos de varias pesquisas, nas mais diversas áreas. Uma delas tem sido o desenvolvimento de técnicas para o cultivo de cogumelos, na área agroindustrial, que visa à redução dos custos de produção, preço ao consumidor e aumento do consumo mundial. Segundo Furlani e Godoy (2007) pouco se sabe a respeito da qualidade dos cogumelos comestíveis cultivados no Brasil, especialmente com respeito ao valor nutricional. Mesmo na literatura internacional, os dados encontrados são escassos e referem-se a cogumelos cultivados em condições distintas das encontradas no Brasil.

No presente trabalho, foi avaliada a variabilidade genética existente entre quatro linhagens comerciais de *P. ostreatus* coletadas no estado de São Paulo, sendo caracterizadas pelo método RAPD. Verificou-se também o comportamento em termos de crescimento micelial e de fatores de produção (produtividade, eficiência biológica, numero de cachos e massa média dos cachos) em substratos pasteurizados formulados com bagaço de cana-de-açúcar mais capins ou palhas diversas, com ou sem suplementação nitrogenada além da composição de fibra bruta, proteína bruta e extrato etéreo dos basidiomas.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2. 1. Cogumelos comestíveis e o gênero *Pleurotus*

Os fungos incluindo os cogumelos comestíveis possuem a habilidade para utilização de substâncias orgânicas, utilizando-se de diversos substratos. As fontes de carbono como polissacarídeos, lignina, glicose, manose, frutose, óleos e ácidos orgânicos fornecem energia para a atividade metabólica dos fungos e constituem a base para a síntese de proteínas e substâncias de reserva (SINGER; HARRIS, 1987; ZANETTI; RANAL, 1997; SILVA et al., 2007). Tendo como papel a reciclagem e a transformação da matéria orgânica em compostos mais simples sendo os cogumelos comestíveis o grupo de fungos com grande importância biotecnológica.

No Brasil, todos os cogumelos cultivados comercialmente são saprófitas, da classe dos Basidiomycetes: champignon-de-Paris (*Agaricus bisporus*), shiitake (*Lentinula edodes*), shimeji ou hiratake (*Pleurotus ostreatus*) e cogumelo-do-sol (*Agaricus blazei*).

O cultivo de cogumelos tem longa tradição no sudoeste asiático, datando de 600 a.C. com *Auricularia auricula* (orelha-de-pau), enquanto que o cogumelo *A. bisporus* é cultivado comercialmente na França desde o século XVII (KUES; LIU, 2000). Este último é o cogumelo mais popular em todo ocidente, sendo cultivado em muitos países e com maior mercado consumidor (SUBRAMANIAN, 1995).

A produção do cogumelo é o ápice do ciclo vital destas espécies; também denominado de fruto, corpo de frutificação, carpóforo, basidiocarpo e basidioma. Na maturação dos cogumelos, o píleo se abre, as lamelas são expostas e ocorre a disseminação dos esporos. Estes são sexuais, haplóides, resultando do processo de divisão meiótica dentro do basidioma. Os esporos germinados dão origem às hifas, que formam o micélio primário; a união de micélios primários compatíveis gera um micélio dicariótico ou micélio secundário, responsável pela formação dos primórdios, que darão origem aos cogumelos (CHANG; MILES, 1984; BONONI; TRUFEM, 1986; RAJARATHNAM, 1987).

Cogumelos do gênero *Pleurotus* ocorrem naturalmente nas matas brasileiras, sobre madeira em decomposição (MAZIERO et al., 1992; WISBECK, 2003; BONATTI et al., 2004).

O gênero *Pleurotus* representa um grupo com elevado potencial biotecnológico dentro da classe dos basidiomicetos, especialmente em áreas tropicais e subtropicais, sendo utilizado como alimento funcional, na síntese de compostos bioquímicos, na biorremediação e na produção de etanol derivado de madeira (MODA, 2008). O cogumelo *P. ostreatus* é considerado a espécie chave deste gênero, também chamado de cogumelo gigante, caetetuba, hiratake, shimeji e cogumelo ostra.

Os cogumelos do gênero *Pleurotus* apresentam muitas vantagens de cultivo como; facilidade de manejo e produção, ocupam pouco tempo e espaço físico, utilização de matérias-primas como palhas, capins, entre outros abundantes e baratas, não requer climatização em algumas situações, podendo ser cultivado em muitas regiões do Brasil, apresenta elevada rusticidade, crescimento rápido e investimento relativamente baixo quando comparado com outras espécies de cogumelos (RAJARATHNAM, 1992; FERREIRA, 1998; POPPE, 2000).

## **2. 2. Métodos de produção de cogumelos**

O cogumelo comestível *P. ostreatus* é cultivado no Brasil principalmente através do uso da compostagem dos materiais utilizados na produção do substrato e sua posterior pasteurização e condicionamento sob vapor fluente. Neste processo pode ser utilizado diversos materiais agroindustriais, como bagaço de cana-de-açúcar, palha

de trigo, palha de arroz, capim braquiária, capim gordura, folha de bananeira entre outros. A compostagem do material é realizada dentro de período variado, dependendo do grau de tecnologia da propriedade e conhecimento técnico do produtor. Geralmente a compostagem tem duração entre 9 a 20 dias onde o material é disposto em pilhas também chamadas de “medas de compostagem” sendo acrescentados ao material lignocelulósico materiais ricos em nitrogênio podendo ser orgânico ou mineral garantindo uma porcentagem extra de nitrogênio e consequentemente teor elevado de proteína. O composto é acrescido também de corretivos para ajuste do pH como calcário calcítico entre outros. A umidade do material ao final da Fase I (compostagem em pilhas) deve manter-se em torno de 70%, sendo que durante o processo desta Fase faz-se a revirada do material em intervalos não maior que 4 dias afim de garantir homogeneidade do material, umedecimento e fornecimento de oxigênio. Durante a Fase I ocorre o desenvolvimento de microrganismos que iniciam a degradação do material, disponibilizando nutrientes para o cultivo do cogumelo. Finalizada a compostagem, é feita a pasteurização deste composto, também chamada de Fase II, com o objetivo de eliminar a população de microrganismos competidores. Após a pasteurização ainda dentro da Fase II inicia-se o condicionamento do composto afim de permitir a assimilação da amônia livre por microrganismos termofílos que servirão de alimento para o fungo cultivado. Normalmente, a pasteurização é realizada em túneis com entrada de vapor injetado, onde o substrato permanece por 2 a 8 dias sob temperaturas de pasteurização em torno de 55 a 80 °C com posterior condicionamento com temperaturas entre 45 a 55 °C.

Os materiais utilizados no preparo do substrato, assim como o tempo de compostagem e pasteurização apresentam variações conforme a literatura. Maziero et al. (1992) utilizaram bagaço de cana e farelo de arroz na produção de *P. ostreatus* var. “Flórida”; a compostagem foi realizada durante 48 horas e a pasteurização foi feita sob vapor fluente em túnel de pasteurização durante 24 horas a 59 °C, apresentando boa produtividade e baixa taxa de contaminação. Já Abe et al. (1992) utilizaram bagaço de cana suplementado com sulfato de amônia e superfosfato simples para a produção de *P. ostreatus* sob diferentes temperaturas de pasteurização. As temperaturas foram de 75 °C durante 48 horas e 82-84 °C durante 48 horas, sendo que o primeiro tratamento apresentou melhor resultado.



Muitas são as técnicas utilizadas para a produção de *P. ostreatus*, porém muitas são inviáveis em escala industrial, dificuldades apresentadas em função do tempo de preparo, material, custo, entre outros fatores.

Segundo Dias (2010) são varias as técnicas que possibilitam cultivar o cogumelo *P. ostreatus*, mas no entanto, a comunidade científica brasileira tem preferivelmente utilizado a esterilização em autoclave com algumas variações de tempo e temperatura, fato pode estar relacionado com a comodidade, visto que estes equipamentos são comuns na maioria dos laboratórios das Universidades facilitando sua aplicação.

### **2. 3. Substrato de cultivo**

Um dos fatores determinantes para o cultivo de cogumelos é a seleção de substratos para produção de cogumelos, onde materiais adequados, tanto biologicamente como economicamente, são essenciais para o sucesso do cultivo (TISDALE et al., 2006; DIAS, 2010).

Os cogumelos comestíveis são cultivados em uma grande variedade de resíduos agrícolas e são considerados grandes transformadores desses resíduos, representando a biotransformação mais eficiente de reciclagem (ZHANG et al., 2002).

A palha de trigo é o substrato tradicional para o cultivo de *P. ostreatus* e *Agaricus bisporus* na Europa, com excelentes produtividades. A palha de arroz também é um resíduo agrícola muito utilizado para a produção do cogumelo *P. ostreatus* assim como resíduos de industria cafeeira no México (BONONI et al., 1999; OEI, 2003). No Brasil, um dos principais resíduos utilizado como componente do substrato de cultivo deste tipo de cogumelo entre outros é o bagaço de cana-de-açúcar, porém, tem-se a necessidade de testar outros materiais, pois o bagaço de cana-de-açúcar muitas vezes não está em abundância em dada região, além da utilização deste resíduo para geração de energia térmica ou elétrica, a qual está num crescente nos últimos anos (DIAS et al., 2003).

No resíduo vegetal as principais fontes de carbono são polissacarídeos e a lignina. Outros compostos como lipídeos e proteínas também podem ser utilizados (YANG et al., 2002; MAZIERO, 1990). O carbono pode ser obtido de polissacarídeos, monossacarídeos, ácidos orgânicos, aminoácidos, álcoois, compostos

policíclicos, celulose, hemicelulose e lignina (CHANG; MILES, 1989). As fontes de carbono como polissacarídeos, lignina, glicose, manose, frutose, óleos e ácidos orgânicos são importantes fornecedores de energia para a atividade metabólica dos cogumelos e constituem a base para a síntese de proteínas e substâncias de reserva, resultando em aproximadamente 50% do peso da matéria seca dos corpos de frutificação em carbono (CHANG; MILES, 1989; ZANETTI; RANAL, 1997).

O nitrogênio faz parte de muitos compostos importantes, tais como: aminoácidos, proteínas, purinas, pirimidinas, algumas vitaminas, e a quitina, a qual é um dos polissacarídeos da parede celular de muitos fungos (CHANG; MILES, 1989).

Ainda dentro da condição de redução de custos de produção, os materiais para a formulação do substrato devem ser regionais. A composição nutricional destes deve ser previamente analisada em laboratórios específicos. O carbono e o nitrogênio são os elementos mais discutidos em termos de qualidade de compostos, sendo encontrados em concentrações deferentes nos diversos capins ou palhas disponíveis em nosso país. Em alguns casos, os substratos formulados com gramíneas dispensam a suplementação com fontes de nitrogênio, o que também reduz os custos de produção. A suplementação nitrogenada pode permitir uma pasteurização do substrato por termogênese e também, resultar em boas produtividades. Os processos de compostagem e de pasteurização de substratos para *P. ostreatus* não são muito comentados na literatura nacional.

A relação C/N está intimamente relacionada com as matérias-primas utilizadas no substrato (Bagaço de cana-de-açúcar, palhas de cereais, gramíneas, farelos de soja, trigo, milho, etc.). Na formulação do substrato é necessário uma adequação da relação C:N. Este procedimento é baseado em análise química prévia dos materiais e calculo das quantidades de cada um destes, de forma a obter a relação C:N adequada à da espécie de cogumelo em cultivo. Na tabela 1, é apresentada a relação C/N de alguns materiais usados no cultivo de cogumelos *Pleurotus* spp.

**Tabela 1.** Umidade (%), Carbono (%), nitrogênio (%) e relação C/N de diversos materiais para o substrato de cultivo.

Ingrediente	Umidade %	Carbono %	Nitrogênio %	C/N
Bagaço de cana-de-açúcar	35-75	48-54	0,3-0,5	96-190
Palha de Braquiária	10-20	50-52	0,5-1,0	50-104
Palha de Trigo	10-20	45	0,6	75
Palha de Arroz	10-20	45	0,6-0,7	64-75
Capim Coast-cross	10-20	41,8	0,91	45,93
Capim Colômbio	10-20	42,8	1,06	40,37
Farelo de Soja	10-13	45	7	6,42
Farelo de Arroz	10-13	46-48	2,23	20
Farelo de Trigo	10-13	50-52	2,96	1-17
Uréia	--	27	45	0,6
Sulfato de Amônio	--	0	22	--
Esterco de Cavalo	63	30	1,3	23
Esterco de Frango	40	28	1,5-4,0	7-18

Fonte: Adaptado Kopytowski Filho, 2006; Eira; Minhoni, 1997; Bononi, 1995.

Os cogumelos do gênero *Pleurotus* crescem bem em substratos mais pobres em nitrogênio, ao contrário dos cogumelos do gênero *Agaricus* que requerem substratos com relação C/N mais estreita. Comumente na prática são utilizados resíduos agrícolas e agroindustriais, com elevada relação C/N (entre 80 e 100:1) para o cultivo de *P. pulmonarius*, *P. ostreatus* var. "Florida" e *P. sajor-caju* em substrato natural compostado e pasteurizado e, relações C/N mais estreitas quando se visa o cultivo de Shimeji (uma linhagem de *P. ostreatus*) em cultivo axênico (cultivo em substrato e condições assépticas) (Eira; Minhoni, 1997).

Pedra e Marino (2006), utilizando como substrato de cultivo serragem de casca do coco no cultivo de *P. sajor-caju*, obtiveram produtividade maior nos tratamentos suplementados com 40% farelo de trigo/arroz. Já Dias et al. (2003) trabalhando com palha de feijão, palha de milho e casca de café suplementados ou não com 10% de farelo de trigo no cultivo de *P. sajor-caju* verificaram, produtividade maior (87%, massa fresca de cogumelos / massa fresca de substrato) com a palha de feijão sem suplementação. Os autores explicam o resultado com base no elevado teor de nitrogênio deste material (1,46%). Silva (2007) relata que teores de nitrogênio acima de 1,5% inibe o crescimento miceliano da espécie *P. sajor-caju*.

Furlan et al. (2000), trabalhando com *P. sajor-caju* em palha de arroz, com suplementação (em dois níveis) de farelo de arroz, nitrato de amônia ou extrato de levedura, relatam que a suplementação, independentemente do tipo e do nível desta, incrementou a produção. A melhor produtividade (84,5%, massa fresca de cogumelos / massa fresca de substrato) foi obtida com suplementação de farelo de arroz; a maior eficiência biológica (9,8%, massa seca de cogumelos/massa seca de substrato) foi observada no substrato suplementado com nitrato de amônia; a perda de matéria orgânica mais elevada (66,2 %) foi apresentada pelo suplemento com extrato de levedura.

Os cogumelos comestíveis do gênero *Agaricus* e *Pleurotus* são cultivados no Brasil principalmente com uso de palhas e capins compostados e pasteurizados sobre vapor fluente.

Estes processos podem ser usados com diversos tipos de resíduos agroindustriais, como bagaço da cana-de-açúcar, palha de arroz, palha de milho, palha de feijão, entre outros. A suplementação com fontes orgânicas de N como farelos de trigo, arroz, soja entre outros e/ou fontes inorgânicas como uréia e nitrato de amônia, depende da composição dos materiais utilizados para a formação do substrato.

Colauto et al. (1998) trabalharam com mistura de bagaço de cana e palha de feijão na produção de *P. sajor-caju*. A compostagem foi realizada durante 15 dias, com reviradas da meda a cada 5 dias e umidade a 75 %. A pasteurização foi realizada com vapor fluente a 75° C, durante 4 horas. A produção foi de 113g cogumelo fresco por quilo de substrato fresco (produtividade 11,3 %).

Silva et al. (2007), utilizando mistura de bagaço de cana-de-açúcar, capim coast cross, farelo de trigo (10 e 20% em relação ao peso úmido substrato) e uréia (0,65, 0,85, 1,30, 1,75 e 2,20% em relação ao peso seco do substrato), citam que a produtividade não diferiu entre os tratamentos, e que para os dois maiores níveis de N não houve sequer colonização do substrato. Motos (1989) relata que, em substrato à base de bagaço de cana-de-açúcar hidrolisado sem adição de N, ocorreu inibição do crescimento de *Pleurotus ostreatus*. O mesmo acontece quando a adição de diferentes fontes de nitrogênio resulta em teores iguais ou superiores a 1,5% de N, com base na matéria seca, segundo o autor.

Apesar da maioria dos produtores utilizarem a compostagem e pasteurização para a produção de *Pleurotus* sp., outros processos têm sido avaliados em

trabalhos de pesquisa. Os mais utilizados são a pasteurização do substrato em água quente (80-100 °C) e a esterilização em autoclaves.

Macaya-Lizano (1988) trabalhou com a mistura palha de arroz (60%), cedro amargo (20%) e resíduo do beneficiamento do arroz (20%) com suplementação com cama de frango ou farinha de algodão em diferentes proporções, os substratos foram autoclavados a 56,8 kg de pressão por 20 segundos, com os melhores resultados obtidos com o substrato sem suplementação.

Zanetti e Ranal, (1997) trabalharam com a mistura de casca de algodão, resíduo de bainha de folhas de guariroba (*Syagrus oleracea*), resíduos da industrialização do milho doce e bagaço da cana triturado, os materiais foram autoclavados a 1 atm durante um período de 30 minutos para a produção de *P.ostreatus*. A eficiência biológica e produtividade variaram em função da mistura do substrato.

*Pleurotus* sp. foi produzido em diversos tipos de materiais, como palha de arroz, palha de trigo, palha de milho, bagaço de cana e resíduo de papel, através do processo de pasteurização do substrato em água quente. Os materiais foram triturados, misturados em diferentes proporções e mergulhado em água a temperatura ambiente por 12 horas para promover a hidratação do substrato. Em seguida foram imersos em água quente (100 °C) durante um período de 2,5 horas (BAHUKHANDI; MUNJAL, 1989).

#### **2. 4. Substrato à base de capim**

Originalmente, o cultivo era feito em toras e serragens de espécies arbóreas (*Pinus* spp., *Eucalyptus* spp. entre outras). Este tipo de substrato foi gradativamente substituído por gramíneas diversas, por razões de ordem ecológica e preservação das espécies nativas ou não. Somam-se a isto, o fato de a conversão de energia solar em espécies de gramíneas ser 6 a 8 vezes maior que a de espécies de arbóreas utilizadas no cultivo tradicional, além da facilidade de adaptação em todo o território nacional. Os fungos cultivados em gramíneas têm maior produtividade que os cultivados em serragem podendo ser 30% superior. A qualidade nutricional dos basidiomas é igual ou maior (Tabela 2) (ZHANXI; ZHANHUA, 2002).

**Tabela 2.** Composição de basidiomas de *Lentinula edodes* e *Auricularia polytricha* em função do substrato de cultivo.

Composição	----- <i>Lentinula edodes</i> -----			---- <i>Auricularia polytricha</i> ---		
	Capim	Serragem	Tora	Capim	Serragem	Tora
	----- % -----					
Proteína	32,83	28,787	19,65	8,12	7,99	7,376
Fibra	20,4	17,12	29,81	27,75	19,61	39,8
Gordura	2,31	2,61	1,71	1,4	0,8	1,2
Cinza	9,42	8,02	9,55	9,55	9,62	9,71
N	5,25	4,606	3,145	1,314	1,28	1,18
P	0,965	0,855	0,378	0,228	0,195	0,19
K	1,944	1,447	1,372	1,066	0,829	0,696
Ca	0,013	0,033	0,023	0,108	0,099	0,249
Mg	0,143	0,132	0,137	0,148	0,133	0,136
	----- mg kg <sup>-1</sup> -----					
Cu	15,79	7,1	9,45	2,84	6,72	2,37
Zn	119,57	74,66	133,2	36,01	39,99	56,96
Mn	26,88	13,45	16,25	19,43	26,84	26,52
Fe	101,95	75,12	78,6	98,05	136,37	248,6

Fonte: Zhanxi; Zhanhua (2002).

O Brasil possui grandes quantidades de diversas espécies vegetais da família das gramíneas (*Poaceae*), devido à sua grande extensão territorial, clima tropical favorável e adaptabilidade elevada destas espécies. Estas plantas são utilizadas como alimento para animais e também, no caso da cana-de-açúcar, como fonte de açúcar e/ou de energia. Neste último caso, gerando quantidade elevada de resíduos.

As gramíneas utilizadas em pastagens são substratos potenciais e de qualidade elevada para o cultivo de cogumelos. Mas, há uma carência de pesquisas para o aprimoramento do uso destas nos cultivo. Há necessidade de se comparar a resposta de várias linhagens do cogumelo em vários tipos de palhas e combinações destas, em termos de produtividade e qualidade de basidiomas obtidos. Condições de clima e de grau de tecnologia dos cultivos também devem fazer parte destes estudos. Conseqüentemente, no Brasil, as técnicas e os substratos para o cultivo deste cogumelo não estão totalmente definidos, principalmente pelos produtores, os quais ainda trabalham à base de conhecimentos trazidos por imigrantes asiáticos e europeus.

A substituição de substratos tradicionais, à base de madeira (toras e serragem), por capins, palhas de cereais e outros resíduos agrícolas, pode dispensar a

suplementação nitrogenada, além da redução no custo de produção. Uma investigação feita por Zhanxi e Zhanhua (2002) revelou que alguns capins podem substituir a serragem e parcialmente o farelo arroz no cultivo de *P. ostreatus*. Dias et al., (2003) relatam que a palha de feijão para o cultivo de *P. sajor-caju* dispensa suplementação nitrogenada. Além de produtividade elevada e fácil adaptação no Brasil, os conteúdos de proteínas, nitrogênio, gordura, fósforo, potássio e magnésio, em gramíneas, são maiores do que aqueles em serragem (LIN; LIN, 1995).

No Brasil, produtores de *Pleurotus* utilizam o capim braquiária (*Brachiaria decumbens*), coast-cross, palha de arroz, palha de trigo misturados com bagaço de cana-de-açúcar com ou sem suplementação nitrogenada na formação do substrato de cultivo. Segue-se uma compostagem curta (8-15 dias) e pasteurização com vapor fluente (60-85° C por 8-18 horas).

## **2. 5. Suplementação do substrato**

A capacidade de o fungo crescer e produzir cogumelos em substratos lignocelulósicos está relacionado com o vigor do micélio e com a capacidade de ativar mecanismos fisiológicos, necessários para utilizar os nutrientes do meio de cultura (MATA et al., 2001). Deste modo, as necessidades nutricionais para que o micélio cresça de forma satisfatória, nesta fase inicial do cultivo, pode ser otimizada face o tipo de material utilizado na suplementação do meio de cultivo.

A suplementação do substrato com uma fonte de nitrogênio é prática usual adotada pela maioria dos produtores. Esta pode ser orgânica, através da utilização de resíduos agroindustriais ricos em nitrogênio, ou minerais, com o uso de adubos nitrogenados solúveis ou parcialmente solúveis em água.

De acordo com Rossi et al. (2001), farelos de arroz, trigo e soja são fontes de nutrientes utilizadas como suplemento, pois estimulam o crescimento micelial de diversas espécies de cogumelos. Pedra & Marino (2006), utilizando serragem de casca do coco no cultivo de *Pleurotus sajor-caju*, obtiveram produtividade maior nos tratamentos suplementados com 40% farelo de trigo/arroz.

No Brasil, é comum a utilização do bagaço de cana-de-açúcar suplementado com farelo de trigo ou de arroz e carbonato de cálcio para a produção de *Pleurotus* sp.. A suplementação do bagaço de cana com 15% de palha de feijão guandú também foi avaliada, havendo aumento na produção e na eficiência biológica no cultivo de *Pleurotus ostreatus* var. "Florida" em relação ao bagaço sem suplementação (ZANETTI; RANAL, 1997). Bisaria et al. (1997) relatam ainda que a suplementação orgânica ou mineral pode ser utilizada somente em pequenas quantidades, pois o excesso de nitrogênio pode inibir a síntese das enzimas degradadoras, podendo decrescer a degradabilidade do substrato.

## 2. 6. Tratamento do substrato

O substrato de cultivo precisa ser tratado antes de ser inoculado com o fungo. O tratamento com calor é o mais usado para matar insetos e microrganismos competidores, existem duas categorias: esterilização e pasteurização. A esterilização é realizada a 121 ° C por período variado (em função do tamanho do bloco, tipo de material e etc.) elimina toda comunidade microbiana do substrato. Já pasteurização elimina somente uma parte dos microrganismos, pois, são temperaturas entre 60 e 100 °C por tempos variados.

O tratamento do substrato para o cultivo de *P. ostreatus* é muito discutido. O substrato de cultivo do cogumelo *P. ostreatus* pode ser esterilizado (cultivo axênico) e não esterilizado (pasteurizado). A esterilização, com o uso de autoclaves, é restrita a poucos produtores e com cultivo de *P. ostreatus* do tipo “shimeji preto”. A tecnologia e cuidados com assépcia nestes cultivos é maior e, conseqüentemente, os custos de produção também são maiores, porém o produto final tem melhor preço no mercado. Ademais, a oferta do produto é pequena e o custo do mesmo ao consumidor é elevado. Por outro lado, o substrato pasteurizado é o mais comum, em função da redução de custos de energia bem como da rusticidade do cultivo, característica da maioria dos produtores brasileiros. O uso da pasteurização viabiliza e reduz o custo de produção desta espécie de cogumelo.

Segundo Dias (2010) são muitas as técnicas que possibilitam o cultivo de *P. ostreatus*. A maioria dos produtores brasileiros utilizam a compostagem, pasteurização e condicionamento em massa para o cultivo de *P. ostreatus* do tipo “shimeji branco”, porém a comunidade científica brasileira tem direcionada as pesquisas para o sistema



de cultivo esterilizado. Segundo o mesmo autor é necessário aprofundamento na técnica de substrato pasteurizado.

O processo de compostagem está dividido em três fases: pré-umidecimento, Fase I (fermentação aeróbia) e Fase II (pasteurização e condicionamento) (STAMETS; CHILTON, 1983; VEDDER, 1996; MUEZ-ORORBIA; NUNEZ PARDO, 2001; LEÓN; LARA, 2003). No entanto, ambas as fases de compostagem são partes relacionadas do processo, mas, ao mesmo tempo diferentes em sua natureza e função sendo foco em varias pesquisas, na busca de mais controle, redução das emissões de odores e acelerar o período de compostagem (LABORDE et al, 1971; SMITH; SPENCER, 1976; GERRITS; VAN GRIENSVEN, 1990; STRAATSMA et al., 1995; STRAATSMA et al., 2000). Alguns parâmetros como matéria seca, relação C/N, degradação (lignina, celulose, hemicelulose e matéria orgânica) e pH os quais podem ser ajustados no início da Fase I, mas estes valores sofrerão alterações durante o processo de compostagem (Fase I) e pasteurização e condicionamento (Fase II), são muito estudados e de difícil descrição em função dos diferentes tipos de materiais utilizados e sistemas (WOOD; FERMOR, 1985; EIRA; MINHONI, 1997; STRAATSMA et al., 2000; SHARMA et al., 2000).

Os materiais utilizados no preparo do substrato, assim como o tempo de compostagem e pasteurização, têm variações conforme literatura.

## **2. 7. Características bromatológicas dos basidiomas de cogumelos comestíveis**

Informações a respeito da composição de alimentos tem se tornado cada vez mais importante para avaliar a sua qualidade. Para vitaminas, essas informações têm grande valor, uma vez que desempenham funções importantes no organismo humano e animal. Outros constituintes, como proteínas, lipídeos e fibras, também têm se tornado uma preocupação para profissionais das áreas de saúde e de alimentos além da procura pelo consumidor de alimentos naturais de boa qualidade (FURLANI; GODOY, 2007).

O processo biotecnológico de cultivo de cogumelos resulta em alimento de alto valor nutricional, o qual pode ser considerado uma boa fonte de proteína, fibra alimentar, baixo teor de gordura além de minerais entre outros compostos (SILVA et al.,

2002; MANZI et al., 2004; NGAI; NG, 2004). Outra vantagem é que contem mais proteína que a maioria dos vegetais e possui todos os aminoácidos essenciais (CHANG; MILES, 1989; YILDIZ et al., 2002). O teor de proteína bruta do cogumelo em base seca varia de 8,9 a 50% (BANO; RAJARATHNAM, 1982, MAZIERO, 1990).

Inúmeras variáveis determinam as diferenças observadas na composição química dos basidiomas, principalmente no conteúdo de proteínas, minerais e nos constituintes de aroma e sabor, entre elas citam-se a idade ou estágio de desenvolvimento do cogumelo, condições pós-colheita, a composição do substrato, bem como método de cultivo (CRISAN; SANDS, 1978; BANO; RAJARATHNAM, 1988).

Segundo Furlani e Godoy (2007) pouco sabe-se a respeito do valor nutricional dos cogumelos cultivados no Brasil. Isso pode estar relacionado com os inúmeros fatores que interferem na composição do cogumelos além de poucos trabalhos realizados na área de cogumelos.

