



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
CÂMPUS DE BOTUCATU



STHEFANY RODRIGUES FERNANDES VIANA

**INFLUÊNCIA DE DIFERENTES CONDIÇÕES DE PREPARO DO SPAWN NA
CAPACIDADE DE AUMENTO DE PRODUTIVIDADE DE *Pleurotus ostreatus***

BOTUCATU

2018

STHEFANY RODRIGUES FERNANDES VIANA

**INFLUÊNCIA DE DIFERENTES CONDIÇÕES DE PREPARO DO SPAWN NA
CAPACIDADE DE AUMENTO DE PRODUTIVIDADE DE *Pleurotus ostreatus***

Tese apresentada à Faculdade de
Ciências Agronômicas da UNESP
Câmpus de Botucatu, para obtenção do
Título de Doutor em Agronomia
(Energia na Agricultura)

Orientadora: Profa. Dra. Meire Cristina
Nogueira de Andrade

BOTUCATU

2018

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

V614i Viana, Sthefany Rodrigues Fernandes, 1988-
Influência de diferentes condições de preparo do *spawn* na capacidade de aumento de produtividade de *Pleurotus ostreatus* / Sthefany Rodrigues Fernandes Viana. - Botucatu: [s.n.], 2018
65 p.: fots. color., grafs. color., tabs.

Tese (Doutorado)- Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2018
Orientadora: Meire Cristina Nogueira de Andrade
Inclui bibliografia

1. Cogumelos comestíveis - Produtividade. 2. Cultura e meios de cultura (Biologia). 3. Bioquímica. 4. Controle de qualidade. I. Andrade, Meire Cristina Nogueira de. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Câmpus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agrônômicas. III. Título.

Elaborada por Ana Lucia G. Kempinas - CRB-8:7310

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte"

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO


TÍTULO DA TESE: INFLUÊNCIA DE DIFERENTES CONDIÇÕES DE PREPARO DO SPAWN NA CAPACIDADE DE AUMENTO DE PRODUTIVIDADE DE *Pleurotus ostreatus*

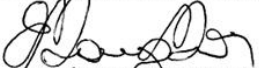
AUTORA: STHEFANY RODRIGUES FERNANDES VIANA
ORIENTADORA: MEIRE CRISTINA NOGUEIRA DE ANDRADE

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em AGRONOMIA (ENERGIA NA AGRICULTURA), pela Comissão Examinadora:


Prof.^a Dr.^a MEIRE CRISTINA NOGUEIRA DE ANDRADE
Engenharia Agrônômica / Faculdade Gran Tietê


Prof.^a Dr.^a GEISIANY MARIA DE QUEIROZ-FERNANDES
Medicina / Faculdade São Leopoldo


Prof. Dr. TADEU ANTÔNIO FERNANDES DA SILVA JÚNIOR
Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental / USC - Universidade do Sagrado Coração


Prof. Dr. EUSTÁQUIO SOUZA DIAS
Biologia / Universidade Federal de Lavras


Prof. Dr. JOSÉ RAIMUNDO DE SOUZA PASSOS
Bioestatística / Instituto de Biociências de Botucatu - UNESP

Botucatu, 17 de dezembro de 2018

À MINHA FAMÍLIA,
EM ESPECIAL ÀS MINHAS IRMAS
JULIANE, GABRIELA E CAROLINA

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Aos professores Dra. Marli Teixeira de Almeida Minhoni, Dra. Meire Cristina Nogueira de Andrade, Dr. José Raimundo Passos pela amizade, orientação, paciência e a realização deste trabalho.

Aos professores Dr. Marcos Correia, Dra. Marli Camassola, Dr. Leandro Morais, Dr. Emanuel Grassi, Dra. Letícia Osório e Dra. Adriana Gabia pela colaboração nos ensaios enzimáticos e orientações.

Aos responsáveis pelo Programa de Pós-Graduação Energia na Agricultura FCA/UNESP, pela oportunidade de realização deste projeto de pesquisa e auxílio financeiro constante para a realização do trabalho, em especial ao Professor Dr. Adriano Ballarin e Prof. Dr. Marco Biaggioni.

A todos os envolvidos nas pesquisas realizadas no Módulo de Cogumelos, sendo o local que nos dava estrutura e inspiração para discussão de trabalhos e auxílio a produtores familiares.

Aos funcionários da biblioteca da FCA, pelos importantes serviços prestados.

Aos colegas de Pós-Graduação, e a todos que de alguma forma contribuíram com a realização deste trabalho.

Às funcionárias da Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP – Botucatu, pela paciência, consideração e apoio recebido.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

.

“A IMAGINAÇÃO É MAIS IMPORTANTE QUE O CONHECIMENTO”.
ALBERT EINSTEIN

RESUMO

Pleurotus ostreatus (shimeji) está entre os três cogumelos comestíveis mais consumidos no Brasil e no mundo. Dentre os fatores relacionados à sua produtividade elevada, a mais relevante é a produção do *spawn*. *Spawn* é a primeira etapa no cultivo de cogumelos e inicia-se com o crescimento micelial *in vitro* em meios de cultura, chamado de matriz primária, posteriormente transferida para substrato sólido nomeada como matriz secundária, e então utilizado como inóculo para produção de cogumelos. O objetivo desse estudo foi avaliar a influência dos diferentes processos de preparo do *spawn* sob efeito na eficiência biológica do fungo *Pleurotus ostreatus*. Na matriz primária avaliou-se número de repicagem, velocidade do crescimento micelial, concentração de nutrientes, concentração de dextrose e fontes diversas de nutrientes no meio de cultura em função da eficiência biológica do fungo. Na matriz secundária: tempo de armazenamento, atividade enzimática de lacase (LAC) e manganês peroxidase (MnP) do *spawn* em função da eficiência biológica de *P. ostreatus*. Para isto, a pesquisa foi subdividida em dois capítulos. No primeiro avaliou-se a velocidade do crescimento micelial em doze diferentes combinações de meio de cultura utilizando diferentes concentrações de batata, quirera de milho, composto à base de serragem e dextrose, sob efeitos na interferência da eficiência biológica de *P. ostreatus*. Posteriormente avaliou-se a atividade enzimática LAC e MnP nos *spawns* e foi correlacionadas à eficiência biológica do primeiro e segundo fluxo de produção fungo. No segundo capítulo foram realizadas 10 repicagens sucessivas na matriz primária e armazenamento do *spawn* de 34 a 100 dias, correlacionadas à eficiência biológica e a atividade enzimática de LAC e MnP. Meios de cultura com maior concentração do nutriente à base de serragem e quirera tiveram resultados mais promissores em relação a velocidade do crescimento micelial, com menores variações nas características miceliais. A concentração de dextrose presente no meio de cultura não teve efeito significativo na velocidade do crescimento micelial *in vitro*. Contudo, o rápido crescimento micelial da matriz primária *in vitro* não teve correlação com à eficiência biológica do fungo *P. ostreatus*. As análises enzimáticas LAC e MnP realizadas no *spawn* do fungo não mostraram relação proporcional a eficiência biológica do cultivo de *P. ostreatus*, nem com o número de repicagens da matriz *in vitro* e nem com o tempo de armazenamento do *spawn*. Desta forma, velocidade de corrida micelial da matriz primária, atividade de lacase e manganês peroxidase,

número de repicagens e tempo de armazenamento do *spawn* não devem ser utilizadas como variáveis no controle de qualidade visando produtividade na seleção prévia do *spawn* do fungo *P. ostreatus*.

Palavras-chave: meio de cultivo, velocidade crescimento micelial, repicagens, atividade enzimática, métodos de controle de qualidade.

ABSTRACT

Pleurotus ostreatus (shimeji) is among the three most consumed edible mushrooms in Brazil and worldwide. Among the factors related to its high productivity, the most relevant is spawn production. Spawn is the first step in the cultivation of mushrooms and begins with mycelial growth in vitro in culture media, called the primary matrix, later transferred to a solid substrate named as secondary matrix, and then used as an inoculum for the production of mushrooms. The objective of this study was to evaluate the influence of different spawn preparation processes under effect on the biological efficiency of the fungus *Pleurotus ostreatus*. In the primary matrix, the number of grains, mycelial growth velocity, nutrient concentration, dextrose concentration and various nutrient sources in the culture medium were evaluated according to the biological efficiency of the fungus. In the secondary matrix: storage time, enzymatic activity of laccase (LAC) and manganese peroxidase (MnP) of spawn as a function of the biological efficiency of *P. ostreatus*. For this, the research was subdivided into two chapters. In the first, the mycelial growth rate was evaluated in twelve different combinations of culture medium using different concentrations of potato, maize cherry, sawdust and dextrose based compounds, on effects on the biological efficiency of *P. ostreatus*. The LAC and MnP enzymatic activity in the spawns was then evaluated and correlated to the biological efficiency of the first and second flow of fungus production. In the second chapter, 10 successive replications were performed in the primary matrix and storage of the spawn from 34 to 100 days, correlated to the biological efficiency and the enzymatic activity of LAC and MnP. Culture media with higher concentration of the nutrient based on sawdust and cherry have had more promising results in relation to mycelial growth rate, with smaller variations in mycelial characteristics. The concentration of dextrose present in the culture medium had no significant effect on mycelial growth rate in vitro. However, the rapid mycelial growth of the primary matrix in vitro had no correlation with the biological efficiency of *P. ostreatus* fungus. The LAC and MnP enzymatic analyzes performed on the spawn of the fungus showed no proportional relationship to the biological efficiency of the *P. ostreatus* culture, neither with the number of replications of the matrix in vitro nor with spawn storage time. Thus, mycelial race velocity of the primary matrix, laccase and manganese peroxidase activity, spawning numbers and storage time of the spawn should not be used as

variables in the quality control aiming productivity in the previous spawn selection of *P. ostreatus* fungus.