### 3. REFERÊNCIAS

ABE, E.; EIRA, A. F.; MINHONI, M. T. A. Relações entre temperatura de pasteurização e contaminações do composto durante o cultivo de *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kummer. **Científica**, São Paulo, v. 20, n. 2, p. 423-433, 1992.

BAHUKHANDI, D.; MUNJAL, R. L. Cultivation of *Pleurotus* species on different agricultural residues. **Indian Phytopathology**, New Delhi, v. 42, p. 492-495, 1989.

BANO, Z.; RAJARATHNAM, S. *Pleurotus* mushroom. Part II. Chemical composition, preservation, and role and human food. **Critical Reviews in Food Science Nutrition**, Philadelphia, v. 27, n. 2, p. 87-158, 1988.

BANO, Z.; RAJARATHNAM, S. *Pleurotus* mushroom as a nutritional food. In: CHANG, S. T.; QUIMIO, T. H. (Ed.). **Tropical mushrooms**. Hong Kong: The Chinese University, 1982. p. 363-380.

BERNARDI, E. **Cultivo de *Pleurotus* spp. em substrato capimelefante (*Pennisetum purpureum* Schum) pasteurizado**. 2007. 81 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal)- Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2007.

BISARIA, R.; MADAN, M.; VASUDEVAN, P. Utilization of agro-residues as animal feed bioconversion. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 59, p. 5-8, 1997.

BONATTI, M. et al. Evaluation of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus sajor-caju* nutritional characteristics when cultivated in different lignocellulosic wastes. **Food Chemistry**, Oxford, v. 88, n. 3, p. 425-428, 2004.

BONONI, V. L. R.; TRUFEM, S. F. B. **Cogumelos comestíveis**. 3. ed. São Paulo: Ícone, 1986. 86 p.

- BONONI, V. L. R. et al. **Cultivo de cogumelos comestíveis**. São Paulo: Ícone, 1995. 206 p.
- BONONI, V. L. R. et al. **Cultivo de cogumelos comestíveis**. 2. ed. São Paulo: Ícone, 1999. 206 p.
- CARVALHO, C. S. M.; SALES-CAMPOS, C.; ANDRADE, M. C. N. Mushrooms of the *Pleurotus* genus: a review of cultivation techniques. **Interciência**, Caracas, v. 35, n. 3, p. 177-182, 2010.
- CHANG, S. T.; MILES, P. **Edible mushroom and their cultivation**. Florida: CRC Press, 1989. 345 p.
- CHANG, S. T.; MILES, P. G. A new look at cultivated mushrooms. **Bioscience**, Washington, DC, v. 34, n. 6, p. 358-362, 1984.
- COLAUTO, N. B.; EIRA, A. F.; MINHONI, M. T. A. Fatores físicos que afetam a produtividade do cogumelo comestível *Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Singer. **Científica**, São Paulo, v. 26, p. 25-43, 1998.
- CRISAN, E. V.; SANDS, A. Nutritional value. In: CHANG, S. T.; HAYES, W. A. (Ed.). **The biology and cultivation of edible mushrooms**. New York: Academic, 1978. p. 137-168.
- DIAS, E. S. Mushroom cultivation in Brazil: challenges and potential for growth. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 4, p. 795-803, 2010.
- DIAS, E. S. et al. Cultivo do cogumelo *Pleurotus sajor-caju* em diferentes resíduos agrícolas. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 6, p. 1363-1369, 2003.
- EIRA, A. F.; MINHONI, M. T. A. **Manual de cultivo do "hiratake" e "shimeji" (*Pleurotus* spp.)**. Botucatu: FEPAF, 1997. 97 p.
- FERREIRA, J. E. F. **Produção de cogumelos**. São Paulo: Agropecuária, 1998. 136 p.
- FURLAN, S. A. et al. Influência da suplementação de palha de arroz na produção de *Pleurotus sajor-caju*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 35, p. 1905-1910, 2000.
- FURLANI, R. P. Z.; GODOY, H. T. Valor nutricional de cogumelos comestíveis. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 1, p. 154-157, 2007.
- GERRITS, J. P. G.; VAN GRIENSVAN, L. J. L. D. New developments in indoor composting. **Mushroom Journal**, Stanford, v. 205, p. 21-29. 1990.
- KOPYTOWSKI FILHO, J. **Produtividade e eficiência biológica de *Agaricus blazei* (Murrill) Heinemann, em diferentes condições de cultivo**. 2006. 134 f. Tese (Doutorado em Agronomia/Energia na Agricultura)-Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2006.

KUES, U.; LIU, Y. Fruiting body production in basidiomycetes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Heidelberg, v. 54, n. 2, p. 141-152, 2000.

LABORDE, J. et al. La Préparation express des substrats pour la culture du champignon de couche. **Mushroom Science**, Leamington Spa, v. 8, p. 675-706, 1971.

LEÓN, V. T. C.; LARA, H. L. Factores que influyen en La producción de substratos selectivos para El cultivo de *Pleurotus ostreatus*. In: SÁNCHEZ VÁZQUEZ, J. E.; OEI, P. **Mushroom cultivation**. 3rd. ed. Leiden: Backhuys Publishers, 2003. p. 56-65.

LIN, Z.; LIN, Z. **Fungi cultivation with Jun-Cao**. Fuzhou: Asia-Pacific Fungi Cultivation Training Center, 1995. 110 p.

MACAYA-LIZANO, A. V. Cultivo de *Pleurotus ostreatus* y especies afines (Funhi: Pleurotaceae) sobre medios naturales semi-esteriles. **Revista de Biología Tropical**, Costa Rica, v. 36, n. 2, p. 255-260, 1988.

MANZI, P. et al. Commercial mushroom: nutritional quality and effect of cooking. **Food Chemistry**, London, v. 84, p. 201-206, 2004.

MARINO, R. H. et al. Crescimento e cultivo de diferentes isolados de *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer em serragem da casca de coco. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 75, n. 1, p. 29-36, 2008.

MAZIERO, R. **Substratos alternativos para o cultivo de *Pleurotus* spp.** 1990. 136 f. Dissertação (Mestrado em Química)-Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1990.

MAZIERO, R.; BONONI, V. L. R.; CAPELARI, M. Cultivo e produtividade de *Pleurotus ostreatus* var. “Flórida” em Mogi das Cruzes, SP, Brasil. **Hoehnea**, São Paulo, v. 19, p. 1-7, 1992.

MATA, G.; DELPECH, P.; SAVOIC, J. M. Selection of strains of *Lentinula edodes* and *Lentinula boryana* adapted for efficient mycelial growth on wheat straw. **Revista Iberoamericana de Micología**, Barcelona, v. 18, p. 118-122, 2001.

MODA, E. M. **Aumento da vida útil de cogumelos *Pleurotus sajor-caju* in natura com aplicação de radiação gama.** 2008. 105 f. Tese (Doutorado em Energia Nuclear na Agricultura)-Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

MOTOS, J. R. **Avaliação de substratos a base de bagaço de cana-de-açúcar para o crescimento do cogumelo *Pleurotus ostreatus*.** 1989. 53 f. Monografia (Trabalho de Conclusão do Curso de Agronomia)-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1989.

- MUEZ-ORORBIA, M.; PARDO-NUÑEZ, J. La preparación del sustrato. In: SÁNCHEZ, E. J.; ROYSE, D. J. (Org.). **La biología y el cultivo de *Pleurotus* spp. en México**. Chiapas: ECOSUR, 2001. p. 44-62.
- NGAI, P. H. K.; NG, T. B. A ribonuclease with antimicrobial, antimitogenic and antiproliferative activities fm the edible mushroom *Pleurotus sajor-caju*. **Peptides**, New York, v. 25, p. 11-17, 2004.
- OEI, P. **Mushroom cultivation: appropriate technology for mushroom growers**. 3rd. ed. Leiden: Backhuys Publications, 2003. 426 p.
- PEDRA, W. N.; MARINO, R. H. Cultivo axênico de *Pleurotus* spp. em serragem da casca de coco (*Cocos nucifera* Linn.) suplementada com farelo de arroz e/ou de trigo. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 73, n. 2, p. 219-225, 2006.
- POPPE, J. Use of agricultural waste materials in the cultivation of mushrooms. **Mushroom Science**, Leamington Spa, v. 15, n. 1, p. 385-390, 2000.
- RAJARATHNAM, S. Biopotentialities of the Basidiomycetes. **Advances in applied Microbiology**, Washington, DC, v. 37, p. 233-361, 1992.
- RAJARATHNAM, S. *Pleurotus* mushrooms. Part II. Morfology, life, cicle, taxonomy breeding and cultivation. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Philadelphia, v. 26, n. 2, p. 157-223, 1987.
- RAJARATHNAM, S.; BANO, Z. *Pleurotus* mushrooms: Part III. Biotransformations of natural lignocellulosic wastes comercial applications and implications. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Philadelphia, v. 28, n. 1, p. 31-113, 1989.
- 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**, Brasília, DF, v. 36, n. 6, p. 887-891, 2001.
- SANTOS, V. M. W. et al. Estudo da fração de inoculo e da suplementação da palha de bananeira para a produção de *Pleuortus sajor-caju*. **Revista Saúde e Ambiente**, Joinville, v. 1, n. 1, p. 64-67, 2000.
- SHARMA, H. S. S.; LYONS, G.; CHAMBERS, J. Comparison of the changes in mushroom (*Agaricus bisporus*) compost during windrow and bunker stages of phase I and II. **Association of Applied Biologists**, New York, v. 136, p. 59-68, 2000.
- SILVA, S. O.; COSTA, S. M. G.; CLEMENTE, E. Chemical composition of *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Quél., substrates and residue after cultivation. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 45, p. 531-535, 2002.

SILVA, E. G. et al. Análise química de corpos frutificação *Pleurotus sajor-caju* cultivado em diferentes concentrações de nitrogênio. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 1, p. 72-75, 2007.

SMITH, J. F.; SPENCER, D. M. Rapid preparation of composts suitable for the production of the cultivated mushroom. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 5, p. 23-31, 1976.

SINGER, R.; HARRIS, B. Mushrooms and truffles for human consumption and other uses. In: SINGER, R.; HARRIS, B. **Mushrooms and truffles: botany, cultivation and utilization**. Ciesnmitt: Koeltz Scientific Books, 1987. p. 273-278.

STAMETS, P. **Growing gourmet, medicinal mushrooms**. Oregon: Ten Speed Press, 1993. 552 p.

STAMETS, P.; CHILTON, J. S. **The mushroom cultivator**. Washington, DC: Agarikon, 1983. 415 p.

STRAATSMA, G. et al. Adjustment of the composting process for mushroom cultivation based on initial substrate composition. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 72, n. 1, p. 67-74. 2000.

STRAATSMA, G. et al. Bioconversion of cereal straw into mushroom compost. **Canadian Journal of Botany**, Montreal, v. 73, p. 1019-1024, 1995.

SUBRAMANIAN, C. V. Mushrooms: beauty, diversity, and relevance. **Current Science**, Chichester, v. 69, n. 12, p. 986-998, 1995.

TISDALE, T. E.; MIYASAKA, S. C.; HEMMES, D. E. Cultivation of the oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) on wood substrates in Hawaii. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 22, p. 201-206, 2006.

URBEN, A. F. **Produção de cogumelos por meio de tecnologia chinesa modificada**. Brasília, DF: Embrapa, 2004. 187 p.

VEDDER, P. J. C. **Cultivo moderno del champiñón**. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa, 1996. 369 p.

WISBECK, E. **Estudo do cultivo submerso de *Pleurotus ostreatus* DSM 1833 para a produção de biomassa e de exopolissacarídeos**. 2003. 196 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química)-Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

WOOD, D. A.; FERMOR, T. R. Nutrition of *Agaricus bisporus*. In: FLEGG, P. B.; WOOD, D. A. (Ed.). **The biology and technology of the cultivation mushroom**. Chichester: Wiley Interscience, 1985. p. 43-61.

- YANG, J. H.; LIN, H. C.; MAU, J. L. Antioxidant properties of several commercial mushrooms. **Food Chemistry**, Quebec, v. 77, p. 229-235, 2002.
- YILDIZ, S. et al. Some lignocellulosic wastes used as raw material in cultivation of the *Pleurotus* culture mushroom. **Process Biochemistry**, Kansas, v. 38, p. 301-306, 2002.
- ZANETTI, A. L.; RANAL, M. A. Suplementação da cana-de-açúcar com guandú no cultivo de *Pleurotus* sp. "Florida". **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 32, n. 9, p. 959-964, 1997.
- ZHANG, R. H.; LI, X.; FADEL, J. G. Oyster mushroom cultivation with rice and wheat straw. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 82, n. 3, p. 277-284, 2002.
- ZHANXI, L. ZHANZHUA, L. Fungi cultivation With Jun-Cao. Fuzhou: Asia-Pacific Fungi Cultivation Training Center, 2002.



## **CAPÍTULO 1: CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE LINHAGENS COMERCIAIS DE *Pleurotus ostreatus* PELA TÉCNICA RAPD**

### **1. INTRODUÇÃO**

Os representantes do gênero *Pleurotus* pertencem à ordem Agaricales, a qual é conhecida pela grande variedade na morfologia dos indivíduos (Lopes 1999). Neste gênero estão inclusos espécies de cogumelos comestíveis com propriedades medicinais e importantes aplicações biotecnológicas e ambientais (Cohen et al. 2002).

Entre as principais espécies cultivadas estão: *P. ostreatus*, *P. sajor-caju*, *P. citrinopileatus*, *P. pulmonarius*, *P. cystidiosus*, *P. sapidus*, *P. abalones*, *P. salmoneo-stramineus*, *P. ferulae* e *P.ostreatus* var. "Florida" (Maziero 1990, Wang et al. 2001). No entanto, é difícil fazer a correta descrição de todas as espécies e isolados comerciais de *Pleurotus*, pois os diferentes países possuem diversos climas, métodos de cultivo, materiais para formulação de substrato e exigência de mercado, o que resulta em diferentes condições de crescimento.

Os cogumelos do gênero *Pleurotus* possuem ampla distribuição geográfica, sendo o *P. ostreatus* (Jacq. et Fr.) Kummer, o cogumelo de maior importância comercial dentro deste gênero, estando difundido em áreas temperadas e em regiões tropicais (Yang 1986, Delmas 1989).

Marino et al. (2003) relatam que a manifestação genética de cada isolado é influenciada, entre outros fatores, pela temperatura e intensidade luminosa. No Brasil existem algumas espécies nativas de *Pleurotus*, a maioria ainda não estudada que teriam potencialidade de serem utilizadas para o cultivo, com a vantagem de serem adaptadas aos climas regionais brasileiros (Maziero 1990). Sobre isso, Sales-Campos et al. (2010) cultivaram uma linhagem de *P. ostreatus* de ocorrência na Amazônia brasileira, em resíduos madeireiros e agroindustriais e obtiveram resultados satisfatórios.

Várias empresas ou cooperativas têm comercializado o inóculo (semente ou *spawn*) de *P. ostreatus* ou o próprio substrato colonizado. No entanto, pouco se sabe a respeito da origem e da variabilidade genética dos isolados utilizados para na produção comercial de cogumelos dessa espécie.

Métodos para identificação de genótipos são importantes para um entendimento da história evolutiva dos fungos. Além disso, o sucesso do cultivo de cogumelos comerciais requer uma habilidade para identificar as espécies corretamente e discernir entre linhagens de uma mesma espécie (Bunyard et al. 1996).

A taxonomia de espécies de *Pleurotus*, apesar de todos os esforços para esclarecimentos, ainda é confusa (Menolli Jr. et al. 2010). Por causa da forma diversificada dos cogumelos, os grupos e distribuição da maioria das espécies são pouco conhecidos (Vilgalys e Sun 1994). Além disso, a diversidade da morfologia dos basidiomas de várias espécies, especialmente aquelas distribuídas em diferentes regiões do mundo, bem como as identificadas erroneamente de isolados comerciais tem levado a múltiplos nomes para a mesma espécie (Menolli Jr. et al. 2010).

O RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) é um método conveniente para detectar diversidade genética (Marino et al. 2003, Sunagawa e Magae 2005, Larraya et al. 1999). Este método apresenta resultados satisfatório quando aplicado para verificar variabilidade genética em linhagens de cogumelos de várias origens.

Assim, neste trabalho foi avaliada a variabilidade existente entre quatro linhagens comerciais de *P. ostreatus* (POS-98/38, POS-09/100, POS-09/101 e POS-09/102) coletadas no estado de São Paulo, sendo caracterizadas pelo método RAPD (Williams et al. 1990).

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

As linhagens de *P. ostreatus* utilizadas no experimento foram obtidas de produtores de cogumelos do Estado de São Paulo e do Banco de Germoplasma do Módulo de Cogumelos, FCA/UNESP, Botucatu-SP (Tabela 1).

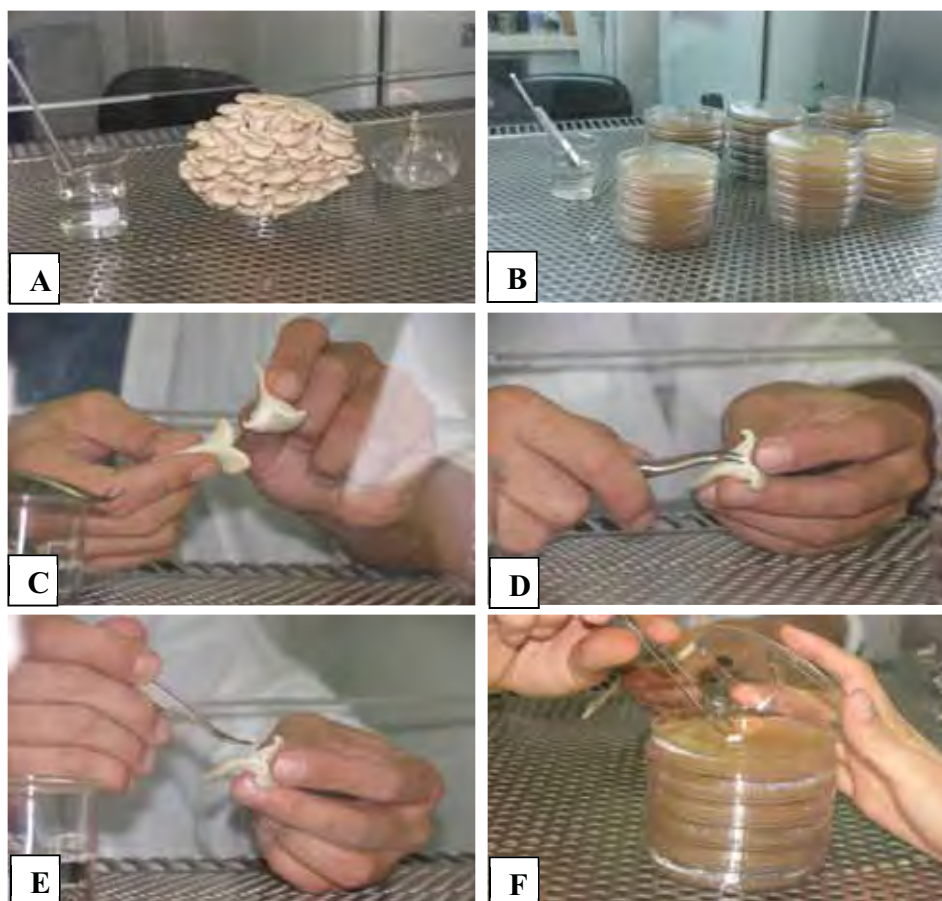
**Tabela 1.** Linhagens de *Pleurotus ostreatus* utilizadas nos experimentos.

Linhagens	Data do Isolamento	Origem
POS 98/38	06/98	Banco de germoplasma Módulo de Cogumelos.
POS 09/100	01/09	Basidioma coletado de cultivo comercial em composto pasteurizado na região de Sorocaba; segundo o produtor, é originária do Japão.
POS 09/101	01/09	Basidioma coletado de cultivo comercial em composto pasteurizado na cidade de São Pedro, oriunda dos EUA.
POS 09/102	02/09	Basidioma coletado de cultivo comercial em composto pasteurizado na cidade de Tatuí; segundo produtor, é originária da Itália.

### 2. 1. Isolamento e matriz primária

A técnica utilizada para o isolamento e obtenção de matriz primária das linhagens comerciais baseou-se na coleta de um basidioma sadio de *P. ostreatus* nos locais de cultivo e, em ambiente asséptico, em câmara de fluxo laminar. Inicialmente o mesmo foi partido com as mãos e, com o auxílio de uma pinça de corte, foram transferidos

fragmentos de 3 a 5 mm do pseudotecido interno para placas de Petri, contendo 20 ml de meio de cultura CA (Composto-Agar) (figura 1).



**Figura 1.** Procedimento de isolamento das linhagens de *P. ostreatus*, dentro de câmara de fluxo laminar: A, B. basidiomas, placas com meio de cultura, lamparina e pinça; C. partição manual longitudinal do basidioma; D, E. retirada de um fragmento do pseudotecido interno, com pinça; F. transferência deste para o meio de cultura.

O meio de cultura CA foi feito à base de extrato de uma mistura de bagaço de cana-de-açúcar (30%) mais capim braquiária (30%) mais capim brizantha (30%) mais farelo de trigo (10%). Para tanto, 40 g (base seca) da mistura foi fervida, por 10 minutos, em 500 ml de água destilada. O extrato foi filtrado, em peneira de malha de 60 mesh, e completou-se o volume do mesmo para 500 ml, com adição de água destilada. A seguir, colocou-se em frascos de Duran e autoclavou-se a 121 °C por 30 min., e pós 24 horas, adicionaram-se 7,5 g de Agar e autoclavou-se novamente realizando-se assim, o processo de

tindalização. Após resfriamento e no interior de uma câmara de fluxo laminar, verteram-se 20 ml de meio em placas de Petri esterilizadas.

Ressalta-se que os fragmentos foram cortados em local distante das lamelas, para se evitar a transferência de esporos para o meio de cultura e, conseqüentemente, riscos de recombinação genética e de alterações morfofisiológicas das linhagens. A colonização do meio de cultura ocorreu em temperatura de  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ , em BOD durante 10 dias e no escuro.

A certificação e viabilidade das matrizes obtidas, bem como da linhagem do Banco de Germoplasma do Módulo de Cogumelos, foram conferidas através de um pré-cultivo das mesmas, em substrato pasteurizado, a base de bagaço de cana-de-açúcar (45%), palha de cana-de-açúcar (45%) e farelo de trigo (10%) (base seca dos ingredientes).

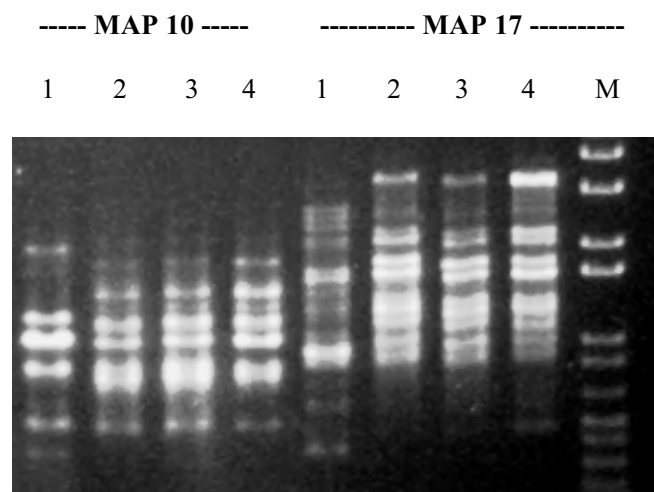
## **2. 2. Caracterização molecular**

As linhagens foram caracterizadas pelo método RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA-Williams et al. 1990). O material genético foi proveniente de micélio cultivado em placas com meio sólido BDA (batata, dextrose e ágar). No isolamento do DNA, foi utilizado o método descrito por Doyle e Doyle (1988), modificado para o uso em fungos. Para amplificação do DNA foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores dos conjuntos K, O e M (K-12, K-15, OPA-01, MAP-08, MAP-10 e MAP-17). As reações foram realizadas em um volume final de 10  $\mu\text{L}$ , contendo: 50ng de DNA, 0,1 mM dNTPs, 2,5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1  $\mu\text{M}$  do oligonucleotídeo iniciador, tampão de reação (10mM Tris-HCl, 50mM KCl), 1U Taq polimerase. As amplificações foram desenvolvidas com um ciclo inicial de  $94^{\circ}\text{C}$ , 4 min; 35 ciclos de  $94^{\circ}\text{C}$ , 1 min,  $40^{\circ}\text{C}$ , 1 min,  $72^{\circ}\text{C}$ , 1 min, com um período de extensão final de um ciclo  $72^{\circ}\text{C}$ , 10 min.

Os produtos das amplificações foram analisados em gel de agarose 0,8%, corados com bluegreen e visualizados sob luz ultravioleta. Os dados gerados foram analisados pelo programa GEL-PRO ANALYZER versão 3.1, através do qual foram calculados os coeficientes de similaridade, utilizando-se o coeficiente de Jaccard e construído o dendrograma para as distâncias genéticas.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os *primers* MAP-10 e MAP-17 foram selecionados de acordo com a amplificação dos fragmentos de DNA em todos os isolados e por apresentarem bandas polimórficas nítidas, facilmente detectadas a olho nu (Figura 2).

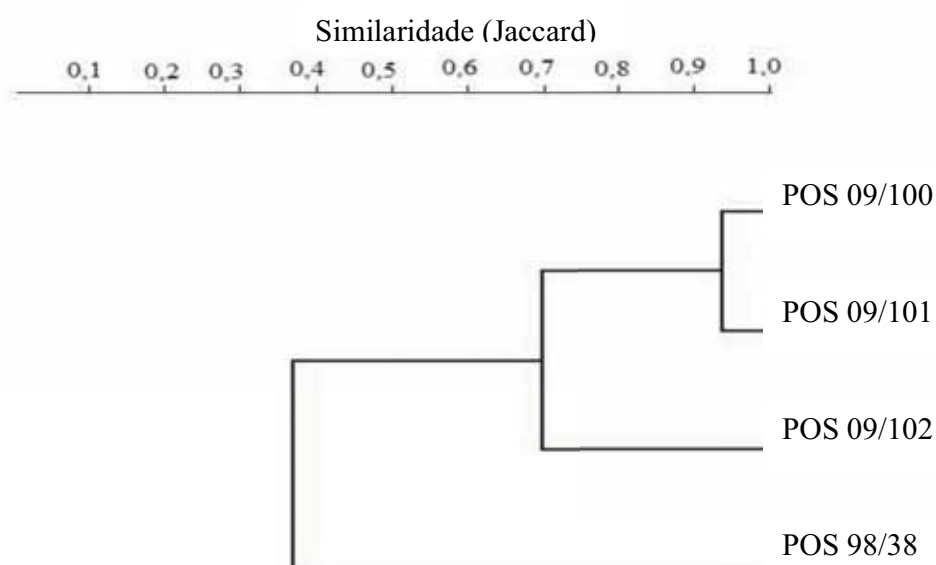


**Figura 2.** Produtos da amplificação das linhagens de *Pleurotus ostreatus* com os oligonucleotídeos MAP 10 e MAP 17. Bandas: 1. POS 98/38; 2. POS 09/100; 3. POS 09/101; 4. POS 09/102; M = Marcado molecular 1 Kb plus ladder.

Os padrões de RAPD revelaram variabilidade entre as quatro linhagens de cogumelos analisadas. Isto confirma a capacidade discriminatória elevada da técnica de RAPD em estudos de diversidade genética de fungos, sendo uma técnica útil na

diferenciação de isolados de várias espécies de cogumelos comerciais (Chiu et al., 1996, Colauto et al., 2002, Khush et al., 1992, Ramirez et al., 2001, Zhang e Molina, 1995). Bunyard et al. (1996), analisando o DNA ribossomal para a avaliação de classes genotípicas de *Pleurotus* spp., verificaram que entre os 21 isolados analisados, uma diferença de 4 – 25% foi vista entre o grupo e entre os isolados W84 (*P. dryinus*) e 609 (*P. cystidiosus*). Assim, as relações filogenéticas entre populações diferentes também provê uma ferramenta para entender a história biogeográfica de espécies de *Pleurotus* (Vilgalys e Sun, 1994).

No dendograma apresentado na Figura 3, verifica-se a formação de dois grupos distintos. Um grupo com as três linhagens coletadas de produtores de *P. ostreatus* no Estado de São Paulo, ou seja, POS 09/100, POS 09/101 e POS 09/102. O outro grupo com a linhagem do banco de germoplasma do Módulo de Cogumelos, a POS 98/38.



**Figura 3.** Dendograma baseado no método UPGMA, de acordo com os perfis de amplificação gerados com os oligonucleotídeos MAP 10 e MAP 17 para as linhagens de *Pleurotus ostreatus*.

As quatro linhagens de *P. ostreatus* apresentaram similaridade genética de 38%. De acordo com Ravash et al. (2010), a elevada diversidade genética detectada dentro de grupos é provavelmente devido a um fluxo eficiente de gene entre linhagens compatíveis dentro de cada grupo. Estes autores relatam ainda que a adaptação de

alguns grupos de fungos de diferentes lugares causa acúmulo de diferenças genéticas dentro das mesmas espécies devido ao processo de isolamento. Relatos semelhantes foram descritos por Bunyard et al. (1996), que verificaram que a espécie *P. ostreatus* é muito heterogênea, especialmente quando obtidas de localizações geográficas distantes, podendo haver mais variação, em relação à árvore filogenética, entre populações isoladas geograficamente do que entre espécies diferentes de *Pleurotus*.

O grupo contendo as três linhagens coletadas de produtores apresentou similaridade de 69%. Ainda dentro deste grupo, as linhagens POS 09/100 e POS 09/101 apresentaram similaridade de 93%, indicando baixa variabilidade genética. Menolli Jr. et al. (2010) também verificaram uma similaridade genética similar de 98% entre doze isolados de *Pleurotus* spp. Bunyard et al. (1996) relatam uma similaridade entre 21 isolados de *Pleurotus* spp., onde quase todos foram agrupados juntos e dentro deste grupo, onde muitas espécies foram consideradas semelhantes ao *P. ostreatus*, ou seja, 536 (*P. florida*), 598 (um isolado comercial de *P. ostreatus*), 529 (um isolado selvagem de *P. sapidus*), e 397 (um isolado comercial de *P. cornucopiae*) foram relatados como sendo similares ao *P. ostreatus*. Marino et al. (2006) avaliando a caracterização molecular de sete isolados de *P. ostreatus* verificaram que apresentaram 85% de similaridade entre si, apesar de terem origem distintas.

Entre os principais fatores morfológicos, a variação de cor dos cogumelos é muito comum nas espécies e depende das condições ambientais. Em alguns casos, uma mesma linhagem de *P. ostreatus* cultivada em regiões distintas pode apresentar características morfológicas distintas, o que pode levar o produtor a considerar, equivocadamente, como sendo linhagens distintas de uma mesma espécie. Sobre isso, Marino et al. (2003) observaram que a atividade do *P. ostreatus* submetido a uma intensidade luminosa de 120 lux e 28 °C não apresentou coloração de píleo, mas a 15 °C e com intensidade luminosa de 900 lux, os isolados de *P. ostreatus* apresentaram redução de coloração com aumento de luminosidade.

Bunyard et al. (1996) verificaram que a morfologia do basidioma do isolado 397 (um isolado comercial de *P. cornucopiae*) foi quase idêntica a do *P. ostreatus*, ou seja, embora originalmente tenha sido identificado como *P. cornucopiae*, os resultados obtidos sugerem que o isolado não foi identificado corretamente e possa, de fato, ser um isolado de *P. ostreatus*. Menolli Jr. et al. (2010) relatam que a combinação de estudos



morfológicos e análise filogenética molecular provêm uma boa ferramenta para entender a sistemática e limites de espécies do gênero *Pleurotus*.

#### **4. CONCLUSÕES**

A análise da caracterização molecular das linhagens revelou a existência de variabilidade genética entre as linhagens avaliadas, sendo a linhagem POS-98/38 mais distinta das demais na avaliação. Esta variabilidade possibilita estudos futuros em relação as suas características agronômicas.

## 5. REFERÊNCIAS

- BUNYARD BA, CHAICHUCHOTTEZ S, NICHOLSON MS AND ROYSE DJ. 1996. Ribosomal DNA analysis for resolution of genotypic classes of *Pleurotus*. *Mycol Res* 100 (2): 143-150.
- CHIU SW, MA AM, LIN FC, MOORE D. 1996. Genetic homogeneity of cultivated strains of Shiitake (*Lentinula edodes*) used in China as revealed by the polymerase chain reaction. *Mycological Research*. Cambridge. 100 (11): 1393-1399.
- COLAUTO N C, DIAS ES, GIMENES MA, EIRA AA. 2002. Genetic characterization of isolates of the basidiomycete *Agaricus blazei* by RAPD. *Brazilian Journal of Microbiology*, São Paulo. 33 (2): 131-133.
- COHEN RL, PERSKY L, HADAR Y. 2002. Biotechnological applications and potential of wood-degrading mushrooms of the genus *Pleurotus*. *Applied Microbiology Biotechnology*. 58 (5): 582-594.
- DELMAS, J. 1989. *Les Champignons et leur culture*. Flammarion: La Maison Rustique.
- LARRAYA L, PEÑAS MM, SANTOS GPC, RITTER E, PISABARRO AG, RAMÍREZ L. 1999. Identification of incompatibility alleles and characterization of molecular markers genetically linked to the A incompatibility locus in the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Curr Genet* 34: 486-493.
- LOPES, S. **Bio**. Sao Paulo: Editora Saraiva, 1999.
- MARINO RH, EIRA AF AND QUEIROZ EC. 2003. Melhoramento genético de *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kumm. por cruzamentos multispóricos visando a obtenção de isolados resistentes ao calor. *Hoehnea* 33 (3): 349-357.

- MARINO RH, EIRA AF, KURAMAE EE AND QUEIROZ EC. 2003. Morphomolecular characterization of *Pleurotus ostreatus* (Jacq. Fr.) Kummer strains in relation to luminosity and temperature of frutification. *Sci Agric* 60 (3): 531-535.
- MAZIERO R. 1990. Substratos alternativos para o cultivo de *Pleurotus* spp. 136 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Instituto de Biociências. USP. São Paulo.
- MENOLLI JR N, ASAI T, CAPELARI M AND PACCOLA-MEIRELLES LD. 2010. Morphological and molecular identification of four Brazilian commercial Isolates of *Pleurotus* spp. and cultivation on corncob. *Braz Arch Biol Technol* 53 (2): 397-408.
- WANG D, SAKODA A, SUZUKI M. 2001. Biological efficiency and nutritional value of *Pleurotus ostreatus* cultivated on spent beer grain. *Bioresource Technology*. 78 (3): 293-333.
- WILLIAMS JGW, KUBELIK AR, LIVAK KJ, RAFALSKI JA, TINGEY SV. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic acids research*. 18: 6531-6535.
- RAMIREZ L, MUEZ V, ALFONSO M, BARRENECHEA AG, ALFONSO L, PISABARRO AG. 2001. Use of molecular markers to differentiate between comercial strains of the button mushroom *Agaricus bisporus*. *FEMS Microbiology Letters*. Amsterdam. 198 (1): 45-48.
- RAVASH R, SHIRAN B, ALAVI A, BAYAT F, RAJAEI S AND ZERVAKIS GI. 2010. Genetic variability and molecular phylogeny of *Pleurotus eryngii* species-complex isolates from Iran, and notes on the systematics of Asiatic populations. *Mycol Progress* 9: 181-194.
- KHUSH RS, BECKER E, WACH M. 1992. DNA amplification polymorphisms of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus*. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, 58 (9): 2971-2977.
- SALES-CAMPOS C, MINHONI MTA AND ANDRADE MCN. 2010. Produtividade de *Pleurotus ostreatus* em resíduos da Amazônia. *Interc*. 35 (3): 198-201.
- SUNAGAWA M AND MAGAE Y. 2005. Isolation of genes differentially expressed during the fruit body development of *Pleurotus ostreatus* by differential display of RAPD. *FEMS Microbiology Letters* 246: 279-284.
- VILGALYS R AND SUN BL. 1994. Ancient and recent patterns of geographic speciation in the oyster mushroom *Pleurotus* revealed by phylogenetic analysis of ribosomal DNA sequences. *Proc. Nati. Acad. Sci*. 91: 4599-4603.
- YANG XM. 1986. Cultivation of edible mushroom in China, Agriculture Printing House, Beijing: PR China, 489-510.
- ZHANG Y, MOLINA FI. 1995. Strain typing of *Lentinula edodes* by random amplified polymorphic DNA assay. *FEMS Microbiology Letters*, Amsterdam. 131 (1): 17-20.

## **CAPÍTULO 2: CRESCIMENTO MICELIAL DE LINHAGENS DE *Pleurotus ostreatus* (Jacq) P. Kumm EM MEIOS DE CULTURA À BASE DE SUBSTRATO DE GRAMÍNEAS**

### **1. INTRODUÇÃO**

A capacidade de degradação dos fungos lignocelulolíticos em diferentes tipos de resíduos deve-se às suas enzimas, as quais proporcionam a obtenção de compostos como carbono e nitrogênio para o seu crescimento (Alexandrino et al., 2007), sendo que a ação destas depende diretamente da composição química do substrato utilizado, bem como das condições ambientais (Andrade et al., 2010; Bernardi et al., 2009; Sales-Campos 2010a).

A maioria dos cogumelos comestíveis, entre eles o *Pleurotus ostreatus*, apresentam bons índices de desenvolvimento em diferentes tipos de matérias-primas (Sales-Campos et al., 2010b, Sánchez 2010; Carvalho et al., 2010). Entretanto, devido à grande quantidade e variedade de resíduos descartada no meio ambiente, é imprescindível o estudo da viabilidade de aproveitamento destes materiais no preparo de substratos de cultivo de cogumelos de interesse alimentar.

A escolha de linhagens mais adaptadas a um determinado tipo de substrato é outro fator de fundamental importância para se obter sucesso no cultivo de *Pleurotus spp.*, pois estes podem diferir quanto à velocidade de crescimento micelial, à

temperatura e a umidades ótimas de incubação e de frutificação, à resistência a fungos contaminantes, ao tamanho e forma dos basidiomas e a produtividade (Carvalho et al., 2010; Bernardi et al., 2009; Marino et al., 2008).

No estudo das condições ótimas de crescimento do fungo, o cultivo *in vitro* tem sido utilizado (Sales-Campos et al., 2008), sendo que uma curva sigmoidal típica pode traduzir este crescimento durante um período de tempo, com várias fases com propriedades fisiológicas típicas (Montini et al., 2006). Os parâmetros avaliativos que podem ser adotados são: velocidade, vigor e massa micelial. Para isso, o uso de meio de cultura sólido é considerado adequado, pois, na natureza, os fungos comumente desenvolvem-se em substratos sólidos, sendo que o uso de meios de cultura à base de extrato do próprio substrato de cultivo tem sido recomendado (Andrade et al. 2010; Minhoni et al., 2011).

Assim, neste experimento, avaliou-se o crescimento micelial de linhagens de *P. ostreatus* em meios de cultura à base de extrato de substratos de cultivo formulados com bagaço de cana-de-açúcar adicionados de palhas ou capins, com ou sem suplementação nitrogenada.

## **2. MATERIAL E METODOS**

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia, do Departamento de Produção Vegetal, da Faculdade de Ciências Agronômicas, UNESP, Botucatu, SP.

### **2. 1. Linhagens de *Pleurotus ostreatus***

Foram utilizadas quatro linhagens de *P. ostreatus*: POS 98/38, POS 09/100, POS 09/101 e POS 09/102, as quais se encontram armazenadas na Micoteca do Módulo de Cogumelos - FCA/ UNESP.

### **2. 2. Preparo dos meios de cultura**

Os meios de cultura foram preparados à base de extratos de substratos, imediatamente após Fase II de compostagem (Tabela 1). Para tanto, coletaram-se 3 amostras (4 sub-amostras para cada amostra do mesmo substrato) de cada substrato e procedeu-se a secagem das mesmas em estufa a 65 °C, até peso constante. Com o auxílio de uma tesoura, fragmentou-se o material em pedaços de 2-4 cm de comprimento. A seguir, prepararam-se os extratos aquosos dos mesmos, a partir da fervura, por 10 minutos, de 40 g (base seca) de substrato em 500 ml água destilada. Após, filtrou-se em peneira de malha de 60

mesh. Completou-se o volume de filtrado para 500 ml, com água destilada. A seguir, colocou-se em frascos de Duran e autoclavou-se a 121 °C por 30 min. Após 24 horas, adicionaram-se 7,5 g de agar e autoclavou-se novamente realizando-se assim, o processo de tinalização. Após, verteram-se 20 ml de meio em placas de Petri esterilizadas.

**Tabela 1.** Formulação dos substratos utilizados na elaboração dos meios de cultura.

Substrato <sup>(1,2)</sup>	----- Formulação -----						
	Bagaço	Capim Braquiária	Palha cana	Capim brizantha	Capim tobiatã	Palha trigo	Farelo trigo
A1	18,60	68,60	--	--	--	--	8,9
B1	25,40	--	63,00	--	--	--	8,9
C1	40,50	--	--	50,26	--	--	8,9
D1	65,20	--	--	--	28,80	--	8,9
E1	18,40	--	--	--	--	69,00	8,9
A2	21,30	78,60	--	--	--	--	--
B2	28,70	--	71,20	--	--	--	--
C2	57,30	--	--	42,60	--	--	--
D2	79,70	--	--	--	20,31	--	--
E2	21,05	--	--	--	--	78,94	--

1. Composto (materiais base seca): A. capim braquiária + bagaço de cana; B. palha de cana + bagaço de cana; C. capim brizantha + bagaço de cana; D. capim tobiatã + bagaço de cana; E. palha de trigo + bagaço de cana.

2. Suplementação do composto: 1. com farelo de trigo (A1, B1 C1, D1, E1); 2. sem farelo de trigo (A2, B2, C2, D2, E2).

### 2. 3. Adaptação das linhagens

Antecedendo o experimento propriamente dito, fez-se um cultivo prévio das linhagens em meio de cultura à base de todos os substratos (mistura de todos os substratos), facilitando-se assim, a adaptação destas aos ingredientes a serem utilizados no cultivo. A proporção dos materiais para o preparo deste meio de cultura foi: 40% de bagaço de cana-de-açúcar + 10% de palha de trigo + 10% palha de cana + 10% de capim braquiária + 10% de capim brizantha + 10% de capim tobiatã + 10% farelo de trigo.



#### **2. 4. Inoculação e incubação dos meios de cultura**

Discos de 5 mm da matriz secundária foram transferidos para o centro das placas contendo os meios de cultura. Incubou-se a  $25 \pm 1$  °C, no escuro. O período de incubação transcorreu-se até a colonização total de pelo menos 60% das placas de petri de cada tratamento.

#### **2. 5. Determinação do crescimento micelial de *Pleurotus ostreatus***

O crescimento micelial de *P. ostreatus* foi acompanhado através de medições periódicas do diâmetro das colônias. A primeira medida ocorreu após 48 horas da inoculação e, neste momento, as placas receberam oito marcas pontuais diametralmente opostas entre si, na face externa de sua base, no limite da colônia. As medidas subseqüentes foram realizadas a cada 24 horas. Desta forma, para cada período de leitura, foram obtidos quatro valores correspondentes ao diâmetro da colônia, em milímetros. Em seguida, estes valores foram transformados em uma média, as quais foram utilizadas para comparar os resultados obtidos entre os tratamentos.

Para o estudo da cinética de crescimento micelial do *P. ostreatus* em meio de cultura foram feitas as comparações dos parâmetros estatísticos (alfa, beta e gama) e posteriormente a construção de curvas das velocidades instantâneas.

#### **2. 6. Delineamento experimental**

O delineamento foi ao acaso, em fatorial 10 x 4 (meio de cultura x linhagem), com cinco repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância. As médias foram comparadas pelo teste não paramétrico de Student-newman-kills (5%). Para tanto, utilizou-se o programa SISVAR 4.2 desenvolvido pelo Departamento de Ciências Exatas, da Universidade Federal de Lavras, MG (UFLA).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As velocidades de crescimento micelial, seguiram modelos de regressão não linear, utilizando-se a metodologia de Montini et al. (2006), sendo detalhada a seguir.

O modelo que melhor explicou a cinética de crescimento das linhagens de *P. ostreatus*, em meio de cultura sólido, tem como componente determinístico a exponencial de uma função Gompertz, segundo Ratkoswsky (1983) citado por Montini et al. (2006).

$$Y_{ij} = \exp \{ \alpha_j \exp [- \exp(\beta_j - \gamma_j X_{ij})] \} + e_{ij}$$

Onde,  $Y_{ij}$  é o diâmetro de crescimento (mm);  $X_{ij}$  é o tempo (dias);  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  são os componentes do vetor de parâmetros  $\theta$ ;  $e_{ij}$  = componente aleatório (ruído). Os índices  $i$  e  $j$  são relativos a  $i$ -ésima observação e ao  $j$ -ésimo tratamento (cruzamentos), respectivamente.

As comparações dos parâmetros estatísticos  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  (Tabelas 2, 3, 4, 5, 6 e 7), referente ao crescimento micelial de linhagens de *P. ostreatus*, segundo os diferentes meios de cultura com ou sem suplementação utilizados.

**Tabela 2.** Comparação estatística do parâmetro alfa do modelo de regressão não linear<sup>1</sup>, referente à cinética de crescimento micelial de *Pleurotus ostreatus*, segundo meio de cultura e linhagem (teste não paramétrico de Student-Newman-Kills).

Meio de cultura <sup>(2)</sup>	----- Linhagens -----			
	98/38	09/100	09/101	09/102
	----- parâmetro alfa -----			
A1	4,64 b <sup>(3)</sup>	4,54 c	4,42 b	4,60 a
B1	4,62 b	4,67 b	4,70 a	4,60 a
C1	4,69 a	4,56 c	4,51 b	4,48 b
D1	4,63 b	4,81 a	4,50 b	4,58 a
E1	4,52 c	4,55 c	4,53 b	4,56 a

(1)  $Y_{ij} = \exp \{ \alpha_j \exp [- \exp(\beta_j - \gamma_j X_{ij})] \} + e_{ij}$

(2) Meios de cultura de extrato de substrato: A. capim braquiaria + bagaço de cana; B. palha de cana + bagaço de cana; C. capim brizantha + bagaço de cana; D. capim tobiatã + bagaço de cana; E. palha de trigo + bagaço de cana. 2. Suplementação do substrato: 1. com farelo de trigo (A1, B1 C1, D1, E1); 2. sem farelo de trigo (A2, B2, C2, D2, E2).

(3) Por coluna, medianas seguidas de mesma letra, não diferem significativamente ao nível de 5% de significância pelo teste de student-Newman-Kills.

**Tabela 3.** Comparação estatística do parâmetro beta do modelo de regressão não linear<sup>1</sup>, referente à cinética de crescimento micelial de *Pleurotus ostreatus*, segundo meio de cultura e linhagem (teste não paramétrico de Student-Newman-Kills).

Meio de cultura <sup>(2)</sup>	-----Linhagens-----			
	98/38	09/100	09/101	09/102
	----- parâmetro beta -----			
A1	0,922 bc <sup>(3)</sup>	0,852 b	1,237 a	0,982 a
B1	1,067 a	0,833 b	0,927 b	0,910 ab
C1	0,869 cd	1,071 a	1,129 a	0,987 a
D1	0,971 b	0,731 c	1,197 a	0,990 ab
E1	0,814 d	0,720 c	0,903 b	0,831 b

(1)  $Y_{ij} = \exp \{ \alpha_j \exp [- \exp(\beta_j - \gamma_j X_{ij})] \} + e_{ij}$

(2) Meios de cultura de extrato de substratos: A. capim braquiaria + bagaço de cana; B. palha de cana + bagaço de cana; C. capim brizantha + bagaço de cana; D. capim tobiatã + bagaço de cana; E. palha de trigo + bagaço de cana. 2. Suplementação do substrato: 1. com farelo de trigo (A1, B1 C1, D1, E1); 2. sem farelo de trigo (A2, B2, C2, D2, E2).

(3) Por coluna, medianas seguidas de mesma letra, não diferem significativamente ao nível de 5% de significância pelo teste de Student-Newman-Kills.

**Tabela 4.** Comparação estatística do parâmetro gama do modelo de regressão não linear<sup>1</sup>, referente à cinética de crescimento micelial de *Pleurotus ostreatus*, segundo meio de cultura e linhagem (teste não paramétrico de Student-Newman-Kills).

Meio de cultura <sup>(2)</sup>	----- Linhagens -----			
	98/38	09/100	09/101	09/102
	----- parâmetro gama -----			
A1	0,451 b <sup>(3)</sup>	0,455 a	0,590 a	0,389 c
B1	0,481 ab	0,386 b	0,382 c	0,379 c
C1	0,408 c	0,497 a	0,521 b	0,508 a
D1	0,424 a	0,326 c	0,565 ab	0,438 b
E1	0,332 d	0,335 c	0,320 d	0,288 d

(1)  $Y_{ij} = \exp \{ \alpha_j \exp [- \exp(\beta_j - \gamma_j X_{ij})] \} + e_{ij}$

(2) Meios de cultura de extrato de substratos: A. capim braquiaria + bagaço de cana; B. palha de cana + bagaço de cana; C. capim brizantha + bagaço de cana; D. capim tobiatã + bagaço de cana; E. palha de trigo + bagaço de cana. 2. Suplementação do substrato: 1. com farelo de trigo (A1, B1 C1, D1, E1); 2. sem farelo de trigo (A2, B2, C2, D2, E2).

(3) Por coluna, medianas seguidas de mesma letra, não diferem significativamente ao nível de 5% de significância pelo teste de Student-Newman-Kills.

**Tabela 5.** Comparação estatística do parâmetro alfa do modelo de regressão não linear<sup>1</sup>, referente à cinética de crescimento micelial de *Pleurotus ostreatus*, segundo meio de cultura e linhagem. (pelo teste não paramétrico de Student-Newman-Kills).

Meio de cultura <sup>(2)</sup>	----- Linhagens -----			
	98/38	09/100	09/101	09/102
	----- parâmetro alfa -----			
A2	4,64 b <sup>(3)</sup>	4,51 b	4,58 ab	4,50 c
B2	4,62 b	4,59 b	4,51 c	4,47 c
C2	4,69 a	4,53 b	4,50 c	4,58 b
D2	4,63 b	4,53 b	4,61 a	4,64 a
E2	4,52 c	5,04 a	4,55 b	4,55 b

(1)  $Y_{ij} = \exp \{ \alpha_j \exp [- \exp(\beta_j - \gamma_j X_{ij})] \} + e_{ij}$

(2) Meios de cultura de extrato de substratos: A. capim braquiaria + bagaço de cana; B. palha de cana + bagaço de cana; C. capim brizantha + bagaço de cana; D. capim tobiatã + bagaço de cana; E. palha de trigo + bagaço de cana. 2. Suplementação do substrato: 1. com farelo de trigo (A1, B1 C1, D1, E1); 2. sem farelo de trigo (A2, B2, C2, D2, E2).

(3) Por coluna: medianas seguidas de mesma letra, não diferem significativamente em nível de 5% de significância pelo teste de Student-Newman-Kills.

**Tabela 6.** Comparação estatística do parâmetro beta do modelo de regressão não linear<sup>1</sup>, referente à cinética de crescimento micelial de *Pleurotus ostreatus*, segundo meio de cultura e linhagem (teste não paramétrico de Student-Newman-Kills).

Meio de cultura <sup>(2)</sup>	----- Linhagens -----			
	98/38	09/100	09/101	09/102
	----- parâmetro beta -----			
A2	0,923 a <sup>(3)</sup>	0,965 a	1,021 b	0,907 b
B2	0,967 a	0,917 ab	1,152 a	1,042 a
C2	0,960 a	0,823 b	1,078 ab	0,927 b
D2	1,013 a	0,939 ab	1,132 a	0,957 b
E2	0,748 b	0,894 ab	0,819 c	0,811 c

(1)  $Y_{ij} = \exp \{ \alpha_j \exp [- \exp(\beta_j - \gamma_j X_{ij})] \} + e_{ij}$

(2) Meios de cultura de extrato de substratos: A. capim braquiaria + bagaço de cana; B. palha de cana + bagaço de cana; C. capim brizantha + bagaço de cana; D. capim tobiatã + bagaço de cana; E. palha de trigo + bagaço de cana. 2. Suplementação do substrato: 1. com farelo de trigo (A1, B1 C1, D1, E1); 2. sem farelo de trigo (A2, B2, C2, D2, E2).

(3) Por coluna, medianas seguidas de mesma letra, não diferem significativamente ao nível de 5% de significância pelo teste de Student-Newman-Kills.

**Tabela 7.** Comparação estatística do parâmetro gama do modelo de regressão não linear<sup>1</sup>, referente à cinética de crescimento micelial de *Pleurotus ostreatus*, segundo meio de cultura e linhagem (teste não paramétrico de Student-Newman-Kills).

Meio de cultura <sup>(2)</sup>	----- Linhagens -----			
	98/38	09/100	09/101	09/102
	----- parâmetro gama -----			
A2	0,430 b <sup>(3)</sup>	0,467 ab	0,439 c	0,441 b
B2	0,485 a	0,429 ab	0,522 a	0,486 a
C2	0,427 b	0,405 b	0,465 bc	0,388 c
D2	0,497 a	0,486 a	0,491 b	0,427 b
E2	0,271 c	0,223 c	0,293 d	0,277 d

(1)  $Y_{ij} = \exp \{ \alpha_j \exp [- \exp(\beta_j - \gamma_j X_{ij})] \} + e_{ij}$

(2) Meios de cultura de extrato de substratos: A. capim braquiaria + bagaço de cana; B. palha de cana + bagaço de cana; C. capim brizantha + bagaço de cana; D. capim tobiatã + bagaço de cana; E. palha de trigo + bagaço de cana. 2. Suplementação do substrato: 1. com farelo de trigo (A1, B1 C1, D1, E1); 2. sem farelo de trigo (A2, B2, C2, D2, E2).

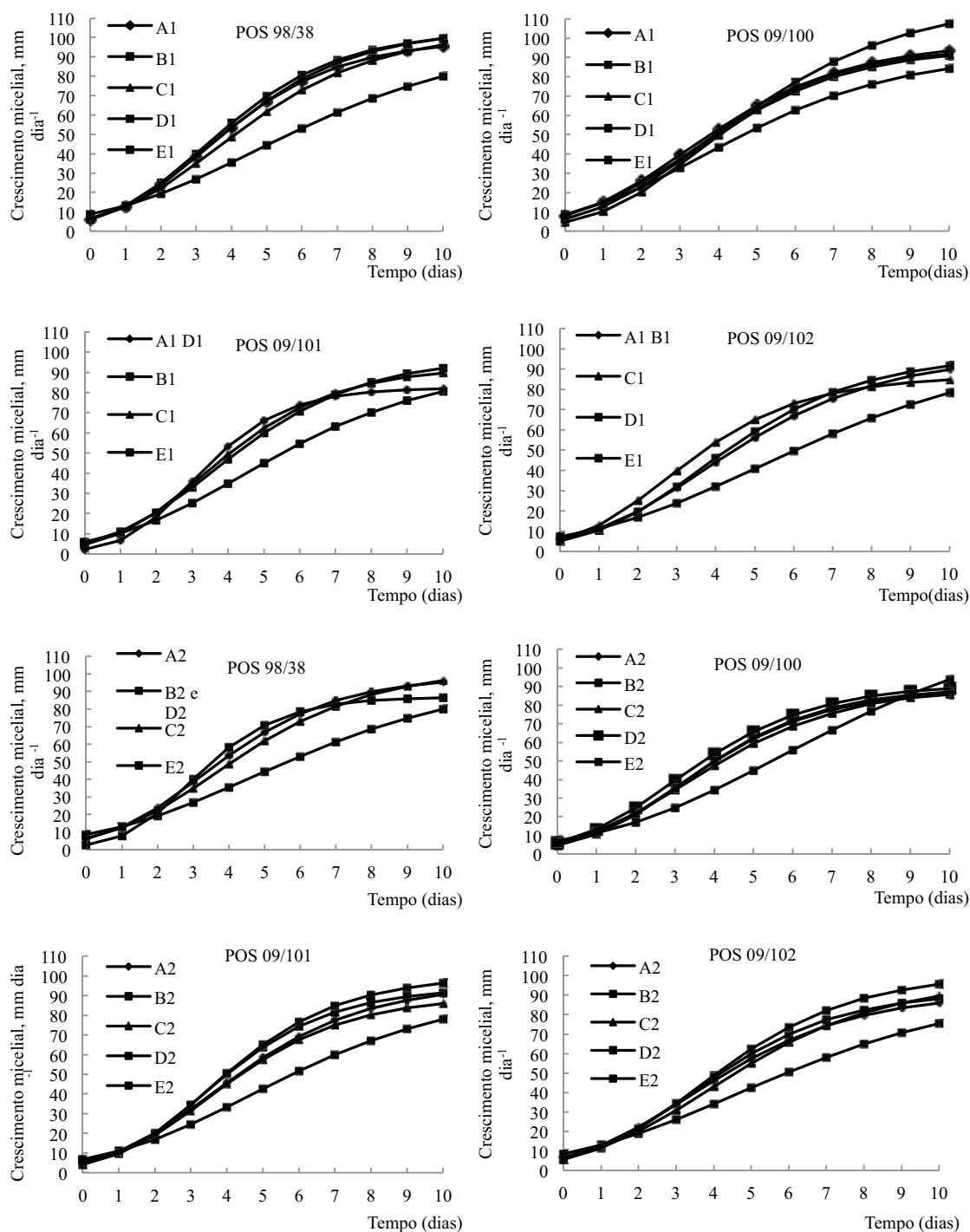
(3) Por coluna, medianas seguidas de mesma letra, não diferem significativamente ao nível de 5% de significância pelo teste de Student-Newman-Kills.