Keywords: culture medium, mycelial growth speed, enzymatic activity, quality control methods.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL.....	17
CAPÍTULO 1. INFLUÊNCIA DE PARÂMETROS FÍSICOS, BIOLÓGICOS E ENZIMÁTICOS NA QUALIDADE DA PRODUÇÃO DE SPAWN E NA EFICIÊNCIA BIOLÓGICA DE <i>Pleurotus ostreatus</i>.....	20
1.1 INTRODUÇÃO.....	22
1.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	24
1.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
1.4 CONCLUSÕES.....	42
REFERÊNCIAS.....	42
CAPÍTULO 2. INTERFERÊNCIA NA EFICIÊNCIA BIOLÓGICA DO FUNGO <i>Pleurotus ostreatus</i> EM RELAÇÃO AO NÚMERO DE REPICAGEM DA MATRIZ PRIMÁRIA E AO TEMPO DE ARMAZENAMENTO DO SPAWN SOB REFRIGERAÇÃO.....	47
2.1 INTRODUÇÃO.....	49
2.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	50
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	54
2.4 CONCLUSÕES.....	57
REFERÊNCIAS.....	57
CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	60
REFERÊNCIAS.....	61

INTRODUÇÃO GERAL

Ao longo dos últimos anos, com a grande expansão de processos biotecnológicos a importância dos cogumelos vem aumentando, favorecendo não apenas o consumo como também o seu cultivo. Os cogumelos comestíveis são reconhecidos e explorados pelas suas qualidades nutricionais e medicinais, sendo consumidos desde as antigas civilizações. São conhecidas mais de duas mil espécies de cogumelos potencialmente comestíveis, entretanto, aproximadamente, dez são exploradas para o consumo e comercialização (DONINI et al., 2006).

Mundialmente, é esperado um aumento no consumo de cogumelos comestíveis, devido a fatores como o seu alto teor nutritivo, fácil digestão, paladar e aroma agradável, controle do colesterol entre outras. No Brasil o cogumelo comestível ainda não é muito utilizado na dieta, com um consumo de aproximadamente 70g por habitante o que pode ser considerado um valor baixo quando comparado ao consumo médio dos franceses, que chega a 4Kg per capita (RIBEIRO, 2009).

Pleurotus ocupam o segundo lugar no ranking do mercado mundial de cogumelos e é o mais popular em alguns países (BELLETINI, 2015). Além de qualidades nutricionais, possui também vantagem de ser cultivado verticalmente em estufas, tornando possível a utilização de áreas pequenas. Requererem um período curto para seu crescimento, se comparadas a outras culturas. E apresentam grande resistência ao ataque de pragas e doenças, podendo dessa forma estabelecer um cultivo simples, com técnicas baratas, ampla utilização do substrato e alta produtividade (MACHADO et al., 2015; DONINI, 2006; DIAS, 2003; TSUJIYAMA; UENO, 2013; SAVOIE et al., 2007).

Dentro do gênero *Pleurotus*, as espécies comercialmente cultivadas e com considerável valor econômico são *P. ostreatus* (cogumelo ostra), *P. eryngii* (ostra-rei ou Cardoncello), *P. pulmonarius* (cogumelo phenix), *P. djamor* (cogumelo ostra cor-de-rosa), *P. cystidiosus* (ostra abalone), *P. citrinopieato* (cogumelo ostra-dourado) e *P. cornucopiae* (KNOP et al., 2015; ZHANG et al., 2014).

Cogumelos ostra (*Pleurotus* spp.) têm alta capacidade em produzir e secretar enzimas ligninolíticas específicas ao ambiente, lhes permitindo usar uma ampla gama de substratos como fonte de nutrientes e de energia necessários para a produção de corpos de frutificação (ALANANBEH et al., 2014).

Pleurotus é um fungo saprófito de podridão branca que vem sendo muito analisado devido às suas propriedades ligninolíticas excepcionais, essa ampla capacidade de utilizar lignina, celulose e hemicelulose como fonte de carbono e nutrientes lhe proporciona uma vasta possibilidade de uso de resíduos agroindustriais para a produção de corpos de frutificação (ALANANBEH et al., 2014; SHIN et al., 1997; MORERIA et al.2000; RUIZ, 2011).