Nos casos em que dois tratamentos apresentem igualdade estatística entre os parâmetros  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ , significa que possuem velocidades instantâneas iguais. Caso contrário, basta que um dos parâmetros seja diferente, para assegurar diferença estatística entre as velocidades instantâneas.

O crescimento micelial foi determinado pelos parâmetros  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  que interagem durante a colonização do meio de cultura, desencadeando comportamentos distintos entre as linhagens em razão do meio de cultura (Tabelas 2, 3, 4, 5, 6, e 7).

Vários autores já relataram diferenças de crescimento micelial de fungos comestíveis em função de linhagens (Andrade et al., 2008; Gomes-da-Costa et al., 2008; Marino et al., 2008). De acordo com Nyochembeng et al. (2008) a biodegradação de resíduos pode ser otimizada pela seleção de linhagens eficientes, uma vez que, como já relatado por Silva et al. (2005) o crescimento do micélio influencia a produção de cogumelos. Além disso, Jonathan et al. (2008) relatam que uma rápida colonização micelial do *Pleurotus tuberegium*, nos seletivos substratos, tais como resíduos de madeira de *Holoptelia grandis* e *Milicia excelsa*, reduz consideravelmente o crescimento de outros organismos competidores.

Nas comparações entre meios de cultura com suplementação (Figura 1), ocorreu diferença significativa no crescimento micelial da linhagem POS 98/38, sendo a velocidade instantânea de crescimento maior para os meios B1>D1, e menores para os meios A1>C1>E1. Andrade et al. (2008), avaliando o crescimento de *L. edodes* em meios de cultura à base de serragem de diferentes espécies de eucalipto, também verificaram diferenças no crescimento do fungo entre os meios de cultura, obtendo o melhor resultado no meio à base de *E. citriodora*.



**Figura 1.** Velocidade de crescimento micelial ( $\text{mm dia}^{-1}$ ) estimada para as linhagens de *Pleurotus ostreatus* POS 98/38, POS 09/100, POS 09/101 e POS 09/102 cultivadas em placas de Petri (diâmetro médio da colônia em placas de Petri). Meio de cultura: 1. A. Capim braquiária +bagaço de cana-de-açúcar; B. Palha de cana-de-açúcar + bagaço de cana-de-açúcar; C. Capim brizantha + bagaço de cana-de-açúcar; D. Capim tobiatã + bagaço de cana-de-açúcar; E. Palha de trigo + bagaço de cana-de-açúcar. 2. Suplementação do substrato: 1. com farelo de trigo (A1, B1, C1, D1 e E1); 2. sem farelo de trigo (A2, B2, C2, D2 e E2).

Para a linhagem POS 09/100 também ocorreu diferenças significativas para todos os meios com suplementação testados, observando-se maior crescimento no meio D1 e com os meios A1, B1 e C1 o crescimento mostrou-se intermediário e por fim com menor crescimento o meio E1. Motato et al. (2006), avaliou o crescimento micelial de *Pleurotus djamor* em resíduos de bananeira misturados com serragem de jequitibá e observou diferenças de crescimento micelial em função do meio de cultura, sendo que os tratamentos compostos por folhas de bananeira proporcionaram um crescimento micelial significativamente maior aos demais tratamentos.

A linhagem POS 09/101 apresentou crescimento estatisticamente igual para os meios A1 e D1 sendo construída uma única curva de crescimento. Donini et al. (2006), avaliando o efeito da suplementação com farelos no crescimento *in vitro* de *P. ostreatus* em meios à base de capim-elefante (*Pennisetum* spp.), também observaram semelhança entre crescimento radial da colônia de *P. ostreatus* suplementados com os farelos de arroz e milho e os não suplementados.

O maior crescimento foi observado para os meios B1>C1 e o menor crescimento no meio E1. Já para a linhagem 09/102 houve diferença estatística exceto para os meios A1 e B1 plotados em uma única curva de crescimento, sendo os maiores crescimento para os meios C1>D1 e menor crescimento para o meio E1.

O comportamento do crescimento micelial nos meios de cultura não suplementados foi diferente dos meios suplementados (Figura 1). Estes resultados estão de acordo com Pedra e Marino (2006) que, utilizando serragem de casca de coco para avaliar o crescimento de *P. ostreatus*, obtiveram melhor crescimento micelial quando a serragem foi suplementada com farelo de trigo ou de arroz. Também Sales-Campos et al. (2008), avaliando o crescimento micelial de *P. ostreatus* em resíduo de *Simarouba amara*, concluem que a suplementação favoreceu o crescimento micelial e proporcionou boa colonização pelo fungo.

Nos meios B2 e D2 o crescimento micelial da linhagem POS 98/38 não diferiu estatisticamente sendo construída uma única curva de crescimento (Figura 1). Observou-se que o crescimento segue a seguinte ordem A2 > B2 > D2 > C2 > E2. Resultados semelhante foram obtidos por Aguiar et al., (2011) que avaliando o crescimento micelial de *L. edodes* em meios de cultura à base de diferentes resíduos orgânicos, verificaram



que os meios à base de cupuaçu e de tucumã proporcionaram resultados semelhantes de crescimento fúngico.

Os meios A2, B2 e D2 proporcionaram para a linhagem POS 09/100 as maiores velocidades de crescimento micelial estatisticamente distintas e, as menores velocidades de crescimento foram obtidos com os meios C2 > E2.

Para a linhagem 09/101 todos os meios de cultura testados apresentaram diferenças estatísticas seguindo a ordem de D2>B2>A2>C2>E2. E por fim, para a linhagem POS 09/102 os meios de cultura testados diferiram estatisticamente seguindo a ordem de D2>B2>C2>A2>E2.

#### **4. CONCLUSÃO**

Os meios de cultura à base de palha de cana-de-açúcar e capim brizantha (com suplementação) proporcionaram as maiores velocidades de crescimento micelial, independente da linhagem utilizada;

Os meios de cultura à base de substrato de palha de trigo apresentaram as menores velocidades de crescimento, independente da suplementação e linhagem estudada.

## 5. REFERÊNCIAS

- Aguiar, L.V.B.; Sales-Campos, C.; Carvalho, C.S.M.; Minhoni, M.T.A.; Andrade, M.C.N. (2011). Desenvolvimento micelial de *Lentinula edodes* em meios de cultivo à base de diferentes substratos orgânicos. *Interc.* 36 (3), 205-210.
- Alexandrino, A.M.; Faria, H.G.; Souza, C.G.M.; Peralta, R.M. (2007). Aproveitamento do resíduo de laranja para a produção de enzimas lignocelulolíticas por *Pleurotus ostreatus* (Jack:Fr). *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 27(2): 364-368.
- Andrade, M.C.N.; Minhoni, M.T.A.; Sansígolo, C.A.; Zied, D.C. (2010). Análise química da madeira e casca de diferentes tipos de eucalipto antes e durante o cultivo de shiitake em toras. *Rev. Árvore.* 34 (1), 165-175.
- Andrade, M.C.N.; Silva, J.H.; Minhoni, M.T.A.; Zied, D.C. (2008). Mycelial growth of two *Lentinula edodes* strains in culture media prepared with sawdust extracts from seven eucalyptus species and three eucalyptus clones. *Acta Sci. Agron.* 30 (3), 333-337.
- Bernardi, E.; Donini, L.P.; Minotto, E.; Nascimento, J.S. (2009). Cultivo e características nutricionais de *Pleurotus* em substrato pasteurizado. *Bragantia.* 68 (4), 901-907.
- Carvalho, C.S.M.; Sales-Campos, C.; Andrade, M.C.N. (2010). Mushrooms of the *Pleurotus* genus: a review of cultivation techniques. *Interc.* 35 (3), 177-182.
- Donini, L. P.; Bernardi, E.; Minotto, E.; Nascimento, J.S. (2006). Efeito da suplementação com farelos no crescimento *in vitro* de *Pleurotus ostreatus* em meios à base de capim-elefante (*Pennisetum* spp.). *Arq. Inst. Biol.* 73 (3), 303-309.
- Gomes-da-Costa, S.M.; Coimbra, L.B.; Silva, E. S. (2008). Crescimento micelial de dois isolados de *Lentinula edodes* (Berk.). Pegler em resíduos lignocelulóticos. *Acta. Sci. Biol. Sci.* 30 (2), 192-196.

- Jonathan, S.G.; Fasidi, I.O.; Ajayi, A.O.; Adegeye, O. (2008). Biodegradation of Nigerian wood wastes by *Pleurotus tuber-regium* (Fries) Singer. *Biores. Technol.* 99, 807-811.
- Marino, R.H.; Abreu, L.D.; Mesquita, J.B.; Ribeiro, J.T. (2008). Crescimento e cultivo de diferentes isolados de *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer em serragem da casca de coco. *Arq. Inst. Biol.* 75 (1), 29-36.
- Minhoni, M.T.A.; Jesus, J.P.F.; Vieira, F.R. (2011). Produção de micélio de cogumelos comestíveis. In: Sales-Campos, C.; Varejão, M.J.C. (Ed.). *Bioconversão de resíduos lignocelulolíticos da Amazônia para cultivo de cogumelos comestíveis*. Manaus: INPA, 2011. p. 66-76.
- Montini, R.M.C.; Passos, J.R.S.; Eira, A.F. (2006). Digital monitoring of mycelium growth kinetics and vigor of shiitake (*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler) on agar medium. *Braz. J. Microbiol.* 37 (1), 90-95.
- Motato, K.E.; Mejía, A.I.; León, A. (2006) Evaluación de los residuos agroindustriales de plátano (*Musa paradisiaca*) y aserrín de abarco (*Cariniana piriformes*) como sustratos para el cultivo del hongo *Pleurotus djamor*. *Vitae*. 13 (1), 24-29.
- Nyochembeng, L.M.; Beyl, C.A.; Pacumbaba, R.P. (2008). Optimizing edible fungal growth and biodegradation of inedible crop residues using various cropping methods. *Biores. Technol.* 99, 5645–5649.
- Pedra, W.N.; Marino, R.H. (2006). Cultivo axênico de *Pleurotus* spp. em serragem da casca de coco (*Cocos nucifera* Linn.) suplementada com farelo de arroz e/ou de trigo. *Arq. Inst. Biol.* 75: 219-225.
- Sales-Campos, C.; Araujo, L.M.; Minhoni, M.T.A.; Andrade, M.C.N. (2010a). Análise físico-química e composição nutricional da matéria prima e de substratos pré e pós cultivo de *Pleurotus ostreatus*. *Interc.* 35 (1), 70-76.
- Sales-Campos, C.; Minhoni, M.T.A.; Andrade, M.C.N. (2010b). Produtividade de *Pleurotus ostreatus* em resíduos da Amazônia. *Interc.* 35 (3), 198-201.
- Sales-Campos, C.; Eira, A.F.; Jesus, M.A.; Campagnolli, F.; Andrade, M.C.N. (2008) Crescimento micelial de *Pleurotus ostreatus* em resíduo de *Simarouba amara*. *Pesq. Agropec. Bras.* 43 (1), 1633-1635.
- Sánchez, C. (2010). Cultivation of *Pleurotus ostreatus* and other edible mushrooms (2010). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 85, 1321-1337.
- Silva, E.M.; Machuca, A.; Milagres, A.M.F. (2005). Effect of cereal brans on *Lentinula edodes* growth and enzyme activities during cultivation on forestry waste. *Lett. Appl. Microbiol.* 40, 283–288.

## **CAPÍTULO 3: CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E FÍSICA DO SUBSTRATO DURANTE A COMPOSTAGEM NAS FASES I E II**

### **1. INTRODUÇÃO**

A produção de cogumelos depende diretamente da qualidade do substrato de cultivo ou “seletividade do substrato”, reduzindo-se os problemas com doenças, aumentando o rendimento e otimizando o uso dos nutrientes do substrato pelo fungo cultivado (Straatsma et al., 1989; Stozler; Grabbe, 1991; León; Lara, 2003).

Observações feitas a campo demonstram que a maioria dos produtores brasileiros está adotando o substrato e/ou composto elaborados a partir de palhas e capins misturados com bagaço de cana-de-açúcar mais farelos de cereais, com uso da compostagem curta (Fase I) com posterior pasteurização e condicionamento (Fase II) muitas vezes adaptando-se protocolos de cultivo do cogumelo *Agaricus bisporus*. Estas observações estão de acordo com o relato de Dias (2010) que ressalta a importância desta metodologia para os produtores brasileiros.

Segundo Dias (2010) são várias as técnicas que possibilitam cultivar o cogumelo *P. ostreatus*, mas no entanto, a comunidade científica brasileira tem preferivelmente utilizado a esterilização em autoclave com algumas variações de tempo e temperatura, fato pode estar relacionado com a comodidade, visto que estes equipamentos são comuns na maioria dos laboratórios das Universidades facilitando sua aplicação.

Os cogumelos possuem enzimas hidrolíticas da lignina, celulose e hemicelulose (Gerrits et al., 1995) podendo fazer uso direto destes compostos. Entretanto, deve-se fazer um parêntese para esclarecer que os cogumelos também podem utilizar como fonte de carbono e nitrogênio compostos de fácil oxidação, como açúcares, mas, sob condições naturais não assépticas, se tais compostos estiverem presentes, é a microbiota mesofílica que prevalecerá no sistema e não permitirá a colonização do substrato pelo fungo cultivado. A compostagem, pasteurização e condicionamento, promovem a estabilização física, química e biológica do substrato tornando-o favorável ao cultivo rústico de *P. ostreatus*.

O processo de compostagem está dividido em três fases: pré-umidecimento, Fase I (fermentação aeróbia) e Fase II (pasteurização e condicionamento) (Stamets; Chilton, 1983; Vedder, 1996; Muez-Ororbí; Pardo Nunez, 2001; León; Lara, 2003). No entanto, ambas as fases de compostagem são partes relacionadas do processo, mas, ao mesmo tempo diferentes em sua natureza e função sendo foco em varias pesquisas, na busca de mais controle, reduzir as emissões de odores e acelerar a compostagem (Laborde; Delmas, 1969; Smith; Spencer, 1976; Gerrits; Van Griensven, 1990; Straatsma et al., 1995; Straatsma et al., 2000). Alguns parâmetros como matéria seca, relação C/N, degradação (lignina, celulose, hemicelulose e matéria orgânica) e pH os quais podem ser ajustados no início da Fase I, mas sofrerão alterações durante o processo de compostagem (Fase I) e pasteurização e condicionamento (Fase II). Tais fatores são estudados e podem ser de difícil descrição (Wood; Fermor, 1985; Eira; Minhoni, 1997; Straatsma et al., 2000; Sharma et al., 2000).

Neste contexto, o presente estudo propôs avaliar a dinâmica que ocorre durante o processo de compostagem, pasteurização e condicionamento de substratos elaborados para o cultivo de *P. ostreatus*, avaliando-se o processo de compostagem nas Fases I e II em relação aos parâmetros: lignina, hemicelulose, celulose, relação C/N, umidade, temperatura, fibra bruta, proteína bruta e perda de massa fresca.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2. 1. Materiais

Os materiais utilizados para a formulação dos substratos foram: bagaço de cana-de-açúcar e palha de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*, doado pela Usina de açúcar e álcool da Barra, Lençóis Paulista, SP), palha de trigo (*Triticum aestivum*, doado pela empresa produtora de cogumelos, Italbras, Elias Fausto, SP), capim braquiária (*Braquiaria decumbens*), capim Brizantha (*Braquiaria brizantha*), capim Tobiatã (*Panicum* sp.) (colhidos na Fazenda Lageado, Botucatu, SP) e farelo de trigo (adquirido em casa de produtos agropecuários). A umidade, os teores de carbono e nitrogênio e a relação C/N destes materiais são apresentados na tabela 1.

A determinação dos teores de carbono e nitrogênio foi feita nos laboratórios do setor de Solos e Nutrição de Plantas da FCA/UNESP segundo a metodologia de Brasil (2007). A umidade destes materiais foi determinada três dias antes da montagem das leiras de compostagem. Para tanto, 500g (5 sub-amostras homogeneizadas) de bagaço, palhas e capins e 200g de farelo de trigo foram submetidos à determinação de massa fresca em balança analítica. Após, as amostras foram colocadas em estufa a 105°C por 24 horas; pesaram-se as massas secas e determinaram-se as umidades pela diferença entre massa fresca e seca.

**Tabela 1.** Teores de umidade (%), nitrogênio (%), carbono (%) e relação C/N dos materiais utilizados nos substratos.

Materiais	Umidade	N <sup>(1)</sup>	C <sup>(1)</sup>	Relação C/N
	%	----- g kg <sup>-1</sup> -----		
Bagaço de cana-de-açúcar	34,85	3,6	517	144
Capim braquiaria	12,80	5,9	483	81
Capim brizantha	11,80	8,7	494	56
Capim tobiatã	13,65	15,0	456	30
Palha de cana-de-açúcar	11,85	6,5	511	78
Palha de trigo	11,15	6,0	506	84
Farelo de Trigo	11,00	20,7	509	18

(1) base seca.

## 2. 2. Formulações e compostagem

As formulações dos substratos tiveram como base o ajuste da relação C/N inicial destes para 60/1 e 90/1 (Tabela 2). O estabelecimento destas relações C/N foi baseado nas relações C/N dos ingredientes formadores dos substratos e na adição ou não de suplementação nitrogenada na forma de farelo de trigo.

**Tabela 2.** Formulações (base seca) dos substratos utilizadas no cultivo de *Pleurotus ostreatus*.

Substrato <sup>(1, 2)</sup>	----- Capim -----				----- Palha -----		
	Bagaço	Braquiaria	Brizantha	Tobiatã	Cana	Trigo	Farelo trigo
----- kg -----							
A1	13,03	47,96	---	---	---	---	8,9
B1	19,55	---	---	---	48,48	---	8,9
C1	39,09	---	48,5	---	---	---	8,9
D1	97,73	---	---	43,18	---	---	8,9
E1	13,03	---	---	---	---	48,87	8,9
A2	13,03	47,96	---	---	---	---	---
B2	19,55	---	---	---	48,48	---	---
C2	65,15	---	48,5	---	---	---	---
D2	169,39	---	---	43,18	---	---	---
E2	13,03	---	---	---	---	48,87	---

(1) Substrato (materiais base seca): A. capim braquiaria + bagaço de cana; B. palha de cana + bagaço de cana; C. capim brizantha + bagaço de cana; D. capim tobiatã + bagaço de cana; E. palha de trigo + bagaço de cana.

(2) Suplementação do substrato: 1. com farelo de trigo (A1, B1 C1, D1, E1); 2. sem farelo de trigo (A2, B2, C2, D2, E2).

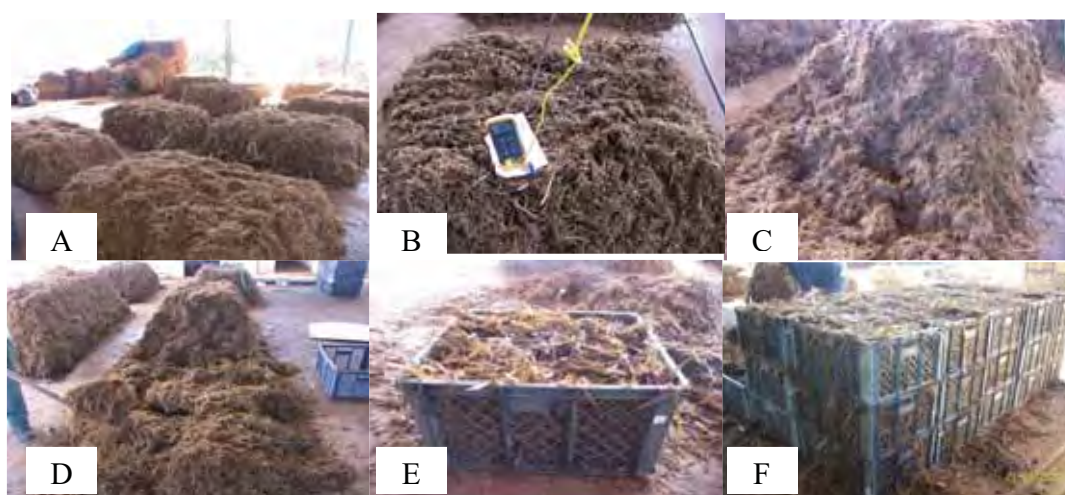


### 2. 3. Compostagem Fase I

A compostagem Fase I foi feita em barracão aberto, com cobertura em chapa galvanizada e piso de cimento. A montagem das leiras foi em camadas sobrepostas de bagaço de cana mais palha ou capim e com ou sem farelo de trigo. O umedecimento dos materiais, para cerca 75% de umidade média, foi feito durante a montagem e reviradas das leiras. A primeira revirada deu-se dois dias após a montagem das leiras e a segunda revirada dois dias após a primeira. Após 2 dias, procedeu-se a terceira revirada e acomodação dos substratos em caixas treliçadas (56,5 x 46,5 x 28,5 cm<sup>3</sup>, comprimento x largura x altura), para pasteurização e condicionamento (Tabela 3 e Figura 1).

**Tabela 3.** Procedimentos adotados na Fase I de compostagem.

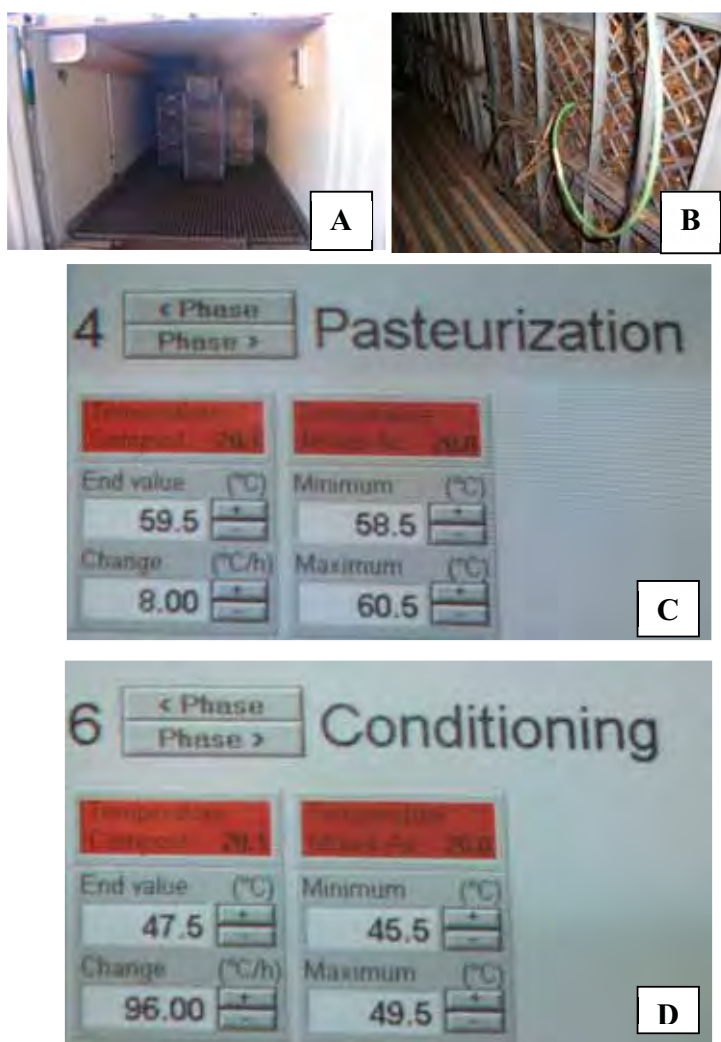
Dias	Procedimento
01	Umedecimento dos materiais e montagem das leiras;
03	1º revirada e adição de água;
05	2º revirada e adição de água;
07	3ª e ultima revirada e adição de água, seguida da acomodação dos compostos em caixas treliçadas, para pasteurização e condicionamento.



**Figura 1.** Compostagem Fase I: A. montagem e umedecimento das leiras; B. registro da temperatura; C, D. revirada da meda e liberação de vapor resultante de termogênese; E, F. acomodação do substratos em caixas plásticas treliçadas.

## 2. 4. Compostagem Fase II

Após a acomodação dos substratos em caixas treliçadas, estas foram dispostas, ao acaso, no interior de uma câmara de ambiente controlado modelo Dalsem Mushrooms Projects, para pasteurização e condicionamento (Figura 2). A pasteurização deu-se a 59,5°C por 8 horas e o condicionamento a 45,5 °C por 4 dias. Para o controle da temperatura, colocaram-se três sensores no centro da caixa contendo o substrato, média de três caixas. Para o controle das variáveis e registros da Fase II, utilizou-se software VEC-32.



**Figura 2.** Compostagem Fase II: A. disposição das caixas dentro da câmara Dalsem; B. sensor de temperatura no centro do composto; C. painel de controle da pasteurização (59,5°C, 8 horas); D. painel de controle do condicionamento (46,5 °C, 4 dias).

## 2. 5. Variáveis referentes ao substrato

Foi avaliado a dinâmica da umidade, temperatura, perda de massa fresca, teores de carbono e de nitrogênio, relação C/N, teores de celulose, hemicelulose, lignina, fibra bruta e proteína bruta dos substratos.

A umidade dos substratos foi determinada ao final das Fases I e II de compostagem e ao final do cultivo. Para cada tratamento e período de amostragem, foram coletadas três amostras compostas (5 sub-amostras) de aproximadamente 1 kg cada. Homogeneizou-se cada amostra composta e uma porção (550 g) das mesmas foi disposta em bandeja plástica (35 x 40 cm) devidamente tarada e a seguir, determinou-se a massa fresca do substrato em balança (0,001 g precisão). Após, três porções de 100g foram depositadas em saco de papel devidamente tarado e levado para estufa a 105 °C, com ventilação forçada, até peso constante. Em seguida, os sacos foram novamente pesados para a determinação da umidade, conforme a equação:

$$U = \frac{M_{fc} - M_{sc}}{M_{fc}} \times 100$$

onde:

U = Umidade do composto, %;

M<sub>fc</sub> = Massa fresca do composto, g;

M<sub>sc</sub> = Massa seca do composto, g.

A perda de massa dos substrato, entre as Fases I e II de compostagem, foi determinada através da equação:

$$PM_{fcFII} = \frac{M_{fcFI} - M_{fcFII}}{M_{fcFI}} \times 100$$

onde:

PM<sub>fcFII</sub> = Perda de massa fresca do composto ao final Fase II, %;

M<sub>fcFI</sub> = Massa fresca de composto final da Fase I, kg;

M<sub>fcFII</sub> = Massa fresca de composto ao final da Fase II, kg.

A temperatura dos substratos na Fase I de compostagem foi acompanhada através da coleta diária e sempre no mesmo horário, com uso de um sensor localizado no centro da leira.

Para avaliação da dinâmica do carbono, nitrogênio e relação C/N dos substratos, foram realizadas coletas ao final das Fases I e II de compostagem. Avaliou-se 2 amostras (4 sub-amostras) por substrato. Após, estas foram secas em estufa a 105°C e enviadas aos laboratórios do setor de Solos e Nutrição Mineral de Plantas, FCA/UNESP, para determinação dos teores de C, N e relação C/N, de acordo com Brasil (2007).

## **2. 6. Celulose, Hemicelulose e Lignina durante a Fase I e II de compostagem**

As análises bromatológicas dos substratos de cultivo foram realizadas no Laboratório de Bromatologia da FMVZ / UNESP, Botucatu, SP.

### **2. 7. Hemicelulose, celulose e lignina**

A lignina foi determinada a partir do método de Van Soest (1963) e Van soest & Wine (1968) (FDN e FDA) pelo método do ácido sulfúrico a 72%, seguida por incineração do resíduo obtido a 500 °C por 2 h.

A celulose sequencialmente, por diferença de pesos, a partir do resíduo resultante da determinação da lignina e por ultimo a hemicelulose através da diferença dos valores de FDN e FDA.

## **2. 8. Proteína bruta e fibra bruta durante o processo de compostagem**

### **2. 8. 1. Proteína total**

Foi utilizado o método de Kjeldahl que consiste em realizar a digestão da amostra em ácido sulfúrico com um catalisador, que resulta em conversão do

nitrogênio em amônia com posterior destilação da amônia em uma solução receptora e finalmente a quantificação da amônia por titulação com uma solução padrão.

### **2. 8. 2. Fibra total**

As análises de fibra total foram submetidas à metodologia da digestão ácida ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 1,25%) e básica ( $\text{NaOH}$ , 1,25%), durante 30 minutos em cada digestão.

### **2. 9. Delineamento experimental**

O delineamento experimental foi ao acaso, em esquema fatorial  $5 \times 2 \times 4$  (substrato x relação C/N x Fases I e II de compostagem), com quinze repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey (5%). Para tanto, utilizou-se o programa SISVAR 4.2 desenvolvido pelo Departamento de Ciências Exatas, da Universidade Federal de Lavras, MG (UFLA).

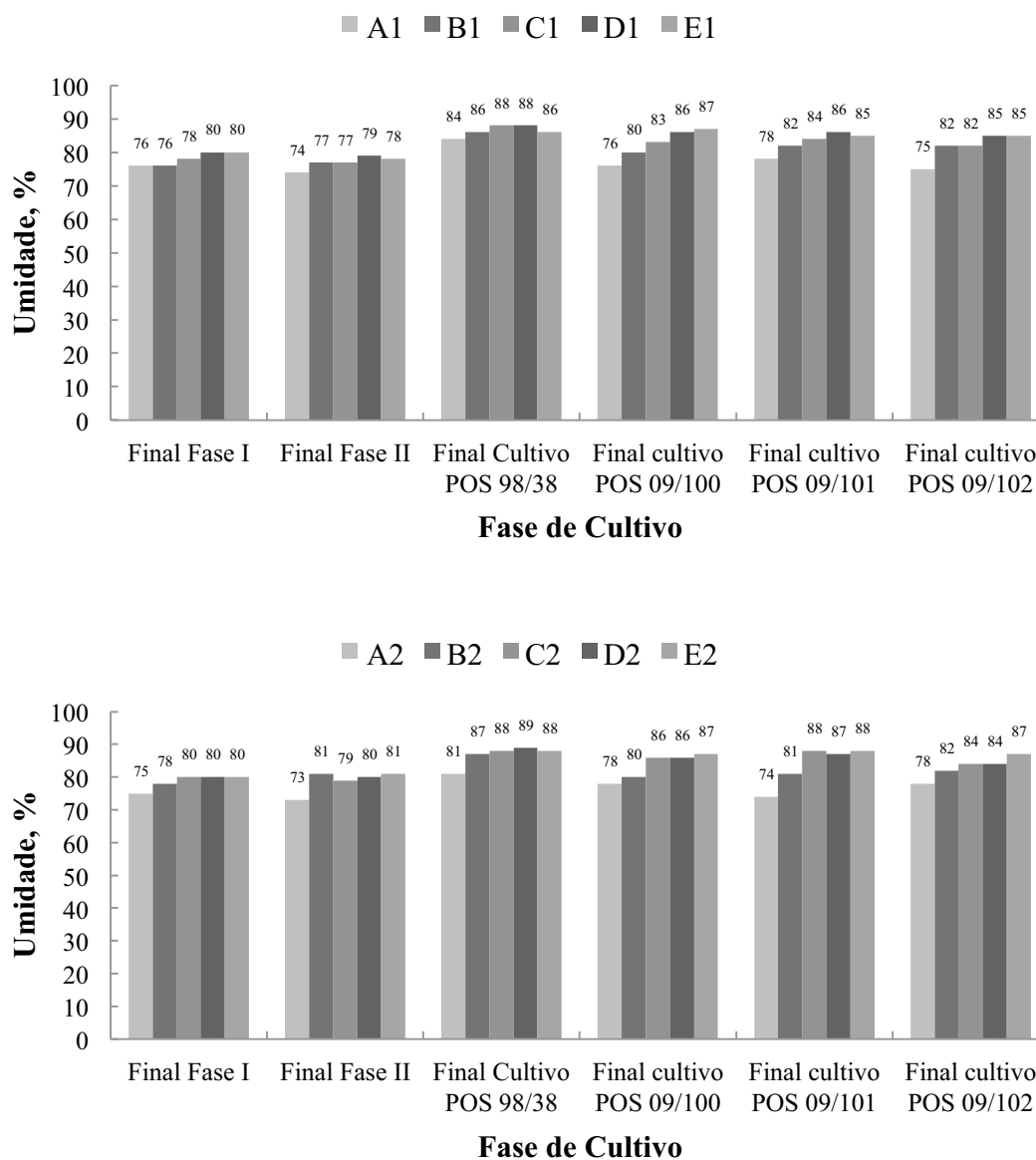
### 3. RESULTADO E DISCUSSÃO

#### 3. 1. Umidade do composto

A umidade do substrato é um dos fatores importante que contribuem para uma condição de degradação aeróbia fornecendo oxigênio em níveis suficiente para o crescimento das comunidades mesófilas e termófilas nativa dos materiais formadores do substrato tendo como resultante um substrato estabilizado quimicamente e biologicamente (Wood, 1984). A umidade média dos substratos durante a compostagem situou-se em 78,2 %, com variações entre 73,1 a 81,3% (Figura 3). Ao final da Fase I de compostagem, a umidade média foi de 78,4 % e ao final da Fase II foi de 78%, valores semelhantes aos observados na literatura (Rollan, 2003; Oei, 2003). Estes autores recomendam umidade do substrato ao final da Fase II entre 70 a 80% e ressaltam ainda que, o grau de umedecimento da pilha varia de acordo com o tipo de material utilizado. Sendo assim, materiais que absorvem água rapidamente seja por motivos químicos, físicos ou estruturais (exemplo materiais fragmentados) requerem muita atenção no momento da irrigação, pois o excesso de água na pilha dificulta a degradação aeróbia favorável em comparação a degradação anaeróbia principalmente em função da degradação rápida, além de que o excesso de água na pilha provoca o escorrimento e conseqüentemente o arraste de nutrientes.

Kopytowski Filho (2006) cita que para o cultivo de *Agaricus blazei* a Fase de pré-umedecimento dos materiais volumosos com uma mistura homogênea dos ingredientes é fator importante para uma umidade adequada ao final da Fase I de

compostagem. Este autor comenta ainda que, dependendo dos materiais utilizados, faz-se necessário o desenvolvimento de um sistema adequado de mistura e umedecimento.



**Figura 3.** Dinâmica da umidade dos substratos ao final da Fase I, II e final de cultivo. substrato: A. capim braquiaria + bagaço de cana; B. palha de cana. + bagaço de cana; C. capim brizantha + bagaço de cana; D. capim tobiatã + bagaço de cana; E. palha de trigo + bagaço de cana. Suplementação do substrato: 1. com farelo de trigo (A1, B1 C1, D1, E1); 2. sem farelo de trigo (A2, B2, C2, D2, E2).

Os substratos C, D e E, independentemente da suplementação, apresentaram maior acúmulo de água ao final das Fases I e II de compostagem. Este fato pode ser resultante não só do tipo de material utilizado como também da proporção dos mesmos. Desta forma, esses substratos tiveram maior quantidade de bagaço em suas formulações fato que pode explicar a umidade mais elevada ao final da Fase I e II de compostagem. O bagaço de cana mais fragmentado e com umidade inicial de 34,85% pode ter contribuído para o acúmulo de água por estes substratos.

Já os substratos A e B tiveram as menores umidades independente da Fase de compostagem exceto o substrato B2 no final da Fase II. Por outro lado, o substrato A com a menor umidade em ambas as Fases teve em sua formulação a mesma quantidade de bagaço do substrato E que teve a maior umidade. Isto pode estar relacionado com a formação estrutural da braquiária, onde a palha de trigo (E) foi capaz de absorver água mais rápido que a braquiaria (A) durante o período de compostagem.

Os substratos mais pobres em nitrogênio, ou seja, sem adição de farelo de trigo, com C/N de 90/1 apresentaram umidade média ligeiramente maior em relação aos substratos com adição de farelo de trigo, com C/N 60:1. Este fato pode se resultante da degradação menor consequentemente menor perda de água na forma de vapor d'água.

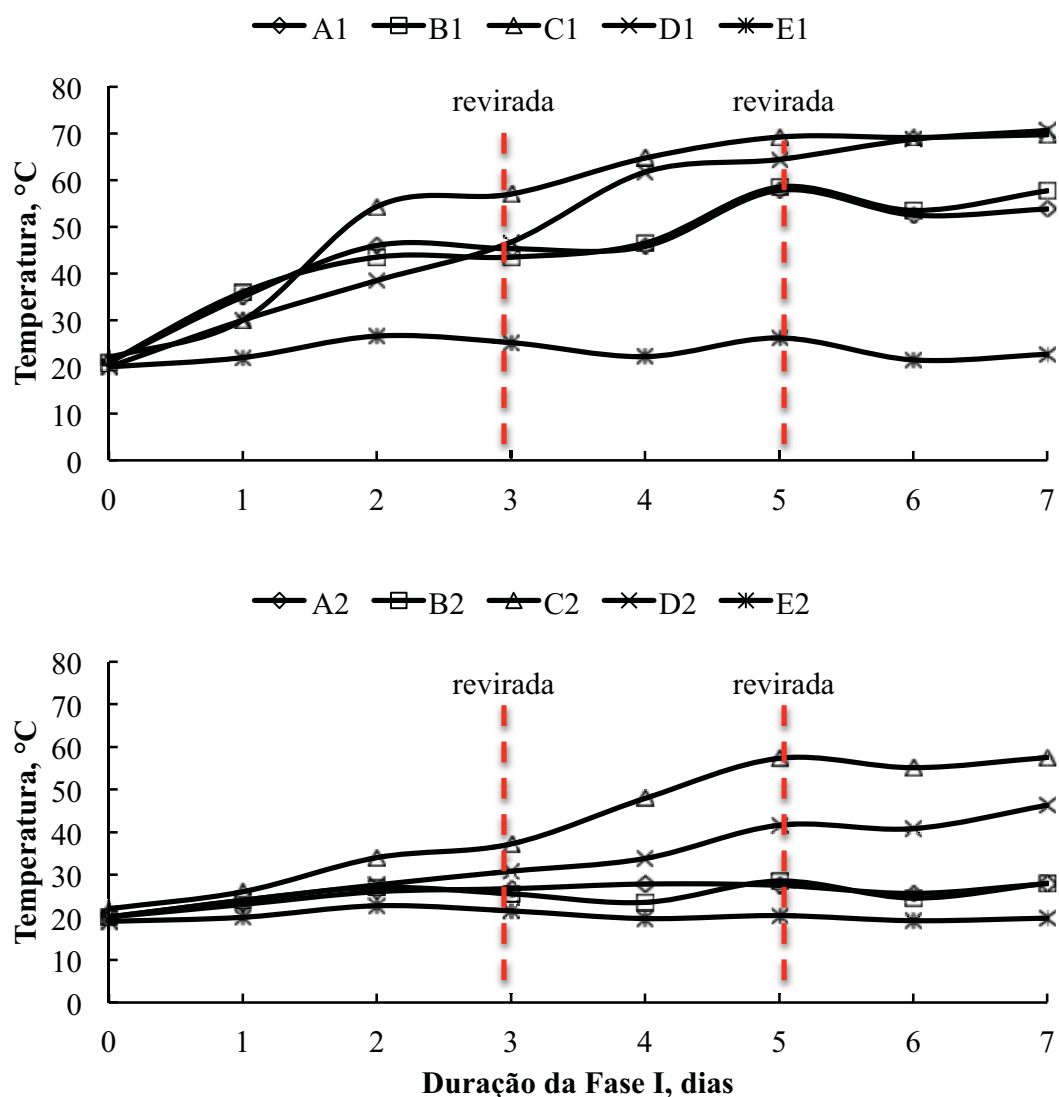
Ao final do cultivo, a umidade média dos substratos foi de 83%, maior em relação à umidade média ao final da Fase II de compostagem (78%). Este fato pode ser explicado pela translocação de água resultante do metabolismo fúngico e ao acúmulo desta no substrato contabilizado a perda de matéria seca extraída pelo fungo para a formação dos basidiomas.

### **3. 2. Temperatura do substrato**

Na compostagem, a temperatura do substrato aumenta após o estabelecimento das condições de compostagem como umidade e/ou algum aditivo que seja de fácil assimilação pelos microrganismos, sendo esta elevação da temperatura resultado da atividade microbiana nativa dos materiais utilizados na formulação do substrato. No presente experimento acompanhou-se a dinâmica da temperatura dos substratos somente durante a Fase



I de compostagem (Figura 4). Na Fase II, pasteurização e condicionamento, a temperatura dos substratos permaneceu controlada em 59,5°C e 46,5°C, respectivamente.



**Figura 4.** Temperatura das leiras durante Fase I de compostagem; substrato: A. capim braquiaria + bagaço de cana; B. palha de cana + bagaço de cana; C. capim brizantha + bagaço de cana; D. capim tobiatã + bagaço de cana; E. palha de trigo + bagaço de cana. Suplementação do substrato: 1. com farelo de trigo (A1, B1 C1, D1, E1); 2. sem farelo de trigo (A2, B2, C2, D2, E2).

A medida e o acompanhamento da dinâmica da temperatura do substrato permite inferir sobre o grau de desenvolvimento da compostagem, o qual varia com a

riqueza (nitrogênio, açúcares solúveis e outros) dos materiais utilizados na elaboração da mesma (Eira; Minhoni, 1997). Quanto mais rico o substrato, menor o tempo requerido para a compostagem. A temperatura pode chegar a 70 °C, dependendo do material utilizado e manejo adotado (reviradas e umedecimento) (Van Griensven, 1988).

A temperatura dos substratos durante a Fase I de compostagem variou em função do tempo e também em função da suplementação nitrogenada. Os substratos mais ricos, ou seja, de C/N de 60:1 em função da presença de farelo de trigo, apresentaram temperaturas maiores, de 21,5 a 70,6 °C, com média de 46,8 °C. Já os substratos mais pobres, ou seja, C/N de 90/1 apresentaram temperaturas menores, de 19,2 a 57,5 °C, com média inferior de 30,4 °C possivelmente pelo fornecimento de nitrogênio e carbono insolúvel favorecendo a degradação aeróbia e consequente aumento da temperatura.

Os substratos mais ricos apresentaram temperatura média maior, 30,6 °C, já no primeiro dia, imediatamente após a formação da leira. Por outro lado, para os substratos mais pobres, a temperatura média inicial foi de apenas 23,4 °C. Esta condição de temperatura inicial mais elevada nos substratos mais ricos certamente favoreceu o metabolismo microbiano nestes substratos. Segundo Miler et al. (1989), temperaturas mais elevadas estão relacionadas com taxas maiores de atividade microbiana. Estes microorganismos exercem um efeito benéfico sobre a nutrição do fungo cultivado. Este fato foi constatado visualmente nos substratos mais ricos (relação C/N de 60/1), os quais apresentaram coloração branca ao final da Fase II de compostagem, o que indica a presença de actinobactérias. Segundo Fermor et al. (1979), a presença bactérias e actinobactérias termófilas, no substrato estimula o crescimento miceliano do fungo cultivado, pela produção de aminoácidos, vitaminas e polissacarídeos. Associe-se a isso também, o fato de que essa biomassa também é uma fonte de nitrogênio e outros nutrientes para o cogumelo.

### **3. 3. Perda massa do substrato durante a compostagem**

A perda de matéria fresca do substrato é consequente, principalmente da atividade microbiana presente no substrato (Van Griensven, 1988). As perdas podem chegar a 35%, e ocorrendo o aumento relativo no teor de N-total em até 1% (base seca) do valor inicial dependendo da composição do substrato onde que com o aumento

do nitrogênio, resultando substratos mais ricos com relação C/N em torno de 25:1 pode acelerar a compostagem promovendo maiores perdas da matéria fresca (Oei, 2003; Urban, 2004).

A perda média de massa fresca, durante a Fase II de compostagem foi 36% sendo maior para os substratos suplementados com farelo de trigo em relação aos substratos não suplementados especialmente nos substratos A1, B1 e E1, (braquiaria, palha de cana-de-açúcar e palha de trigo, respectivamente) com 20,5%, 17,2% e 17,2% de perda de massa fresca entre o final da Fase I e final da Fase II de compostagem, respectivamente (Tabela 4). Ademais, estes substratos mais ricos apresentaram temperatura mais elevada e redução mais acentuada da relação C/N durante o processo de compostagem. Isto foi reportado por Siqueira (2006), que trabalhando com *A. blazei*, verificou que concentrações menores de nitrogênio inicial no substrato reduzem a perda de matéria seca a medida que se aumenta o teor de N, ocorrem maiores perdas de matéria seca do substrato com consequente perda de matéria fresca.

**Tabela 4.** Perda de massa fresca (%) dos diferentes substratos, no período entre o final da Fase I e II de compostagem (média de dez repetições).

Substrato <sup>(1, 2)</sup>	Perda massa, %
A1	20,5 A a <sup>(3)</sup>
B1	17,2 AB a
C1	13,5 B a
D1	14,2 B a
E1	17,2 AB a
média	16,5
A2	10,0 A b
B2	11,5 A b
C2	9,7 A b
D2	10,0 A b
E2	11,7 A b
média	10,6

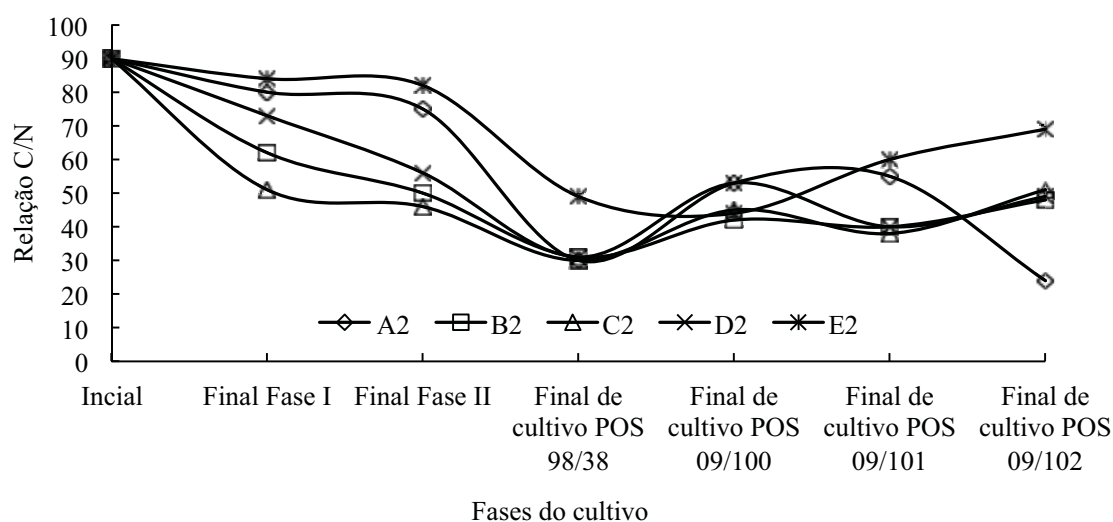
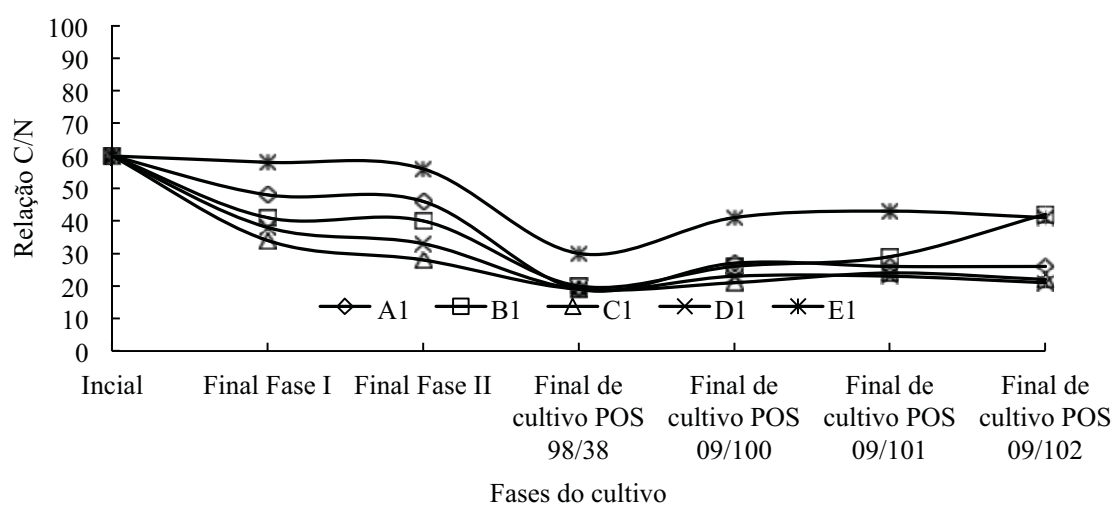
(1) Substrato: A. capim braquiaria + bagaço de cana; B. palha de cana. + bagaço de cana; C. capim brizantha + bagaço de cana; D. capim tobiatã + bagaço de cana; E. palha de trigo + bagaço de cana.

(2) Suplementação do substrato: 1. com farelo de trigo (A1, B1 C1, D1, E1); 2. sem farelo de trigo (A2, B2, C2, D2, E2).

(3) Letras maiúsculas comparam médias dentro da mesma relação C/N (Tukey, 5%); Letras minúsculas comparam médias dentro de um mesmo substrato, nas duas relações C/N (Tukey, 5%).

### 3. 4. Relação C/N e índice pH do composto

A composição química do substrato é o método tradicional de estudar-se a qualidade do substrato de cultivo, com ênfase no pH e relação C/N (Gerrits et al., 1967; Femor et al., 1985). Para todos os tratamentos, a relação C/N diminuiu ao final de cada Fase de compostagem, (Figura 5).



**Figura 5.** Dinâmica da relação C/N dos substratos, desde a montagem das leiras até o final da Fase II de compostagem. Substrato: A. capim braquiaria + bagaço de cana; B. palha de cana + bagaço de cana; C. capim brizantha + bagaço de cana; D. capim tobiatã + bagaço de cana; E. palha de trigo + bagaço de cana. Suplementação do substrato: 1. com farelo de trigo (A1, B1 C1, D1, E1); 2. sem farelo de trigo (A2, B2, C2, D2, E2).

A porcentagem média de redução foi maior para os substratos adicionados de farelo de trigo, ou seja, 27% e 32%, respectivamente ao final das Fases I e II. Por outro lado, na ausência do farelo de trigo, as reduções médias na relação C/N inicial foram de 6,7% ao final de Fase I e 31% ao final da Fase II de compostagem. Este fato também era esperado, pois quanto menor a relação C/N do material, mais rápido é o metabolismo microbiano e, conseqüentemente, as perdas de C na forma de CO<sub>2</sub> são aumentadas (Eira; Minhoni, 1997). Este comportamento tem relação direta com o grau de aquecimento dos substratos. Substratos mais ricos apresentaram temperatura média maior (46,8 °C) em relação aos substratos mais pobres (30,5 °C).

Observou-se também que, ao longo do processo de compostagem, a amplitude da diferença entre as relações C/N iniciais dos substratos, 30:1 aumentou para 40:1 no final da Fase I e diminuiu para 15:1, final da Fase II. Este aumento na amplitude entre a Fase inicial e o final da Fase I é em função da redução maior nos substratos suplementados. A adição de farelo de trigo e a relação C/N inicial de 60:1 favoreceu a degradação nestes substratos. Isto é evidenciado pelas maiores temperaturas durante a Fase I de compostagem. Já os substratos não suplementados apresentaram reduções mais significativas durante a Fase II de compostagem, onde os substratos entraram nesta fase com relação C/N de 84:1 aliado a temperatura controlada de condicionamento (46,5 °C) sendo esta maior que a temperatura durante a Fase I de compostagem para os substratos mais pobres.

Quanto ao pH dos substratos, este situou-se entre 6,3 a 8,0, com média de 7,2. Estes índices são favoráveis à atividade microbiana, especialmente para bactérias e actinobactérias, cuja atividade é sempre desejada para o sucesso da compostagem e consequente desenvolvimento e produção do fungo cultivado (Tabela 5).

**Tabela 5.** Índice pH dos substratos ao final das Fases I e II de compostagem.

Substrato <sup>(1, 2)</sup>	---- Compostagem ----	
	Fase I	Fase II
A1	7,3	6,7
B1	6,6	7,2
C1	8,0	6,6
D1	8,0	6,8
E1	6,9	7,5
Média	7,4	6,9
A2	7,3	7,9
B2	6,9	7,7
C2	7,9	7,6
D2	7,7	6,3
E2	7,2	6,8
Média	7,4	7,3

(1) Substratos: A. capim braquiaria + bagaço de cana; B. palha de cana. + bagaço de cana; C. capim brizantha + bagaço de cana; D. capim tobiatã + bagaço de cana; E. palha de trigo + bagaço de cana.

(2) Suplementação do substrato: 1. com farelo de trigo (A1, B1 C1, D1, E1); 2. sem farelo de trigo (A2, B2, C2, D2, E2).

### 3. 5. Fibra total, Proteína total, Celulose, Hemicelulose e

#### Lignina

Na tabela 6, encontram-se os valores de F obtidos na análise de variância para as variáveis fibra total, proteína total, celulose, hemicelulose e lignina para os substratos nos dois níveis de relação C/N.

**Tabela 6.** Valores de F obtido na análise de variância para as variáveis de fibra total, proteína total, celulose, hemicelulose e lignina dos diferentes substratos nos dois níveis de relação C/N ao final das Fases I e II de compostagem.

Fator de variação	FT	PT	celulose	hemicelulose	lignina
Substrato (S)	10,18 *	15,45 *	13,40 *	13,33 *	13,95*
Relação C/N (R)	54,58 *	85,91 *	43,19 *	4,18 <sup>ns</sup>	17,05 *
Fases (F)	11,75 *	0,20 <sup>ns</sup>	1,47 <sup>ns</sup>	0,07 <sup>ns</sup>	1,71 <sup>ns</sup>
S x R x F	2,16 <sup>ns</sup>	0,85 <sup>ns</sup>	2,37 <sup>ns</sup>	3,14 *	0,60 <sup>ns</sup>

\* significativo; ns: não significativo (Tukey, 5%).

FT = fibra total, PT = proteína total.

### **3. 6. Fibra total e proteína total durante o processo de compostagem**

#### **3. 6. 1. Fibra total**

A fração fibra total dos materiais orgânicos é composta principalmente de celulose, lignina e pequena quantidade de hemicelulose e substâncias pécnicas (HILTON, et al., 1983).

O teor de fibra total foram maiores nos substratos C1 (38,49%) e E1 (36,59%) no final da Fase I permanecendo na Fase II os mesmos substratos C1 (41,28%) e E1 (39,37%) (Tabela 6). Segundo Andriquetto et al. (1981) a composição desta fração pode variar de acordo com a espécie e idade da planta. Para os substratos com relação C/N de 90:1 os substratos B2 (46,99%) e C2 (44,93%) na Fase I e os substratos C2 (45,30%) e E2 (46,07%) na Fase II apresentaram os maiores teores de fibra total.

O teor de fibra total dos substratos suplementados (C/N de 60:1) aumentou entre o final da Fase I e o final da Fase II de compostagem. Observa-se também, que a média geral da fibra total foi maior ao final da fase II de compostagem (Tabela 7). Este fato pode ser explicado em função do calculo da fibra total, onde é relativamente comparada com a composição total do material e, ao final da fase II de compostagem os componentes de fácil assimilação, como o farelo de trigo, foram assimilados pela comunidade microbiana ali presente.

Para os substratos com relação C/N de 90:1 nota-se o efeito oposto, onde o teor de fibra total diminui ligeiramente, porém o teor médio é superior quando comparado com os substratos de relação C/N de 60:1.

**Tabela 7.** Teor de fibra total (%) dos substratos ao final das fases I e II de compostagem.

Substrato <sup>(1, 2)</sup>	Compostagem	
	Fase I	Fase II
A1	32,67 AB b <i>b</i> <sup>(3)</sup>	37,66 A a a
B1	34,03 AB b <i>b</i>	39,30 A a a
C1	38,49 A a <i>b</i>	41,28 A a a
D1	28,54 B b <i>b</i>	38,68 A a a
E1	36,59 A a <i>b</i>	39,37 A a <i>b</i>
Média	34,06	39,27
A2	38,54 BC a a	39,46 AB a a
B2	46,99 A a a	39,07 B b a
C2	44,93 AB a a	45,30 AB a a
D2	37,06 C a a	41,04 AB a a
E2	43,71 ABC a a	46,07 A a a
Média	42,24	42,18

(1) Substrato: A. capim braquiaria + bagaço de cana; B. palha de cana. + bagaço de cana; C. capim brizantha + bagaço de cana; D. capim tobiatã + bagaço de cana; E. palha de trigo + bagaço de cana;

(2) Suplementação do substrato: 1. com farelo de trigo (A1, B1 C1, D1, E1); 2. sem farelo de trigo (A2, B2, C2, D2, E2);

(3) Médias seguidas por letras maiúsculas iguais na coluna dentro da mesma relação C/N não diferem entre si (Tukey, 5%); letras minúsculas na mesma linha não diferem entre si (Fases I e II) (Tukey, 5%); letras em *itálico* iguais na coluna no mesmo substrato comparam a relação C/N (Tukey, 5%); CV = 6,02.

### 3. 6. 2. Proteína total

Ao contrário da fibra total a proteína total dos diferentes substratos dentro de cada relação assim como entre as Fases de compostagem não diferiram estatisticamente (Tukey, 0,5%), apresentando um ligeiro aumento entre a Fase I e o Final da Fase II independente da relação C/N (Tabela 8). Este fato pode estar correlacionado com o aumento da população nativa de microrganismos presente no substrato o qual transformou parte dos componentes da fibra tais como lignina, hemicelulose em proteína fúngica e através da liberação de CO<sub>2</sub> para o ambiente fato constatado na diminuição da relação C/N. Foram observadas diferenças significativas entre alguns substratos com relação C/N de 60:1 independente da Fase.

Na comparação entre as diferentes relações C/N nota-se que os valores médios de proteína total foram maiores para os substratos suplementados, fato



explicado pela suplementação com farelo de trigo (20% de nitrogênio) acelerando o crescimento da comunidade microbiana ali presente, conseqüentemente a incorporação na forma de nitrogênio orgânico (proteína fúngica).

**Tabela 8.** Teor de proteína total (%) dos substratos ao final das fases I e II de compostagem.

Substrato <sup>(1, 2)</sup>	Compostagem	
	Fase I	Fase II
A1	8,33 B a a	8,03 AB a a
B1	5,90 BC a a	7,99 AB a a
C1	9,99 AB a a	10,75 A a a
D1	13,34 A a a	9,69 A a a
E1	3,09 C b a	4,95 B a a
Média	8,13	8,22
A2	3,14 A a b	2,94 A a b
B2	4,51 A a a	4,82 A a b
C2	4,52 A a b	5,70 A a b
D2	5,25 A a b	4,58 A a b
E2	2,20 A a a	2,82 A a a
Média	3,92	4,17

(1) Substrato: A. capim braquiaria + bagaço de cana; B. palha de cana. + bagaço de cana; C. capim brizantha + bagaço de cana; D. capim tobiatã + bagaço de cana; E. palha de trigo + bagaço de cana;

(2) Suplementação do Substrato: 1. com farelo de trigo (A1, B1 C1, D1, E1); 2. sem farelo de trigo (A2, B2, C2, D2, E2);

(3) Médias seguidas por letras maiúsculas iguais na coluna dentro da mesma relação C/N não diferem entre si (Tukey, 5%); letras minúsculas na mesma linha não diferem entre si (Fases I e II) (Tukey, 5%); letras em itálico iguais na coluna no mesmo substrato comparam a relação C/N (Tukey, 5%); CV = 23,14.

### 3. 6. 3. Celulose

O crescimento da comunidade microbiana do substrato inicialmente acontece a custa de carbono solúvel e compostos nitrogenados e depois de esgotados o crescimento da comunidade microbiana passa a utilizar produtos de degradação de frações insolúveis tais como celulose, hemicelulose e Proteína (Wood, 1984). Normalmente o teor de celulose sofre alterações a partir do surgimento das actinomicetes próximo ao fim do período de altas temperaturas da meda de substrato e durante a Fase II totalmente controlada a qual confere uma temperatura a comunidade mesófila (Bertoldi et al., 1983).

Para a variável celulose, os substratos suplementados com farelo de trigo (relação C/N de 60:1), observou-se diferenças estatísticas para o tipo de material utilizado no substrato, sendo os maiores valores encontrados no substratos à base de palha de trigo independente da relação C/N e da Fase de compostagem (Tabela 9). Já para os substratos sem suplementação de farelo de trigo (relação C/N de 90:1) o teor de celulose não diferiu estatisticamente para o tipo de material utilizado no substrato e entre as fases de compostagem.

**Tabela 9.** Teor de celulose (%) dos substratos com relação C/N de 60:1 e 90:1 ao final das Fases I e II de compostagem.

Substrato <sup>(1, 2)</sup>	---- Compostagem ----	
	Fase I	Fase II
A1	24,41 BC a <i>b</i> <sup>(3)</sup>	23,30 C a <i>b</i>
B1	32,43 B a <i>a</i>	28,41 BC a <i>b</i>
C1	34,12 AB a <i>b</i>	40,05 AB a <i>a</i>
D1	29,27 BC b <i>b</i>	33,30 ABC a <i>b</i>
E1	46,45 A a <i>a</i>	41,59 A a <i>a</i>
Média	31,33	33,33
A2	42,44 A a <i>a</i>	41,31 A a <i>a</i>
B2	33,71 A a <i>a</i>	38,16 A a <i>a</i>
C2	44,02 A a <i>a</i>	38,93 A a <i>a</i>
D2	37,62 A a <i>a</i>	42,25 A a <i>a</i>
E2	45,01 A a <i>a</i>	48,46 A a <i>a</i>
Média	40,56	41,82

(1) Substrato: A. capim braquiaria + bagaço de cana; B. palha de cana. + bagaço de cana; C. capim brizantha + bagaço de cana; D. capim tobiatã + bagaço de cana; E. palha de trigo + bagaço de cana;

(2) Suplementação do substrato: 1. com farelo de trigo (A1, B1 C1, D1, E1); 2. sem farelo de trigo (A2, B2, C2, D2, E2);

(3) Médias seguidas por letras maiúsculas iguais na coluna dentro da mesma relação C/N não diferem entre si (Tukey, 5%); letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem entre si (Tukey, 5%); letras em itálico iguais na coluna no mesmo substrato comparam a relação C/N (Tukey, 5%); CV = 11,61.

O teor de celulose apresentou diferença estatística quando comparado nas duas relações C/N, sendo encontrados maiores valores nos substrato com relação C/N de 90:1. Esta fato pode estar associado a suplementação do substrato, o que favoreceu a comunidade microbiana presente no substrato.

Entre as Fases de compostagem o teor médio de celulose independente do substrato não ocorreu diferença significativa (Tukey, 5%).

#### **3. 6. 4. Hemicelulose**

Os teores de hemicelulose para os substratos do grupo 1 (suplementados com relação C/N inicial de 60:1) apresentaram média de 23,36% durante a Fase I, 24,64% ao final da Fase II e os substratos do grupo 2 (sem suplementação com relação C/N inicial de 90:1) apresentaram teores médios de 25,76% e 24,82 nas Fase I e II, respectivamente (Tabela 10). Segundo Chahal et al. (1987) estes valores podem variar entre 20 a 30 % dependendo do tipo de material e/ou da mistura destes.

Para os substratos do grupo 1 (suplementados) foram observadas diferenças significativas entre os substratos somente na Fase I não sendo detectadas diferenças estatisticamente significativas entre as Fases I e II. O maior valor de hemicelulose na Fase I e II foi observado para o substrato à base de palha de trigo E2, 30,66% e 28,22, respectivamente (Tabela 10).

**Tabela 10.** Teor de Hemicelulose (%) dos substratos com relação C/N de 60 e 90:1 ao final das Fases I e II de compostagem.

Substrato <sup>(1, 2)</sup>	---- Compostagem ----	
	Fase I	Fase II
A1	23,77 AB a <i>b</i> <sup>(3)</sup>	24,21 A a <i>a</i>
B1	26,26 A a <i>a</i>	25,32 A a <i>a</i>
C1	20,87 AB a <i>b</i>	22,54 A a <i>a</i>
D1	19,92 B a <i>b</i>	23,84 A a <i>a</i>
E1	26,01 A a <i>b</i>	27,30 A a <i>a</i>
Média	23,36	24,64
A2	29,52 A a <i>a</i>	24,88 AB b <i>a</i>
B2	21,55 BC b <i>b</i>	27,27 A a <i>a</i>
C2	26,58 AB a <i>a</i>	23,32 AB a <i>a</i>
D2	20,51 C a <i>c</i>	20,43 B a <i>a</i>
E2	30,66 A a <i>a</i>	28,22 A a <i>a</i>
Média	25,76	24,82

(1) Substrato: A. capim braquiaria + bagaço de cana; B. palha de cana. + bagaço de cana; C. capim brizantha + bagaço de cana; D. capim tobiatã + bagaço de cana; E. palha de trigo + bagaço de cana;

(2) Suplementação do substrato: 1. com farelo de trigo (A1, B1 C1, D1, E1); 2. sem farelo de trigo (A2, B2, C2, D2, E2);

(3) Médias seguidas por letras maiúsculas iguais na coluna dentro da mesma relação C/N não diferem entre si (Tukey, 5%); letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem entre si (Tukey, 5%); letras em itálico iguais na coluna no mesmo substrato comparam a relação C/N (Tukey, 5%); CV = 8,08.

### 3. 6. 5. Lignina

Para a variável lignina observou-se diferenças estatísticas significativas entre os substratos (tipo de material) tanto para o grupo 1 (suplementados com relação C/N de 60:1) como para o grupo 2 (sem suplementação, com relação C/N inicial de 90:1) isso pode estar relacionado com o tipo de material, sendo explicado pela distinção dos materiais utilizados na elaboração dos substratos assim como idade das plantas.

Entre as Fases I e II não foram observadas diferenças significativas estatisticamente para nenhum dos grupos (1 e 2) somente entre as relações C/N podendo haver correlação com a maior disponibilidade de nitrogênio nos substratos do grupo 1. Segundo Maziero (1990) muito nitrogênio disponível seja pela adição de aditivos ou pela riqueza do material reprime a degradação da Lignina durante a compostagem.

O substrato com maior teor de lignina independentemente da fase de compostagem foi à base de capim tobiatã para o grupo 1 (substratos suplementados). Isto pode ter relação com a maior quantidade de bagaço de cana adicionado na formulação para ajuste da relação C/N. Ao contrário ocorreu com o grupo 2 (substratos sem suplementação) onde o substrato com maior teor de lignina ao final da Fase II de compostagem foi o de capim brizantha o qual tinha menos bagaço de cana na formulação (Tabela 11).

**Tabela 11.** Teor de lignina (%) dos substratos com relação C/N de 60 e 90:1 ao final das Fases I e II de compostagem.

Substrato <sup>(1, 2)</sup>	Compostagem	
	Fase I	Fase II
A1	13,62 BC a a <sup>(3)</sup>	11,42 AB a a
B1	10,64 C a a	11,70 B a a
C1	18,52 AB a a	14,96 AB a a
D1	20,92 A a a	16,81 A a a
E1	8,54 C a a	9,03 C a a
Média	14,44	12,78
A2	8,98 A a b	7,88 B a b
B2	9,54 A a a	10,93 AB a a
C2	13,29 A a b	14,66 A a a
D2	12,24 A a b	10,81 AB a b
E2	10,23 A a a	9,38 AB a a
Média	10,85	10,73

(1) Substrato: A. capim braquiaria + bagaço de cana; B. palha de cana. + bagaço de cana; C. capim brizantha + bagaço de cana; D. capim tobiatã + bagaço de cana; E. palha de trigo + bagaço de cana.

(2) Suplementação do substrato: 1. com farelo de trigo (A1, B1 C1, D1, E1); 2. sem farelo de trigo (A2, B2, C2, D2, E2).

(3) Médias seguidas por letras maiúsculas iguais na coluna dentro da mesma relação C/N não diferem entre si (Tukey, 5%); letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem entre si (Tukey, 5%); letras em itálico iguais na coluna no mesmo substrato comparam a relação C/N (Tukey, 5%); CV = 17,71.

#### 4. CONCLUSÕES

A suplementação do substrato influenciou a temperatura do substrato durante a Fase I (sem controle) elevando-a nos substratos com relação C/N de 60:1 (suplementados) permitindo maior velocidade de degradação dos compostos presentes nestes substratos, demonstrado pelo estreitamento da relação C/N;

A perda de massa fresca do substrato foi influenciada pela suplementação com farelo de trigo e pela Fase de compostagem;

O teor de proteína total foi maior nos substratos mais ricos com relação C/N de 60:1 ao contrário foi observado para os teores de fibra total onde os substratos mais ricos apresentaram menores teores;

Os teores de celulose, hemicelulose e lignina ao final das Fase I e II foram influenciados pela suplementação e pelo tipo de material utilizado na elaboração dos substratos.

## 5. REFERÊNCIAS

- ANDRIGUETTO, J. M. et al. **Os princípios nutritivos e suas finalidades**. 3. ed. São Paulo: Nobel, 1981. 395 p.
- BERTOLDI, M.; VALLINI, G.; PERA, A. The biology of composting: a review. **Waste Management & Research**, London, v. 1. p. 157-176, 1983.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual de métodos analíticos oficiais para fertilizantes minerais, orgânicos, organominerais e corretivos**. Brasília, DF, 2007. Disponível em: <[http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/PDF/in\\_28\\_07\\_anexo.pdf](http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/PDF/in_28_07_anexo.pdf)>. Acesso em: 23 jul. 2010.
- CHAHAL, D. S. et al. Bioconversion of hemiceluloses into fungal protein. **Journal of Industrial Microbiology**, Heidelberg, v. 1, n. 6, p. 55-61, 1987.
- DIAS, E. S. Mushroom cultivation in Brazil: challenges and potential for growth. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 4. p. 795-803, 2010.
- EIRA A. F.; MINHONI, M. T. A. **Manual de cultivo do "hiratake" e "shimeji" (*Pleurotus spp.*)**. Botucatu: FEPAF, 1997. 95 p.
- FERMOR, T. R.; RANDLE, P. E.; SMITH, J. F. Compost as a substrate and its preparation. In: FLEGG, P. B.; SPENCER, D. M.; WOOD, D. A. (Ed.). **The biology and technology of the cultivated mushroom**. Chichester: John Wiley, 1985. p. 81-109.
- FERMOR, T. R.; SMITH, J. F.; SPENCER, D. M. The microflora of experimental mushroom composts. **Journal of Horticultural Science**. Ashford, v. 54, n. 2, p. 137-147, 1979.

GERRITS, J. P. G.; VAN GRIENSVAN, L. J. L. D. New developments in indoor composting. **Mushroom Journal**, Stamford, v. 205, p. 21-29, 1990.

GERRITS, J. P. G.; BELS-KONING, H. C.; MULLER, F. M. Changes in mushroom compost constituents during composting, pasteurization and cropping. **Mushroom Science**, Leamington Spa, v. 6, p. 225-243. 1967.

GERRITS, J. P. G. et al. Phase I process in tunnels for the production of *Agaricus bisporus* compost with special reference to importance of water. **Mushroom Science**, Leamington Spa, v. 1, n. 14, p. 203-212, 1995.

HILTON, J. W.; ATKINSON, J. L.; SLINGER, S. J. Effect of increased dietary fiber on the growth of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science**, Montreal, v. 40, p. 81-85, 1983.

KAMIDA, H. M. et al. Biodegradação de efluentes têxteis por *Pleurotus sajor-caju*. **Química Nova**, São Paulo, v. 28, n. 4, p. 629-632, 2005.

KOPYTOWSKI FILHO, J. **Produtividade e eficiência biológica de *Agaricus blazei* (Murrill) Heinemann, em diferentes condições de cultivo**. 2006. 134 f. Tese (Doutorado em Agronomia/Energia na Agricultura)-Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2006.

LABORDE, J. et al. La préparation express des substrats pour la culture du champignon de couche. **Mushroom Science**, Leamington Spa, v. 8, p. 675-706, 1971.

LEÓN, V. T. C.; LARA, H. L. Factores que influyen em La producción de substratos selectivos para El cultivo de *Pleurotus ostreatus*. In: SÁNCHEZ VÁZQUEZ, J. E.; OEI, P. **Mushroom cultivation**. 3rd. ed. Leiden: Backhuys Publishers, 2003. p. 56-69.

MAZIERO, R. **Substratos alternativos para o cultivo de *Pleurotus* spp.** 1990. 136 f. Dissertação (Mestrado em Química)-Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1990.

MILLER, F. C.; HARPER, E. R.; MACAULEY, B. J. Field examination of temperature and oxygen relationships in mushroom composting stacks-consideration of stack oxygenation based on utilization and supply. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, Oxford, v. 29, p. 741-750, 1989.

MUEZ-ORORBIA, M.; PARDO-NUÑEZ, J. La preparación del sustrato. In: SÁNCHEZ, E. J.; ROYSE, D. (Ed.). **La biología y el cultivo de *Pleurotus* spp. en México**. Chiapas: ECOSUR, 2001. p. 44-62.

OEI, P. **Mushroom cultivation**. 3rd. ed. Leiden: Backhuys Publishers, 2003. 429 p.

ROLLAN, G. M. **Cultivo de setas y trufas**. Madri: Mundi-Prensa, 2003. 239 p.



SHARMA, H. S. S.; LYONS, G.; CHAMBERS, J. Comparison of the changes in mushroom (*Agaricus bisporus*) compost during windrow and bunker stages of phase I and II. **Association of Applied Biologists**, New York, v. 136, p. 59-68, 2000.

SIQUEIRA, F. G. **Efeito do teor de nitrogênio, inoculantes e métodos de compostagem para cultivo de *Agaricus blazei***. 2006. 124 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia)- Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.

SMITH, J. F.; SPENCER, D. M. Rapid preparation of composts suitable for the production of the cultivated mushroom. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 5, p. 23-31, 1976.

STAMETS, P.; CHILTON, J. S. The mushroom cultivator. Washington, DC: Agarikon Press, 1983. 595 p.

STÖLSER, S.; GRABBE, K. Mechanisms of substrate selectivity in the cultivation of edible fungi. In: MAHER, M. J. (Ed.). **Science and cultivation of edible fungi**. Rotterdam: Balkema, 1991. v. 1, p. 141-146.

STRAATSMA, G. et al. Adjustment of the composting process for mushroom cultivation based on initial substrate composition. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 72, n. 1, p. 67-74, 2000.

STRAATSMA, G. et al. Bioconversion of cereal straw into mushroom compost. **Canadian Journal of Botany**, Montreal, v. 73, p. 1019-1024, 1995.

STRAATSMA, G. et al. Population dynamics of *Scytalidium thermophilum* in mushroom compost and stimulatory effects on growth rate and yield of *Agaricus bisporus*. **Journal of General Microbiology**, Berks, v. 135, p. 751-759, 1989.

URBEN, A. F. **Produção de cogumelos por meio de tecnologia chinesa modificada**. Brasília, DF: Embrapa, 2004. 187 p.

VAN GRIENSVEN, L. J. L. D. **The cultivation of mushrooms**. Horst: Mushroom Experimental Station, 1988. 515 p.

VAN SOEST, P. J. Use of detergents in the analyses of fibrous feeds, 2. A rapid method for the determination of fiber and lignin. **Journal Association Official Analytical Chemical**, Gaithersburg, v. 46, p. 829-835, 1963.

VAN SOEST, P. J.; WINE, R. H. Determination of lignin and cellulose in acid detergent fiber with permanganate. **Journal Association Official Analytical Chemical**, Gaithersburg, v. 51, p. 780-785, 1968.

VEDDER, P. J. C. **Cultivo moderno del champiñón**. Madrid: Mundi-Prensa, 1996. 369 p.

WOOD, D. A. Microbial processes in mushroom cultivation: a large scale solid substrate fermentation. **Journal Chemistry Technology and Biotechnology**, West Sussex, v. 34, p. 232-240, 1984.

WOOD, D. A.; FERMOR, T. R. Nutrition of *Agaricus bisporus*. In: FLEGG, P. B.; SPENCER, D. M.; WOOD, D. A. (Ed.). **The biology of the cultivated mushroom**. Chichester: John Wiley & Sons, 1985. p. 43-66.

## **CAPÍTULO 4: PRODUÇÃO E CARACTERÍSTICAS BROMATOLÓGICAS DE LINHAGENS DE *Pleurotus ostreatus* CULTIVADAS EM DIFERENTES SUBSTRATOS COM OU SEM SUPLEMENTAÇÃO**

### **1. INTRODUÇÃO**

O cogumelo *Pleurotus* spp. tem um histórico de cultivo industrial recente no ocidente, pois foi somente no início do século passado que alemães, à procura de uma fonte opcional de proteína para o período de guerra, desenvolveram o seu cultivo (LABORDE; DELMAS, 1971). Em módulo industrial, o cultivo de *P. ostreatus* teve início na Alemanha no final da segunda guerra mundial (JOB, 2004). Deste então o consumo na cultura ocidental vem aumentando. Um grande crescimento pode ser atestado pelos seguintes números: em 1995, a produção anual mundial foi de 2,0 milhões de toneladas e, em 2005, aumentou para 3,3 milhões de toneladas, ou seja, mais de 60% em 10 anos (CHANG; MILES, 2004).

O cogumelo *Pleurotus* possui vários nomes populares, como por exemplo no Japão quando colhido jovem chama-se “Shimeji” e “Hiratake” quando colhido com píleo maior já num estado de maturação avançado. Em inglês o nome deste cogumelo é “Oyster Mushroom” derivando-se do nome grego *Pleurotus* que significava ostra e com formação lateral ao estípite.

Com o evidenciado potencial de degradação de resíduos lignocelulósicos e produção de basidiomas de alto valor nutritivo, Fermor e Wood (1991) sugerem o incentivo do cultivo destes fungos em países do chamado Terceiro Mundo, como forma de amenizar a deficiência protéica existente nestas regiões.

No Brasil, o gênero *Pleurotus* foi introduzido por volta de 1980, sendo utilizado o substrato bagaço de cana-de-açúcar, devido a abundância como resíduo da produção de açúcar e álcool combustível (MAZIERO et al., 1992). Cenário diferente nos dias atuais com a concorrência do uso deste resíduo para a geração de energia térmica pelas usinas e promovendo a falta deste material boa parte do ano sendo direcionado pesquisas para novos materiais que viabilize a utilização no cultivo de cogumelos. O cogumelo *Pleurotus* está conquistando espaço no mercado nacional por seu atrativo gastronômico (sabor) e também, devido a sua rusticidade e eficiência biológica elevada, adaptando-se bem à condição brasileira de clima tropical (COLAUTO et al., 1998).

A composição do substrato de cultivo tem importância decisiva no desenvolvimento e nas características nutricionais dos cogumelos (RAGUNATHAN; SWAMINATHAN, 2003). A suplementação dos substratos para o cultivo de cogumelos é prática usual adotada pela maioria dos produtores. Normalmente são acrescentados ao material lignocelulósico uma fonte de nitrogênio, podendo ser orgânica ou mineral com a finalidade de aumentar o conteúdo de nitrogênio total do substrato de cultivo.

A principal medida do rendimento de cogumelos é realizada através do cálculo de eficiência biológica, mas outros parâmetros como produtividade e massa média de cogumelos são utilizados. Essas medidas de rendimento de cogumelos são influenciadas por fatores como porcentagem de inoculo (STAMETS, 1993), estágio de maturação dos cogumelos (RAJARATHNAM, 1998), onde cogumelos podem oferecer ao produtor maior rendimento e/ou eficiência biológica, porém os frutos terão uma vida útil reduzida em comparação ao cogumelo colhido jovem, diminuindo seu tempo de comercialização, além da composição química dos substrato de cultivo, método de preparo do substrato, sendo que substratos pasteurizados e condicionados possuem microrganismos que são benéficos ao desenvolvimento do fungo entre outros.

A grande demanda e a qualidade dos alimentos têm sido motivos de várias pesquisas, nas mais diversas áreas. Uma delas tem sido o desenvolvimento de

técnicas para o cultivo de cogumelos, na área agroindustrial, que visa à redução dos custos de produção, preço ao consumidor e aumento do consumo mundial.

Os cogumelos comestíveis possuem valor nutritivo elevado quando comparado com vegetais, o cogumelo tem teor protéico maior que a maioria das frutas e legumes (BONONI; TRUFEM, 1986; EIRA; MINHONI, 1997; COUVOSIEIR, 1999; BERNAS et al., 2006). Segundo Furlani e Godoy (2007), pouco se sabe a respeito da qualidade dos cogumelos comestíveis cultivados no Brasil, especialmente com respeito ao valor nutricional. Mesmo na literatura internacional, os dados encontrados são escassos e referem-se a cogumelos cultivados em condições distintas das encontradas no Brasil.

No presente capítulo foram estudados e avaliados os fatores de produção como produtividade, eficiência biológica, número de cachos e massa média dos cachos assim como o teor de proteína bruta, fibra bruta e extrato etéreo dos cogumelos cultivados nos diferentes tipos de substratos em duas relações C/N.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2. 1. Isolamento e matriz primária

A técnica utilizada para o isolamento e obtenção de matriz primária das linhagens comerciais foi baseada na coleta de um basidioma sadio de *P. ostreatus* nos locais de cultivo e, em ambiente asséptico, em câmara de fluxo laminar, o mesmo foi partido com as mãos e, com o auxílio de uma pinça de corte, foram transferidos fragmentos de 3 a 5 mm do pseudotecido interno para placas de Petri contendo 20 ml de meio de cultura CA. O meio de cultura CA foi feito à base de extrato de uma mistura de bagaço de cana-de-açúcar (30%) mais capim braquiária (30%) mais capim brizantha (30%) mais farelo de trigo (10%). Para tanto, 40 g (base seca) da mistura foi fervida, por 10 minutos, em 500 ml de água destilada. O extrato foi filtrado, em peneira de malha de 60 mesh, e completou-se o volume do mesmo para 500 ml, com adição de água destilada. A seguir, colocou-se em frascos de Duran e autoclavou-se a 121 °C por 30 min. Após 24 horas, adicionaram-se 7,5 g de agar e autoclavou-se novamente realizando-se assim, o processo de tinalização. Após resfriamento e no interior de uma câmara de fluxo laminar, verteram-se 20 ml de meio em placas de Petri esterilizadas.

Ressalta-se que os fragmentos foram cortados em local distante das lamelas, para se evitar a transferência de esporos para o meio de cultura e, conseqüentemente, riscos de recombinação genética e de alterações morfofisiológicas das

linhagens. A colonização do meio de cultura ocorreu em temperatura de  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ , em BOD durante 10 dias e no escuro.

A certificação e viabilidade das matrizes obtidas, bem como da linhagem do banco de germoplasma do Módulo, foram conferidas através de um pré-cultivo das mesmas, em substrato pasteurizado, a base de bagaço de cana-de-açúcar (45%), palha de cana-de-açúcar (45%) e farelo de trigo (10%) (base seca dos ingredientes).

## **2. 2. Matriz secundária**

Após dez dias de incubação da matriz primária, foram cortados discos da borda da colônia da mesma com o auxílio de um vazador de rolha (5 mm de diâmetro). A seguir, estes discos foram transferidos, com auxílio de uma alça em L, para placas de Petri contendo o mesmo meio de cultura, o CA. Os procedimentos para o preparo do meio de cultura, inoculação e incubação foram os mesmos utilizados no preparo da matriz primária.

## **2. 3. Matriz terciária**

O substrato para a produção de matriz terciária foi à base de grãos de sorgo (*Sorghum bicolor*), oriundos da Fazenda Experimental Lageado, FCA/UNESP, Botucatu, SP. Inicialmente, os grãos, ainda na embalagem comercial, sacos de rafia, foram imersos em recipiente, com água sob fervura, através da injeção de vapor de caldeira na base do recipiente durante 40 minutos. Após, os sacos foram retirados do recipiente com o auxílio de uma empilhadeira e deixou-se escoar o excesso de água dos grãos. Em seguida, adicionaram-se  $23\text{ g kg}^{-1}$  de calcário calcítico e  $250\text{ g kg}^{-1}$  de gesso não hidratado, em relação ao peso seco dos grãos, e misturou-se em betoneira (Figura 1).



**Figura 1.** Procedimentos para produção de matriz terciária: A. cozimento dos grãos em tanque d'água, com injeção de vapor; B. mistura de grãos + gesso + calcário, em betoneira; C. Frascos com substrato, em autoclave; D. corte da matriz secundária em pedaços tipo “pizza”; E. disposição do fragmento de matriz secundária no fundo do frasco; F. grãos esterilizados (esquerda) e colonizados (matriz terciária) (direita).

Após a homogeneização, 250 g do material foram acondicionados em frascos de vidro transparente (tipo de conserva, 800 ml); cerca de 2/3 do



volume do frasco. Para o fechamento da tampa metálica rosqueável, utilizou-se um disco de manta do tipo Tyvek®, para se evitar contaminação após esterilização dos mesmos.

A esterilização dos frascos contendo os grãos foi realizada em autoclave industrial vertical de 2000 litros, a  $121 \pm 1^\circ\text{C}$  por um período de 4 horas, com posterior resfriamento natural até  $25^\circ\text{C}$ . O calor úmido do processo foi fornecido através de caldeira a gás GLP.

Inoculou-se os frascos com um fragmento de matriz secundária. Para tanto, dividiu-se as placas de Petri com matriz secundária em oito pedaços tipo “pizza”. Um pedaço foi depositado no fundo de um frasco vazio esterilizado, com o micélio voltado para cima e, em seguida, verteu-se o conteúdo de um frasco com grãos (250 g de grãos esterilizados). Este último, agora vazio recebeu inóculo na base e foi adicionado de grãos de um outro frasco, também esterilizados. Este procedimento foi repetido até a conclusão da inoculação de todos os frascos. Incubou-se em estufa tipo BOD a  $25^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ , no escuro, por 12 dias para completa colonização dos grãos.

#### **2. 4. Inóculo**

Nesta fase, a mistura grãos + calcário + gesso (item 2. 3., Capítulo 4) foi disposta em sacos, preparados a partir de mangas de PEAD transparente (Polietileno de Alta Densidade), contendo um segmento de manta Tyvek® ( $10 \times 5\text{cm}^2$ ) num dos cantos de sua abertura (Figura 2). O Tyvek® é uma manta não tecido, constituída por filamentos contínuos de polietileno de alta densidade, ordenados randomicamente. A manta utilizada possui gramatura de  $55 \text{ g m}^{-2}$  e espessura de  $163 \mu$ .

Os procedimentos para o preparo dos sacos e colocação da manta foram: dobrou-se o segmento de Tyvek® ao meio, no sentido de seu comprimento; selou-se um canto do mesmo; inseriu-se papel vegetal entre as lâminas do Tyvek®; inseriu-se o Tyvek num dos cantos de uma das aberturas da manga plástica ( $24 \times 40 \text{ cm}^2$ , largura x altura), alinhando muito bem as bordas do Tyvek® com a da manga plástica; selou-se toda a borda do conjunto com seladora a quente; retirou-se o papel vegetal e finalmente, selou-se o canto da manga (em diagonal) para fechamento da abertura ainda restante no segmento de

Tyvec® (apêndice - A). A seguir, cada saco, assim preparado, recebeu 1 kg da mistura, o que ocupou 2/3 do volume do mesmo.

A esterilização foi feita de acordo com o descrito no item 2. 3 (Capítulo 4). A inoculação foi realizada após 24 horas, em sala asséptica, em câmara de fluxo laminar (Figura 2).



**Figura 2.** Produção de inóculo: A. grãos corrigidos; B, C. empacotamento de grãos em sacos de PEAD; D. selamento do fundo dos sacos; E. saco pronto para ser esterilizado (121°C, 4 horas); F. corte do canto superior da embalagem, oposto ao Tyvec®, com tesoura desinfestada; G,H. inoculação dos sacos com matriz terciária; I. dobra do corte; J. selagem do corte; K. homogeneização, protegendo-se o filme Tyvec®; L. saco não inoculado (à esquerda) e saco inoculado totalmente colonizado (à direita).

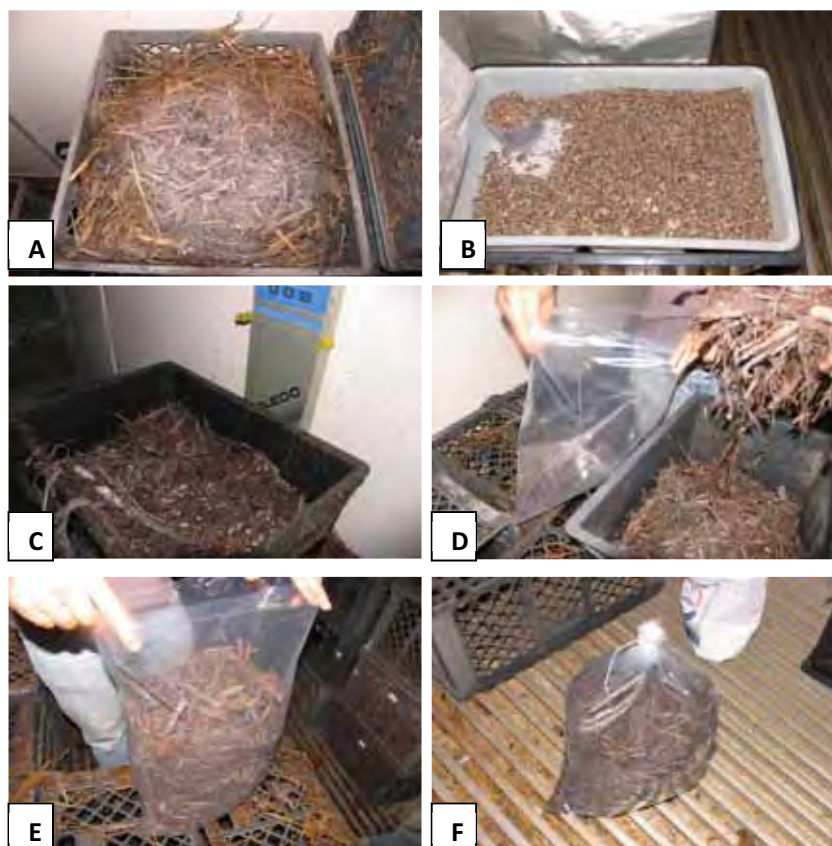
Para tanto, fez-se um corte na borda do saco, em posição oposta ao do segmento Tyvec<sup>®</sup>, com auxílio de uma tesoura desinfestada em álcool 92° e flambada em chama de lamparina com álcool 92°. A seguir, cada saco recebeu em média 15 g de grãos da matriz terciária. Imediatamente após, selou-se a abertura com seladora à quente. A seguir, dobrando-se muito bem a borda superior do saco, para proteção do segmento de Tyvec<sup>®</sup>, homogeneizou-se através de movimentos suaves.

## **2. 5. Formulação dos substratos e compostagem Fases I e II**

Os substratos de cultivo foram formulados como segue no item 2. 2., assim como o processo de compostagem na Fase I e II nos itens 2. 3. e 2. 4., respectivamente. Todos os itens encontram-se no capítulo 3.

## **2. 6. Inoculação**

A inoculação dos substratos foi realizada de forma manual, no interior de uma câmara climatizada Dalsem, com higienização dos utensílios utilizados (bandeja, tesoura e copo dosador de inoculo) com álcool 70% (Figura 3).



**Figura 3.** Inoculação do substrato: A. substrato ao final da Fase II de compostagem, com actinobactérias; B. inoculo, em bandeja limpa, e copo dosador; C. substrato inoculado; D, E. ensacamento do substrato inoculado; F: saco com filtro de algodão.

A embalagem utilizada para disposição do substrato inoculado foi saco plástico de polietileno de baixa densidade, incolor, translúcido, virgem, dimensão de 30 x 50 cm<sup>2</sup> (base x altura) e não sanfonado.

Para a inoculação, uma porção do substrato foi colocada em uma caixa plástica (limpa e desinfestada com álcool 70%).

A seguir, adicionou-se uma porção de inóculo, na dose de 40 g kg<sup>-1</sup> de massa fresca do substrato, utilizando-se um copo plástico limpo e desinfestado com álcool 70%. Misturou-se manualmente e repetiu-se o procedimento até o esvaziamento da caixa. Em seguida, dispôs-se o substrato em sacos plásticos (35 x 50 cm<sup>2</sup>, largura x altura), de modo também manual. Cada saco recebeu 3 kg de substrato inoculado.

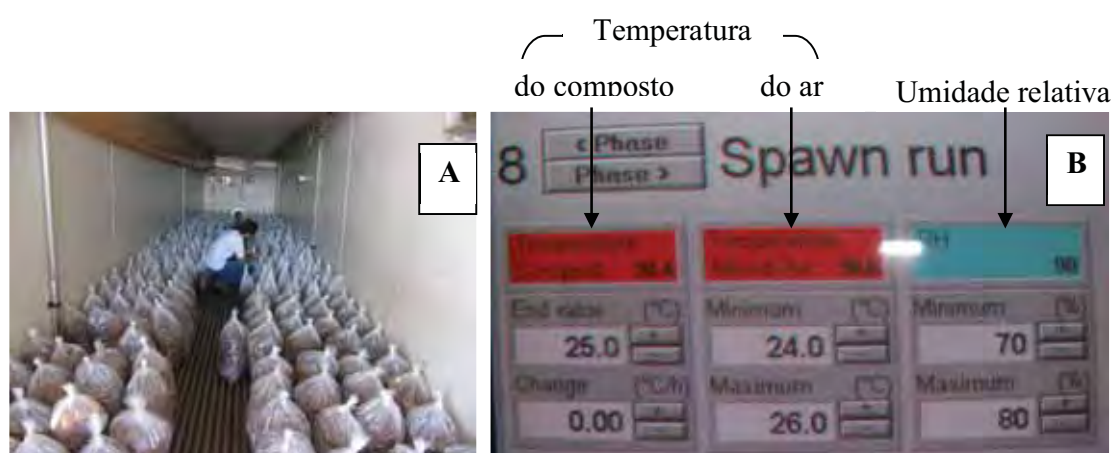
A seguir, colocou-se um chumaço de algodão na abertura dos sacos e amarrou-se com barbante. A função do algodão foi permitir trocas gasosas entre o

substrato e o ambiente, sem riscos de contaminações. Todos os sacos (ou blocos de cultivo) receberam uma identificação numérica.

## 2. 7. Incubação

A “corrida” do micélio ou colonização dos substratos foram realizada em Câmara Climatizada Dalsem a  $25 \pm 1$  °C, UR de  $87,5 \pm 2,5\%$ , no escuro. Os sacos foram dispostos no piso da câmara, dando igualdade em relação às condições ambientais.

A temperatura do substrato e a umidade relativa do ar foram controladas através de calor seco (serpentina com vapor circulante), calor úmido (vapor de caldeira) e nebulização, monitorados pelo softwer VEC 32 da Dalsem Mushroom (Figura 4).



**Figura 4.** Incubação dos blocos de substrato (“spawn run” ou “corrida” do micélio): A. disposição dos sacos no interior de uma Câmara Dalsem; B. Painel de controle da temperatura (do substrato e do ar) e umidade relativa do ar.

## 2. 8. Indução e Frutificação

Após a colonização dos substratos, fez-se uma compactação manual dos mesmos, apertando-se cada bloco firmemente com as mãos e transferiram-se os mesmos para uma estufa de produção (Figura 6). Esta compactação tem a finalidade de causar um choque no sistema, através da redução, por expulsão, do nível CO<sub>2</sub> no interior do bloco,

além de danos físicos no micélio. A estufa tem piso de concreto, cobertura com telhas de cerâmica e paredes de alvenaria (80 cm de altura). A porção restante das paredes da frente e do fundo da estufa foi fechada com plástico branco leitoso (0,15 mm de espessura). A porção restante das laterais foi fechada com sombrite 85%. Uma cortina de plástico branco leitoso foi instalada nas laterais da estufa (Figura 5). Os dados de temperatura do substrato e do ar, bem como a umidade relativa foram registrados diariamente com uso de um termo higrômetro.



**Figura 5.** Estufa de Produção: A. vista externa; B. vista interna.

A disposição dos sacos na estufa foi ao acaso, em posição invertida e sobre caixas treliçadas também em posição invertida. Com esta conformação, todos os sacos situaram-se num mesmo patamar, diminuindo-se assim, possíveis erros advindos de diferenças nas variáveis ambientais.

Os choques térmicos para indução de “frutificação” ocorreram de forma natural, ou seja, em função da temperatura ambiente que flutuou entre 15 a 29 °C, no período do experimento (inverno-primavera). A umidade relativa foi mantida entre 70 a 90 %, através de nebulização localizada no teto da estufa (3 m de altura), além de irrigações diárias no piso e nas paredes, com uso de uma mangueira de jardim.

Após cada fluxo de produção, os blocos foram novamente compactados, ajustando-se muito bem a embalagem plástica ao substrato. Este procedimento, além de reduzir os espaços vazios, tanto no substrato quanto na interface entre este e filme plástico, aumenta a densidade do substrato. Esta condição promove uma reestruturação, recuperação do crescimento vegetativo e maturação subsequente do micélio, o que culmina



com uma nova produção. Este procedimento foi repetido por três vezes até o final do experimento, momento em que não havia mais produção.

## 2. 9. Colheita

A colheita foi diária e de modo manual, realizando-se uma leve “torção” na base dos cachos, com os cogumelos já em estágio parcialmente abertos (Figura 6). Em seguida, os cachos foram dispostos em sacos plásticos identificados, pesados em balança de precisão (0,001g) e submetidos à determinação de variáveis de produção.



**Figura 6.** Cachos de basidiomas com píleos parcialmente abertos.

## 2. 10. Variáveis referentes à produção

### 2. 10. 1. Número de cachos

Realizou-se a contagem do número de cachos de basidiomas de cada repetição (saco ou bloco) experimental ao longo do período de produção. Ao final, calculou-se a média do número de cachos por saco de 3 kg de substrato.

### 2. 10. 2. Massa fresca média dos cachos

Determinou-se diariamente a massa fresca dos cachos de basidiomas produzidos em cada repetição, em balança eletrônica (0,001g de precisão).

A massa fresca média dos cachos foi determinada pela relação da massa fresca total e o número de cachos de basidiomas destes, conforme a seguinte equação:

$$M_{fmc} = \frac{M_{ftc}}{N}$$

onde:

$M_{fmc}$  = Massa fresca média dos cachos, g;

$M_{ftc}$  = Massa fresca total de cachos, g;

$N$  = Número de cachos colhidos.

### 2. 10. 3. Produtividade

Determinou-se a Produtividade ao final do ciclo de cultivo, através da equação.

$$P = \frac{M_{fb}}{M_{fc}} \times 100$$

onde:

$P$  = Produtividade, %;

$M_{fb}$  = Massa fresca total de cachos de basidiomas, g;

$M_{fc}$  = Massa fresca do composto ao final da Fase II, g.

### 2. 10. 4. Eficiência Biológica

Determinou-se a Eficiência Biológica ao final do ciclo de cultivo através da equação:

$$EB = \frac{M_{fb}}{M_{sc}} \times 100$$

onde:

$EB$  = Eficiência biológica, %;

$M_{fb}$  = Massa fresca dos basidiomas, g;

$M_{sc}$  = Massa seca do composto ao final da Fase II, g.



## **2. 11. Delineamento experimental**

O experimento foi ao acaso, em fatorial 5 x 2 x 4 (substrato x relação C/N x linhagem), com quinze repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey (5%). Para tanto, utilizou-se o programa SISVAR 4.2 desenvolvido pelo Departamento de Ciências Exatas, da Universidade Federal de Lavras, MG (UFLA).

## **2. 12. Variáveis referente à caracterização bromatologica dos basidiomas**

### **2. 12. 1. Secagem e moagem dos basidiomas**

Os basidiomas após serem colhidos pesados e contados foram levados para desidratadora de cogumelos onde permaneceram a uma temperatura de 65°C por 72 horas até sua completa secagem. Após foram moídos em moinho do tipo martelo atingindo a consistência de pó fino sendo depositados em vidros de 800 ml contendo aproximadamente 100g de cogumelo moído. A seguir, duas amostras de basidiomas secos, de cada tratamento, foram enviadas ao laboratório de bromatologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, FMVZ/UNESP, Botucatu, SP.

### **2. 12. 2. Proteína bruta**

Para a determinação de proteína bruta, pesou-se 1 g de material moído e seco em seguida transferindo para tubo para a digestão (300 ml). Após, adicionou-se uma medida padronizada de mistura catalisadora (100g de sulfato de potássio + 10g de sulfato de cobre) e 3 ml de ácido sulfúrico concentrado (P.A.) e, em seguida, procedeu-se digestão em bloco digestor com temperatura inicial de 250 °C. O aquecimento foi elevado gradativamente até 400°C. Concluiu-se este procedimento quando as amostras adquiriram coloração verde. Após o resfriamento das amostras, estas foram transferidas para tubos de destilação. O destilado foi recebido em ácido bórico. Quando o destilado atingiu 50 ml, o aquecimento foi

desligado, e destilado foi titulado com ácido sulfúrico (0,05 N), até a mudança de cor do mesmo. Os cálculos efetuados para a determinação da proteína bruta foram:

$$\% N = [(14 \times 0,05 \times 100)/100] \times (\text{Volume H}_2\text{SO}_4 - \text{Volume Branco})$$

$$\% PB = \%N \times 6,25$$

Onde:

%N = porcentagem de nitrogênio.

14 = equivalente do nitrogênio.

0,05 = normalidade do ácido sulfúrico.

Volume H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> = volume de ácido consumido até o ponto de viragem.

Volume Branco = volume de ácido consumido até o ponto de viragem do branco.

%PB = porcentagem de proteína bruta.

### 2. 12. 3. Fibra bruta

Inicialmente pesou-se 2 gramas de amostra seca e a colocou em copo de 600 ml, próprio para ser adaptado ao digestor. Em seguida, adicionou-se 100 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 1,25%, fervente, e colocou-e no aparelho digestor. A fervura foi iniciada dentro de 1 minuto quando então foi prolongada por 30 minutos. Ao final da digestão ácida, procedeu-se à filtração, fazendo-se lavagens sucessivas com água destilada fervente sobre o resíduo até a neutralização do material. O material retido no linho foi quantitativamente transferido para o copo de digestão, usando-se para essa transferência 100 ml da solução de NaOH a 1,25%. Fervente quando então se procedeu a digestão básica, seguindo os mesmos princípios da digestão ácida.

Após as hidrólises, o resíduo (fibra e minerais) foi transportado, quantitativamente, com auxílio de uma piceta com álcool, para o cadinho filtrante adaptado a um kitassato e este a uma bomba de vácuo. Em seguida, levou-se o material com álcool (20 ml) e, posteriormente, com éter (10 ml), a fim de facilitar a secagem e eliminar compostos provenientes das digestões. Na sequência, fez-se a secagem do cadinho, da fibra bruta e dos minerais. Finalmente, fez-se a calcinação em mufla a 500°C, durante 2 horas, quando toda a fibra foi oxidada, restando somente minerais insolúveis. A diferença de peso, antes e após a calcinação forneceu o peso da fibra bruta da amostra.

#### **2. 12. 4. Extrato etéreo**

Para a determinação do teor de extrato etéreo, pesou-se inicialmente 1g de amostra seca em um papel filtro e secou-se em estufa a 105 °C, durante 3 horas (secagem definitiva). Após resfriamento em dessecador por 30 minutos, fez-se um embrulho da amostra contida no papel, em forma de cartucho. Em seguida, colocou-se a amostra no recipiente próprio do aparelho de extração. Ao Becker previamente limpo e de peso conhecido, em balança analítica, adicionou-se 40 ml de éter de petróleo e colocou-se sob o condensador fixando-o ao anel rosca e em seguida, ligou-se a água do condensador, o qual ficou funcionando por 4 horas, com verificações ocasionais.

Após completar a extração, removeu-se a amostra do recipiente e colocou-se o tubo de vidro, coletor de éter, sob o condensador. Na seqüência, repôs-se o Becker, levantando-se o aquecedor e destilando o éter no tubo coletor. Antes que o Becker secasse, retirou-se o aquecedor e derramou-se o éter do tubo coletor num recipiente para éter usado. Em seguida, completou-se a secagem do Becker na estufa a 105°C, por 30 minutos. Finalmente esfriou-se num dessecador à temperatura ambiente e pesou-se. A diferença entre este último peso e o Becker vazio correspondeu ao peso do extrato etéreo.

#### **2. 12. 5. Delineamento experimental**

O experimento foi ao acaso, em fatorial 5 x 2 x 4 (substrato x relação C/N x linhagem), com quinze repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey (5%). Para tanto, utilizou-se o programa SISVAR 4.2 desenvolvido pelo Departamento de Ciências Exatas, da Universidade Federal de Lavras, MG (UFLA).

### **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **3. 1. Período de incubação**

Observou-se que o período de incubação teve maior influencia em relação à linhagem do que ao tipo de substrato (Tabela 1). Moda (2003) relata período de incubação inferior ao obtido neste experimento, porém os recipiente de contenção do substrato foi menor com 700 g de bagaço de cana lavado e autoclavado, condições diferentes deste experimento onde os recipientes de contenção do substrato continha 3 Kg de substrato pasteurizado e condicionado. O período de incubação pode sofrer influência do tamanho do recipiente de contenção do substrato, porcentagem de inóculo utilizado, tipo de substrato, material genético utilizado, umidade do substrato, densidade do substrato de cultivo entre outros fatores (STAMETS, 1993; RAJARATHNAM, 1998).

**Tabela 1.** Período de incubação das linhagens de *Pleurotus ostreatus* nos diferentes substratos e relações C/N.

Substratos <sup>(1, 2)</sup>	----- Linhagens de <i>P. ostreatus</i> -----			
	POS 09/100	POS 09/101	POS 09/102	POS 98/38
	----- Incubação, dias -----			
A1	36	24	29	29
B1	27	24	27	24
C1	36	24	23	29
D1	36	36	36	36
E1	36	23	23	23
Média	34,2 A a <sup>(3)</sup>	26,2 A b	27,6 A ab	28,2 A ab
A2	36	23	36	23
B2	36	23	29	23
C2	36	23	27	24
D2	36	23	27	36
E2	36	29	24	23
Média	36 A a	24,2 A b	28,6 A ab	25,8 A b

(1) Substrato: A. capim braquiaria + bagaço de cana; B. palha de cana. + bagaço de cana; C. capim brizantha + bagaço de cana; D. capim tobiatã + bagaço de cana; E. palha de trigo + bagaço de cana;

(2) Suplementação do substrato: 1. com farelo de trigo (A1, B1 C1, D1, E1); 2. sem farelo de trigo (A2, B2, C2, D2, E2);

(3) Letras minúsculas na mesma linha; letras maiúsculas na mesma coluna não diferem entre si (Tukey, 5%).

### 3. 2. Produtividade

A produtividade depende não só da qualidade do substrato e do ambiente cultivo mas também de outros fatores como por exemplo a maturação do cogumelo na época de colheita, sendo que cogumelos colhidos jovens, ainda na fase de botão reduz a produtividade devido à diminuição do tamanho e massa do basidioma. A colheita de cogumelos maduros pode oferecer ao produtor máxima produtividade, porém os basidiomas terão uma vida útil reduzida em comparação ao cogumelo jovem, diminuindo seu tempo de comercialização além da aceitação pelo consumidor (RAJARATHNAM, 1998).

Os substratos com relação C/N de 60:1 apresentaram maiores produtividades. A média de produtividade independente do tipo de substrato foi maior para as linhagens POS 09/101, POS 09/102 com 23,86, 22,68%, respectivamente. Zanetti e Ranal (1997) relatam que em alguns experimentos houve estímulo no crescimento e outros

mostraram que houve inibição quando a suplementação é realizada com materiais ricos em nitrogênio.

A produtividade média intermediária independente do tipo de substrato foi obtido com a linhagem POS 09/100 com 15,48% e a menor média de produtividade foi com a linhagem POS 98/38 (Tabela 2).

As maiores produtividades para os substratos com relação C/N de 60:1 foram observadas para o substrato C (Capim brizantha) independentemente da linhagem. A linhagem POS 09/101 com 33,5 % foi à maior produtividade. O fato do substrato C apresentar maior produtividade pode ser explicado pela qualidade nutricional elevada deste como maior temperatura durante a Fase I de compostagem (Figura 4, Capítulo 3), menor relação C/N (Figura 5, Capítulo 3), maior teor de proteína (Tabela 8, Capítulo 3), fibra bruta (Tabela 7, Capítulo 3), além do potencial genético produtivo da linhagem POS 09/101.

Ao contrário dos substratos com relação C/N de 60:1, os melhores resultados de produtividade para os substratos na relação C/N de 90:1 foram para os substratos C, D e B. A maior média de produtividade independente do tipo de substrato foram para as linhagens POS 09/101 e POS 09/102 com 17,5 e 16,10%, respectivamente, mostrando-se menores em relação aos substratos suplementados. A produtividade intermediária foi obtida com a linhagem POS 09/100 com 13% e a menor média de produtividade foi para a linhagem POS 98/38 com 2%. Desta forma fica evidenciado também que o material genético exerce influência sobre a produtividade de *P. ostreatus* para as condições experimentais deste estudo.

Nos substratos com relação C/N de 90:1 a maior produtividade foi observada para os substratos B e C (palha de cana e capim brizantha, respectivamente) com a linhagem POS 09/101 com 21,05% ao contrário dos substratos de relação C/N de 60:1 onde o substrato C (capim brizantha) mostrou-se o mais produtivo independente da linhagem utilizada. As maiores produtividades tanto para os substratos com relação C/N de 60:1 e 90:1 foram obtidas com a linhagem POS 09/101, isso mostra o potencial produtivo desta linhagem independente do tipo de substrato e relação C/N.

**Tabela 2.** Produtividade %, das linhagens de *Pleurotus ostreatus* nos substratos suplementados (C/N 60:1) e não suplementados (C/N 90:1).

Substrato <sup>(1, 2)</sup>	Linhagens			
	09/100	09/101	09/102	98/38
A1	1,7 C b <i>b</i> <sup>(3)</sup>	24,3 B a a	24,3 AB a a	3,3 AB b a
B1	16,9 AB b a	20,1 B ab a	23,5 AB a a	2,5 AB c a
C1	22,7 A b a	33,5 A a a	28,5 A ab a	8,9 A c a
D1	21,7 A a a	23,3 B a a	17,9 B a a	5,1 AB a a
E1	14,4 B a a	18,1 B a a	19,2 B a a	0,9 B b a
Média	15,5	23,9	22,7	4,1
A2	14,7 A a a	19,9 AB a a	18,9 A a b	2,4 A b a
B2	15,7 A a a	21,5 A a a	16,1 AB a b	2,9 A b a
C2	16,1 A a b	20,1 A a b	16,0 AB a b	2,2 A b b
D2	10,9 AB b b	13,7 BC ab b	17,3 AB a a	1,3 A c a
E2	7,6 B a b	12,3 C a b	12,2 B a b	1,2 A b a
Média	13,0	17,5	16,1	2,0

(1) Substrato: A. capim braquiaria + bagaço de cana; B. palha de cana. + bagaço de cana; C. capim brizantha + bagaço de cana; D. capim tobiatã + bagaço de cana; E. palha de trigo + bagaço de cana.

(2) Suplementação do substrato: 1. com farelo de trigo (A1, B1 C1, D1, E1); 2. sem farelo de trigo (A2, B2, C2, D2, E2).

(3) letras maiúsculas iguais na mesma coluna dentro da mesma relação C/N não diferem entre si ao nível de 5% (Tukey); letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem entre si ao nível de 5% (Tukey); letras em itálico iguais no mesmo substrato nas relações C/N diferentes não diferem entre si ao nível de 5% (Tukey); CV geral = 45, 07.

### 3. 3. Eficiência biológica

Na avaliação da eficiência biológica encontra-se os mesmo problemas da produtividade quando diz-se de comparações entre experimentos em diferentes condições. A eficiência biológica é o índice mais utilizada para descrever o rendimento de cogumelos em experimentos, assim como na produtividade a eficiência biológica pode ser influenciada pela maturação do cogumelo, época de colheita e também pela umidade do substrato. Segundo Stamets (1993) a porcentagem de inóculo pode influenciar de forma significativa a eficiência biológica levando em consideração a viabilidade econômica deste fator. Os cogumelos neste experimento foram colhidos ainda jovem no padrão comercial usualmente adotado pela maioria dos produtores brasileiros, com diâmetro do píleo entre 1,5 cm a 2,5 cm.

Observa-se que para os substratos com relação C/N de 60:1 (suplementados), os substratos D1 e C1 apresentaram eficiência biológica de até 145% (Tabela 3). Ao contrário dos substratos com relação C/N de 60:1 os melhores resultados de eficiência biológica para os substratos com relação C/N de 90:1 foram obtidos com o composto B (palha de cana-de-açúcar) independente da linhagem. Royse e Schisler (1987) obtiveram 85% de Eficiência biológica para a produção de *P. ostreatus* em palha de trigo e espiga de milho pasteurizada, condições semelhantes ao deste experimento.

Na tabela 3, observa-se que a linhagem POS 09/101 foi a que teve maior eficiência biológica média (83,32%).

**Tabela 3.** Eficiência biológica %, das linhagens de *Pleurotus ostreatus* cultivados nos substratos suplementados (C/N 60:1) e não suplementados (C/N 90:1).

Substrato <sup>(1, 2)</sup>	Linhagens			
	09/100	09/101	09/102	98/38
A1	7,2 C b b <sup>(3)</sup>	97,3 B a a	96,7 AB a a	13,0 AB b a
B1	74,7 AB a a	87,7 B a b	103,1 AB a a	11,1 AB b b
C1	98,7 A b a	145,9 A a a	123,9 A ab a	37,7 A c a
D1	103,3 A a a	111,0 B a a	85,0 B a a	24,1 AB b a
E1	64,6 B a a	80,9 B a a	87,7 B a a	4,3 B b a
Média	69,7	104,56	99,28	18,04
A2	54,5 AB a a	73,7 BC a b	70,6 A a b	8,7 B b a
B2	82,5 A b a	113,0 A a a	84,9 A ab a	84,9 A ab a
C2	77,7 A b a	96,5 BC ab b	77,4 A a b	11,1 B b b
D2	52,9 AB b b	67,1 BC ab b	83,8 A a a	6,1 B c a
E2	40,5 B a b	66,3 C a a	65,5 A a b	6,8 B b a
Média	61,62	83,32	76,44	23,52

(1) Substrato: A. capim braquiaria + bagaço de cana; B. palha de cana. + bagaço de cana; C. capim brizantha + bagaço de cana; D. capim tobiatã + bagaço de cana; E. palha de trigo + bagaço de cana;

(2) Suplementação do substrato: 1. com farelo de trigo (A1, B1 C1, D1, E1); 2. sem farelo de trigo (A2, B2, C2, D2, E2);

(3) letras maiúsculas iguais na mesma coluna dentro da mesma relação C/N não diferem entre si ao nível de 5% (Tukey); letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem entre si ao nível de 5% (Tukey); letras em itálico iguais no mesmo substrato nas relações C/N diferentes não diferem entre ao nível de 5% (Tukey); CV geral = 44,92.



### 3. 4. Massa média dos cachos

A massa média dos basidiomas é uma variável utilizada por alguns autores, porém, deve se tomar alguns cuidados ao utilizar dados de autores diversos. Fato relacionado aos diversos tipo de recipiente de contenção do substrato de cultivo, podendo variar de potes do tipo “conserva” com 600 a 900ml a sacos plásticos de diversos tamanhos, variando entre 300g e 12kg de substrato. Também podem ocorrer variações na área de frutificação, ou seja, a área livre para frutificação que pode ser toda a abertura do pote ou diferenças no numero de furos no caso de sacos plásticos.

Outro fator relevante é a morfologia da espécie e momento de colheita do basidioma, no caso do *P. ostreatus* seus corpos de frutificação ou basidiomas são semelhantes a ostras, com estípites de comprimento variado, ligados na base dando um aspecto de “cacho de ostras”, diferente do *Agaricus bisporus*, *Agaricus blazei*, *Lentinula edodes* com basidiomas constituído de píleo e estípites com formato semelhante a um guarda-chuva.

Na tabela 4 é apresentado o valor da massa média de cachos, em relação a todo o ciclo de cultivo nos diferentes substratos suplementados ou não com farelo de trigo, mostrando a interação entre linhagens, substrato e relação C/N. Nota-se que houve diferença estatística para a interação linhagem-substrato somente para a linhagem POS 98/38, onde as maiores médias foram obtidas nos substratos com capim Brizantha e palha de cana, 40,7 e 40,5g cachos<sup>-1</sup> respectivamente, e a menor média para o substrato com palha de trigo, 18,7g cacho<sup>-1</sup>.

Comparando-se os resultados de massa média dos cachos em função da suplementação nota-se diferenças estatísticas somente para a linhagem POS 98/38, sendo que as demais linhagens não apresentaram diferenças significativas. A média das linhagens independente do tipo de substrato (Tabela 4).

**Tabela 4.** Massa média dos cachos g, de *Pleurotus ostreatus* cultivados nos substratos suplementados (C/N 60:1) e não suplementados (C/N 90:1).

Substrato <sup>(1, 2)</sup>	Linhagens			
	09/100	09/101	09/102	98/38
A1	16,2 A ab <i>a</i> <sup>(3)</sup>	22,9 A ab <i>a</i>	22,9 A b <i>a</i>	37,7 AB <i>a a</i>
B1	28,4 A ab <i>a</i>	25,7 A ab <i>a</i>	24,4 A b <i>a</i>	40,5 A <i>a a</i>
C1	30,0 A ab <i>a</i>	27,9 A ab <i>a</i>	24,2 A b <i>a</i>	40,7 A <i>a a</i>
D1	30,5 A <i>a a</i>	25,7 A <i>a a</i>	19,3 A <i>a a</i>	24,1 BC <i>a a</i>
E1	25,6 A <i>a a</i>	24,3 A <i>a a</i>	24,3 A <i>a a</i>	18,7 C <i>a a</i>
Média	26,14	25,30	23,02	32,34
A2	25,3 A <i>a a</i>	26,7 A <i>a a</i>	29,3 A <i>a a</i>	21,8 AB <i>a a</i>
B2	28,7 A <i>a a</i>	29,2 A <i>a a</i>	22,6 A <i>a a</i>	29,6 A <i>a a</i>
C2	31,5 A <i>a a</i>	28,7 A <i>a a</i>	28,9 A <i>a a</i>	24,0 AB <i>a b</i>
D2	24,3 A <i>a a</i>	22,3 A <i>a a</i>	24,7 A <i>a a</i>	8,6 B <i>b b</i>
E2	22,2 A <i>a a</i>	27,9 A <i>a a</i>	26,3 <i>a a a</i>	21,0 AB <i>a a</i>
Média	26,4	26,96	26,36	21,00

(1) Substrato: A. capim braquiaria + bagaço de cana; B. palha de cana. + bagaço de cana; C. capim brizantha + bagaço de cana; D. capim tobiatã + bagaço de cana; E. palha de trigo + bagaço de cana;

(2) Suplementação do substrato: 1. com farelo de trigo (A1, B1 C1, D1, E1); 2. sem farelo de trigo (A2, B2, C2, D2, E2);

(3) letras maiúsculas iguais na mesma coluna dentro da mesma relação C/N não diferem entre si ao nível de 5% (Tukey); letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem entre si ao nível de 5% (Tukey); letras em itálico iguais na coluna no mesmo substrato nas diferentes relações C/N não diferem entre ao nível de 5% (Tukey); CV geral = 61,67.

### 3. 5. Numero de cachos

Para está variável encontra-se o número de cachos obtido em cada bloco de cultivo durante o ciclo produtivo. Observa-se que o número de cachos por bloco foi superior nos substratos com relação C/N de 60:1 com as linhagens POS 09/101 e POS 09/102 com 30,94 e 30,10 cachos por bloco respectivamente, e a linhagem POS 98/38 com 3,42 cachos por bloco (Tabela 5).

O numero de cachos nos substratos com relação C/N de 90:1 seguiu tendência dos substratos com relação C/N de 60:1, permanecendo a linhagem POS 98/38 com o menor numero de cachos com 1,84 e as linhagens POS 09/101 e POS 09/102 com maior numero de cachos com 19, 56 e 19,66 respectivamente.

**Tabela 5.** Numero de cachos de *Pleurotus ostreatus* cultivados nos substratos suplementados (C/N 60:1) e não suplementados (C/N 90:1).

Substrato <sup>(1, 2)</sup>	Linhagens			
	09/100	09/101	09/102	98/38
A1	2,0 B b b <sup>(3)</sup>	32,5 AB a a	33,5 A a a	2,9 A b a
B1	18,3 A b a	22,9 B ab a	29,5 A a a	1,9 A c a
C1	21,9 A b a	36,2 A a a	35,6 A a a	6,9 A c a
D1	22,3 A a a	28,2 AB a a	27,4 A a a	4,3 A b a
E1	19,3 A b a	34,9 A a a	24,5 A a a	1,1 A c a
Média	16,76	30,94	30,10	3,42
A2	17,8 A a a	22,4 A a b	21,9 A a b	2,6 A b a
B2	16,7 A a a	20,3 A a a	22,8 A a a	2,2 A b a
C2	16,0 A a a	21,5 A a b	17,4 A a b	1,9 A b a
D2	12,9 A a b	18,7 A a b	21,4 A a a	1,3 A b b
E2	9,9 A ab b	14,9 A a b	14,8 A a b	1,2 A b a
Média	14,66	19,56	19,66	1,84

(1) Substrato: A. capim braquiaria + bagaço de cana; B. palha de cana. + bagaço de cana; C. capim brizantha + bagaço de cana; D. capim tobiatã + bagaço de cana; E. palha de trigo + bagaço de cana;

(2) Suplementação do substrato: 1. com farelo de trigo (A1, B1 C1, D1, E1); 2. sem farelo de trigo (A2, B2, C2, D2, E2);

(3) letras maiúsculas iguais na mesma coluna dentro da mesma relação C/N não diferem entre si ao nível de 5% (Tukey); letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem entre si ao nível de 5% (Tukey); letras em itálico iguais na coluna no mesmo substrato nas relações C/N não diferem entre si ao nível de 5% (Tukey); CV geral = 68,23.

### 3. 6. Fibra total, proteína total e extrato etéreo dos basidiomas

Na tabela 6, encontram-se os valores de F obtidos na análise de variância dos dados de fibra total, proteína total e extrato etéreo dos basidiomas produzidos durante todo o ciclo produtivo das quatro linhagens de *P. ostreatus*, POS 98/39, POS 09/100, POS 09/101 e POS 09/102, cultivados nos diferentes substratos em dois níveis de relação C/N, de 60 e 90:1. Verificou-se efeito significativo para as variáveis fibra total, proteína total e extrato etéreo na interação substrato x linhagem x relação C/N.

**Tabela 6.** Valores de F obtidos na análise de variância da fibra total, proteína total e extrato etéreo das linhagens de *Pleurotus ostreatus* cultivadas nos diferentes substratos com ou sem suplementação.

Fator de variação	Fibra total	Proteína total	Extrato etéreo
Substrato (S)	5,17 *	3,04 *	2,35 <sup>ns</sup>
Relação (R)	4,54 *	22,42 *	2,09 <sup>ns</sup>
Linhagem (L)	4,92 *	11,83 *	6,27 *
S x R x L	2,80 *	2,39 *	0,98 <sup>ns</sup>

\* significativo; ns: não significativo (Tukey, 5%).

### 3. 7. Proteína bruta

A proteína total é um importante componente dos cogumelos, estando correlacionado, entre outros, com a composição do substrato de cultivo, partes do píleo, tempo de cultivo e da espécie fúngica.

Observa-se que os maiores teores de proteína total foram obtidos nos substratos com relação C/N de 60:1 independente da linhagem utilizada (Tabela 7). Isto pode ser explicado pela maior quantidade de nitrogênio dos substratos suplementados. Esta hipótese está de acordo com Silva et al. (2007) que avaliou a composição dos cogumelos cultivados em vários níveis de relação C/N, o autor ressalta que quanto maior o teor de nitrogênio nos substratos de cultivo maior foi o teor de proteína total dos basidiomas.

A maior média no teor de proteína total foi encontrada nos cogumelos da linhagem POS 98/38 com 30,59% e o menor valor para os cogumelos da linhagem POS 09/101 com 24,22% uma diferença de 21,8%. Este fato pode ser explicado pela maior produtividade da linhagem POS 09/101 superior a da linhagem POS 98/38, enfatizando que a quantidade de nutrientes disponíveis para a produção dos cogumelos pode influenciar sua composição química. Furlani e Godoy (2007) estudando a composição química de cogumelos cultivados em condições brasileiras e coletados no maior mercado consumidor nacional de cogumelos (São Paulo) encontraram valores médios para *P. ostreatus* de 22,22% de proteína total valor inferior aos melhores resultados encontrados neste experimento e superior aos valores citados por Holtz et al. (2009) com 16,57% para *P. ostreatus* cultivados em resíduos da indústria têxtil suplementados com farelo de arroz e pasteurizados em água quente.

Zhang et al. (2002) citaram que os teores de proteína em basidioma de *Pleurotus* spp. podem variar de 26,3-36,7%, porém Rangunathan e Swaminathan (2003) relataram valores maiores, variando entre 25,6 e 44,3%.

**Tabela 7.** Teor de Proteína total (% base seca) nos basidiomas das linhagens de *Pleurotus ostreatus* cultivadas nos diferentes substratos com suplementação (C/N 60:1) e sem suplementação (C/N 90:1).

Substrato <sup>(1, 2)</sup>	Linhagens			
	09/100	09/101	09/102	98/38
A1	24,01 BA ab a <sup>(3)</sup>	20,45 B b a	29,67 A a a	31,42 A a a
B1	29,57 A ba a	24,04 AB b a	26,28 AB ba b	28,19 A ba a
C1	37,54 A a a	28,11 A a a	22,77 B b a	35,48 A a a
D1	30,31 A a a	28,58 A ab a	33,26 A a a	24,10 A b a
E1	24,97 BA ab a	19,91 B b a	24,00 B ba a	33,78 A a a
Média	29,28	24,22	27,20	30,59
A2	24,06 A a a	18,25 B b a	30,58 A a a	31,90 A a a
B2	23,43 A a a	17,23 B b a	33,96 A a a	21,48 B a a
C2	19,37 B b b	23,90 A ab a	25,28 A a a	27,75 A a b
D2	21,15 AB b b	23,65 A ab a	24,79 A a b	27,98 A a a
E2	22,02 A a a	16,92 B b a	19,25 A ba b	25,71 A a b
Média	22,00	19,99	26,77	26,96

(1) Substratos: A. capim braquiaria + bagaço de cana; B. palha de cana. + bagaço de cana; C. capim brizantha + bagaço de cana; D. capim tobiatã + bagaço de cana; E. palha de trigo + bagaço de cana;

(2) Suplementação do substrato: 1. com farelo de trigo (A1, B1 C1, D1, E1); 2. sem farelo de trigo (A2, B2, C2, D2, E2);

(3) letras maiúsculas iguais na mesma coluna dentro da mesma relação C/N não diferem entre si ao nível de 5% (Tukey); letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem entre si ao nível de 5% (Tukey); letras em itálico iguais na coluna no mesmo substrato nas relações C/N diferentes não diferem entre si ao nível de 5% (Tukey); CV geral = 14,19.

### 3. 8. Fibra bruta

Para o teor de fibra bruta dos cogumelos os valores encontrados nos substratos com relação C/N de 60:1, foram menores comparando com os cogumelos cultivados nos substratos com relação C/N de 90:1 (Tabela 8). O maior valor de fibra bruta no grupo de substratos suplementados foi encontrado para a linhagem POS 09/101 com 9,39%,

resultados semelhantes ao encontrado por Bonatti et al. (2004) cultivando *P. ostreatus* em folhas de bananeira esterilizado.

**Tabela 8.** Teor de fibra total (% , base seca) dos basidiomas das linhagens de *Pleurotus ostreatus* cultivadas nos diferentes substratos com suplementação (C/N 60:1) e sem suplementação (C/N 90:1).

Substratos <sup>(1,2)</sup>	Linhagens			
	09/100	09/101	09/102	98/38
A1	8,97 A a a <sup>(3)</sup>	8,32 A ab a	4,83 A b a	5,05 A b a
B1	5,38 A a a	8,57 A ab a	6,83 A ab a	8,73 A ab a
C1	4,03 A a a	7,52 A b b	6,43 A ab a	5,63 A b a
D1	5,35 B a a	8,52 AB ab a	11,84 A a a	13,92 A a a
E1	7,61 B a b	13,99 A a a	7,46 B ab a	4,18 B b b
Média	6,27	9,38	7,47	7,50
A2	5,85 A b a	10,34 A ab a	8,66 A a a	4,72 A b a
B2	8,88 A ab a	6,10 A b a	5,82 A a a	9,89 A ab a
C2	8,45 AB ab a	12,70 A a a	9,59 AB a a	4,47 B b a
D2	4,83 A b a	9,80 A ab a	10,69 A a a	6,17 A ab b
E2	12,89 A a a	11,07 A ab a	11,54 A a a	12,15 A b a
Média	8,18	10,00	9,26	7,48

(1) Substratos: A. capim braquiaria + bagaço de cana; B. palha de cana. + bagaço de cana; C. capim brizantha + bagaço de cana; D. capim tobiatã + bagaço de cana; E. palha de trigo + bagaço de cana;

(2) Suplementação do substratos: 1. com farelo de trigo (A1, B1 C1, D1, E1); 2. sem farelo de trigo (A2, B2, C2, D2, E2);

(3) letras maiúsculas iguais na mesma coluna dentro da mesma relação C/N não diferem entre si ao nível de 5% (Tukey); letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem entre si ao nível de 5% (Tukey); letras em itálico iguais na coluna no mesmo substratos nas relações C/N não diferem entre ao nível de 5% (Tukey); CV geral = 27,41.

Nos substratos com relação C/N de 90:1 os valores médios das linhagens independente do tipo de substratos foram superiores aos valores encontrados nos substratos com relação C/N de 60:1, onde a mesma linhagem POS 09/101 apresentou o maior teor de fibra total 10,00 %, valores inferiores ao encontrados por Holtz et al. (2009) cultivando *P. ostreatus* em resíduos da indústria têxtil com suplementação de farelo de arroz e pasteurizados em água quente onde obtiveram resultados de 15,47% de fibra total, valor superior ao encontrado por Silva et al. (2007) que cultivando *P. sajor-caju* em capim coast-

cross + bagaço de cana-de-açúcar + mais farelo de trigo autoclavado a 121 °C, obtivem 4,70% de fibra total.

### 3. 9. Extrato etéreo

Ao contrário da proteína total e fibra total o extrato etéreo não teve significância estatística ao nível de 5% (Tukey) na interação substrato x Fase de compostagem x relação C/N. Os maiores valores médios encontrados foram para os substratos com relação C/N de 60:1 tendo a linhagem POS 09/100 (3,91%) a maior média quando comparamos entre as linhagens. Já para os substratos, D1 com a linhagem POS 09/100 mostrou a maior média entre todos os tratamentos com 4,64% de extrato etéreo (Tabela 9). Estes resultados estão de acordo com os encontrados por Bonatti et al. (2004) que estudando o cogumelo *P. ostreatus* cultivados em folhas de bananeira suplementada com farelo de arroz e 5% de inóculo (peso seco de substrato) autoclavado a 121 °C, obtiveram 5,97% de extrato etéreo no primeiro fluxo e 2,24% no segundo fluxo de produção.

Já para os substratos com relação C/N de 90:1 os valores foram inferiores aos dos substratos com relação C/N de 60:1 tendo a linhagem POS 09/100 a maior média de extrato etéreo com 3,62%, resultados semelhante nos substratos com relação C/N de 60:1, podendo ter relação com o material genético. O maior valor para este grupo de substratos teve como semelhança o substrato D e a linhagem POS 09/102 diferindo-se a linhagem. O substrato D (capim tobiatã) favoreceu o acúmulo de gordura nos cogumelos independente da linhagem utilizada. Rampinelli et al. (2010) trabalhando *Pleurotus Djamor* cultivados em folhas de bananeira suplementados com farelo de arroz, autoclavados e colheita dos cogumelos maduros, ou seja, píleos grande obtiveram valores inferiores em relação aos menores valores encontrados neste experimento, cerca de 1,12% no primeiro fluxo e 1,09 no segundo fluxo de produção.

**Tabela 9.** Extrato etéreo (% base seca) dos basidiomas de linhagens de *Pleurotus ostreatus* cultivadas nos diferentes substratos com suplementação (C/N de 60:1) e sem suplementação (C/N de 90:1).

Substratos <sup>(1, 2)</sup>	Linhagens			
	09/100	09/101	09/102	98/38
A1	3,15 A a a <sup>(3)</sup>	3,16 A a a	3,77 A a a	3,02 A ab a
B1	3,98 A a a	3,36 A a a	4,00 A a a	2,99 A b a
C1	3,89 A a a	3,80 A a a	3,79 A a a	4,13 A b b
D1	4,64 A a a	4,12 B a a	3,50 BA a a	2,62 B b a
E1	3,87 A a a	3,82 A a a	4,26 A a a	3,72 A ab a
Média	3,91	3,65	3,87	3,30
A2	3,11 A a a	3,46 A ab a	3,78 A a a	3,13 A a a
B2	4,08 A a a	3,84 A a a	4,09 A a a	3,39 A a a
C2	3,15 A a a	2,18 B a b	3,52 A a a	3,01 A a a
D2	3,73 BA a a	4,23 B a a	4,31 B a a	2,61 B a a
E2	4,04 A a a	3,95 A a a	3,39 A a a	3,17 A a a
Média	3,62	3,53	3,81	3,06

(1) Substratos: A. capim braquiaria + bagaço de cana; B. palha de cana. + bagaço de cana; C. capim brizantha + bagaço de cana; D. capim tobiatã + bagaço de cana; E. palha de trigo + bagaço de cana;

(2) Suplementação do substratos: 1. com farelo de trigo (A1, B1 C1, D1, E1); 2. sem farelo de trigo (A2, B2, C2, D2, E2);

(3) letras maiúsculas iguais na mesma coluna dentro da mesma relação C/N não diferem entre si ao nível de 5% (Tukey); letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem entre si ao nível de 5% (Tukey); letras em itálico iguais na coluna no mesmo substrato nas relações C/N não diferem entre ao nível de 5% (Tukey); CV geral = 14,69.



#### 4. CONCLUSÕES

Nas condições experimentais deste experimento conclui-se que:

A linhagem POS 09/101 mostrou-se com potencial genético elevado em relação as demais linhagens utilizadas em relação a produtividade e eficiência biológica;

A produtividade e eficiência biológica foram maiores nos substratos com relação C/N de 60:1 (suplementados com farelo de trigo) evidenciando que até certos limites a quantidade de nitrogênio eleva a produtividade e a eficiência biológica;

O numero de cachos foi maior para a linhagem POS 98/38 independente da relação C/N e, a massa média do cacho foi maior para a linhagem POS 98/38 na relação C/N de 60:1 e para a linhagem POS 09/102 na relação C/N de 90:1;

O teor de proteína total, fibra total e extrato etéreo dos basidiomas sofre influência do tipo de material genético e principalmente da composição do substrato de cultivo.

## 5. REFERÊNCIAS

BARBOSA, M. C. **Aproveitamento de resíduos de cassava de mandioca para produção de *Pleurotus***. 1996. 98 f. Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos)-Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1996.

BERNAS, E.; JAWORSKA, G.; LISIEWSKA, Z. Edible mushrooms as a source of valuable nutritive constituents. **Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria**, Poznan, v. 5, n. 1, p. 5-20, 2006.

BONATTI, M. et al. Evaluation of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus sajor-caju* nutritional characteristics when cultivated in different lignocellulosic wastes. **Food Chemistry**, London, v. 88, n. 3, p. 425-428, 2004.

CHANG, S. T.; MILES, P. G. **Mushrooms**: cultivation, nutritional value, medicinal effect and environmental impact. Boca Raton: CRC Press, 2004. 451 p.

COLAUTO, N. B.; EIRA, A. F.; MINHONI, M. T. A. Fatores físicos que afetam a produtividade do cogumelo comestível *Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Singer. **Científica**, São Paulo, v. 26, p. 25-43, 1998.

COURVOISIER, M. Les champignons comestibles dans le monde. **Le Bulletin de la Fédération Nationale des Syndicats Agricoles de Cultivateurs de Champignons**, Bordeaux, v. 82, p. 829-835, 1999.

EIRA A. F.; MINHONI, M. T. A. **Manual de cultivo do "hiratake" e "shimeji" (*Pleurotus* spp.)**. Botucatu: FEPAF, 1997. 97 p.

FERMOR, T. R.; WOOD, D. A. Mushroom compost microbial biomass: a review. **Mushroom Science**, Leamington Spa, v. 13, p. 191-199, 1991.

- FURLANI, R. P. Z.; GODOY, H. T. Valor nutricional de cogumelos comestíveis. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 1, p. 154-157, 2007.
- HOLTZ, M. et al. Cultivo de *Pleurotus ostreatus* utilizando resíduos de algodão da indústria têxtil. **Revista de Ciências Ambientais**, Canoas, v. 3, n. 1, p. 37-51, 2009.
- 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**, Madrid, v. 21, p. 195-197, 2004.
- LABORDE, J. et al. La Préparation express des substrats pour la culture du champignon de couche. **Mushroom Science**, Leamington Spa, v. 8, p. 675-706, 1971.
- MAZIERO, R.; BONONI, V. L.; CAPELARI, M. Cultivo e produtividade de *Pleurotus ostreatus* var. "Flórida" em Mogi das Cruzes, SP, Brasil. **Hoehnea**, São Paulo, v. 19, p. 1-7, 1992.
- MODA, E. M. **Produção de *Pleurotus sajor-caju* em bagaço de cana-de-açúcar lavado e o uso de aditivos visando sua conservação "in natura"**. 2003. 84 f. Dissertação (Mestrado em Agricultura)-Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, 2003.
- RAGUNATHAN, R.; SWAMINATHAN, K. Nutritional status of *Pleurotus* spp. Grown on various agro-wastes. **Food Chemistry**, London, v. 80, n. 3, p. 371-375, 2003.
- RAJARATHNAM, S. Biodegradative and biosynthetic capacities of mushrooms. **Critical Reviews Biotechnology**, New York, v. 18, n. 2, p. 191-236, 1998.
- RAMPINELLI, J. R. et al. Valor nutricional de *Pleurotus djamor* cultivado em palha de bananeira. **Alimento e Nutrição**, Araraquara, v. 21, n. 2, p. 197-202, 2010.
- ROYSE, D. J.; SCHISLER, L. C. Yield and size of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus sajor-caju* as effected by delayed-release nutrient. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Heidelberg, v. 26, n. 2, p. 191-194, 1987.
- SILVA, E. G. et al. Análise química de corpos frutificação *Pleurotus sajor-caju* cultivado em diferentes concentrações de nitrogênio. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 1, p. 72-75, 2007.
- STAMETS, P. **Growing gourmet & medicinal mushrooms**. Berkely: Speed Press, 1993. 554 p.
- ZANETTI, A. L.; RANAL, M. A. Suplementação da cana-de-açúcar com guandú no cultivo de *Pleurotus* sp. "Florida". **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 32, n. 9, p. 959-964, 1997.

ZHANG, R. H.; LI, X.; FADEL, J. G. Oyster mushroom cultivation with rice and wheat straw. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 82, n. 3, p. 277-284, 2002.

### 3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

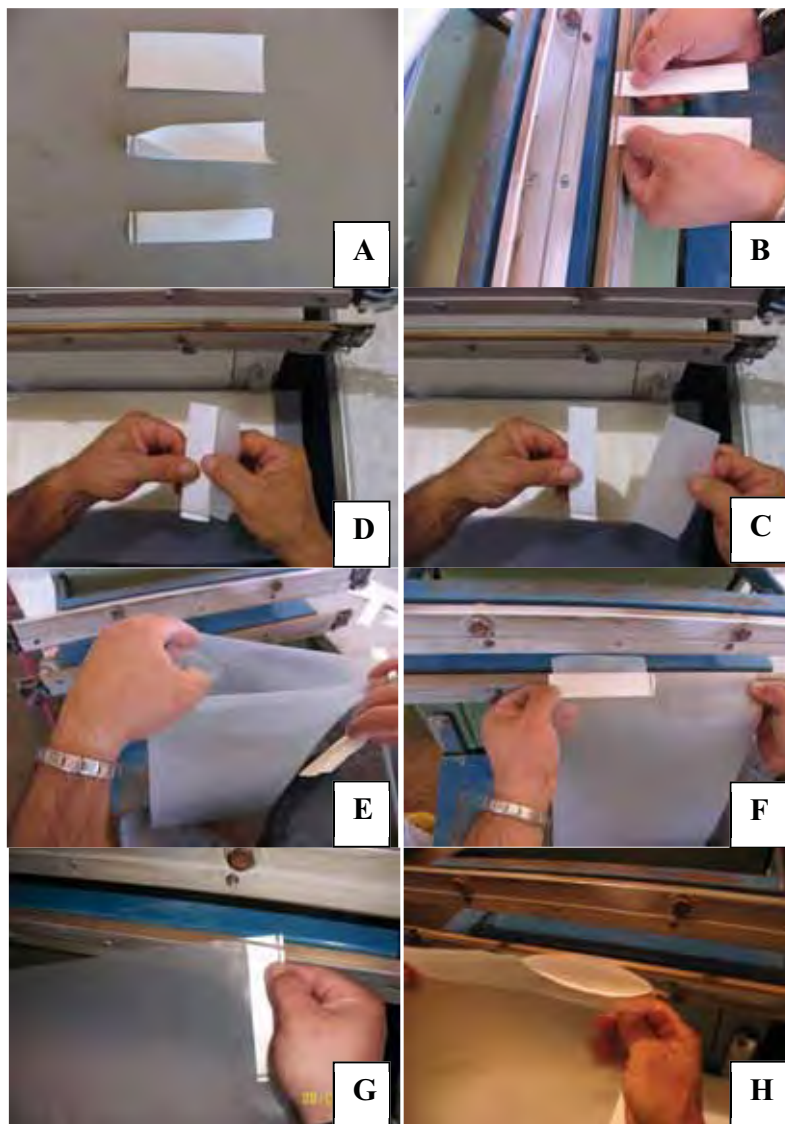
A análise da caracterização molecular do presente trabalho detectou a existência de variabilidade genética entre as linhagens avaliadas, porém o grupo 2 (três linhagens coletados de produtores) apresentaram similaridade genética demonstrando uma similaridade nos resultados obtidos nos parâmetros avaliados de produção diferentemente do grupo 1 (linhagem armazenada no banco de germoplasma do Módulo de Cogumelos);

O crescimento micelial em meio de cultura sólido pode ser uma indicação para a escolha do material segundo resultados sugeridos neste experimento e na literatura;

A dinâmica da compostagem e seus parâmetros envolvidos podem ajudar a estabelecer um protocolo para as Fases I e II resultando em um substrato seletivo para o cultivo de *P. ostreatus*. Estes parâmetros devem ser acompanhados e analisados visto que com a mudança do material base de modo geral estes parâmetros serão alterados;

O tipo de palha e a suplementação mostrou diferenças estatísticas entre alguns tratamentos deste experimento possibilitando estudos futuros afim de estabelecer correlações entre composição do substrato e produtividade e composição dos basidiomas de *P. ostreatus*.

## APÊNDICE - A



**Figura 2.** Preparo da embalagem para o inóculo: A,B. dobra e selagem do segmento de manta Tivek®, C,D. inserção um segmento de papel vegetal entre as lâminas do Tyvek®; E,F. encaixe do conjunto num dos cantos da manga plástica; G. fixação por selagem à quente; H. embalagem pronta.