Os resíduos agroindustriais são formados principalmente por biomassa ligninocelulósica, que representa uma importante fonte de matéria orgânica renovável (HOWARD et al., 2003). Com uma proporção aproximada de 2:1:1 de celulose, hemicelulose e lignina respectivamente, contém também diferentes concentrações de sais minerais, proteínas e pectinas (SILVA et al., 2009; DASCHTBAN et al., 2009; BETT; PERONDI, 2011).

Grandes quantidades de resíduos podem causar vários problemas ambientais, e considerando que o Brasil está entre os países com maior produção agrícola no mundo, há a necessidade de se estudar alternativas de uso (RIBEIRO, 2009). Os fungos de podridão branca, são microorganismos eficientes na produção da enzima lacase, capazes de degradar complexas frações de lignina, disponibilizando a celulose para outros microrganismos atuarem (PARENTI et al., 2013).

As enzimas lacases (LAC) e manganês peroxidase (MnP) têm sido extensivamente pesquisadas em *Pleurotus*, por converterem resíduos lignocelulósicos em produtos altamente úteis comercialmente além de sua aplicabilidade biotecnológica (Liu et al., 2009; Linke et al. 2005).

Na fungicultura são utilizadas para avaliar capacidade de transformação do material lignocelulósico em corpos de frutificação e grau de preservação de linhagens armazenadas em banco de culturas (BALDRIAN, 2006; EICHLEROVÁ et al., 2015; COGORNI et al., 2014; VELIOGLU; UREK, 2015).

O metabolismo dos fungos são baseados em exoenzimas secretadas no meio para digestão do substrato, degradando moléculas complexas em moléculas pequenas assimiláveis as organelas do fungo. O tipo de substrato, a variedade utilizada no cultivo, a técnica de cultivo (se submerso, semi-sólido e sólido), agitação, aeração, tempo de cultivo, composição do meio, concentração de indutores, força iônica, presença de repressores, temperatura e pH são fatores determinantes para a

expressão das enzimas lignocelulolíticas e para a proporção de enzimas produzidas (DEKKER et al., 2007; BETTIN, 2010).

A produção e manutenção das matrizes dos cogumelos comestíveis é inicialmente necessário o preparo de um substrato *in vitro* adequado para o crescimento das hifas. Tais substratos também devem ser preparados em condições adequadas de laboratórios e chamados tecnicamente de meios de cultura. Para isolamento de fungos filamentosos é normalmente recomendado o ágar-batata-dextrose (BDA), encontrado facilmente no comércio, sob forma desidratada. Contudo essa formulação de meio de cultura variam entre os produtores, quanto a fonte e quantidades dos ingredientes, variando a densidade e a concentração de nutrientes desejados para cultura (TOURNAS et al., 1998).

Sabendo da importância da produção de matrizes na produtividade do cultivo, ainda há pouco conhecimento sobre as interferências das matrizes na produção de cogumelos, tornando-se importante investigar o efeito de cada alteração da matriz sobre o efeito na eficiência biológica do fungo.

Sendo assim, objetivou-se avaliar a interferência dos processos de obtenção de *spawn* na eficiência biológica do fungo *P. ostreatus*; analisar a influência de repicagens sucessivas na matriz primária, a interferência da atividade enzimática lignolítica no *spawn* e o efeito do armazenamento do *spawn* em relação a eficiência biológica do fungo *P. ostreatus*.

CAPÍTULO 1 INFLUÊNCIA DE PARÂMETROS FÍSICOS, BIOLÓGICOS E ENZIMÁTICOS NA QUALIDADE DA PRODUÇÃO DE SPAWN E NA EFICIÊNCIA BIOLÓGICA DE *Pleurotus ostreatus*.

STHEFANY RODRIGUES FERNANDES VIANA^{1*}, LETÍCIA OSÓRIO DA ROSA², JOSÉ RAIMUNDO DE SOUZA PASSOS³, MEIRE CRISTINA NOGUEIRA DE ANDRADE⁴

^{1*}Programa de Pós Graduação em Agronomia: Energia na Agricultura, Faculdade de Ciências Agrônomicas, Univ. Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP), Brazil. ² Laboratório de enzimas e biomassa (LEB) – Instituto de Biotecnologia – Universidade de Caxias do Sul (UCS) ³ Departamento de Bioestatística, Univ. Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências ⁴Dra em agronomia, docente permanente do programa de pos graduação em agronomia (energia na agricultura), Faculdade de ciências agrárias, Univ. Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP), Botucatu, Brazil. *author for correspondence: sthefany.viana@yahoo.com.br

RESUMO: Os custos de produção de cogumelos estão em ascensão no Brasil devido ao aumento das despesas com insumos, energia e mão de obra. Maior rendimento e de matérias-primas em cogumelos se faz necessário, pois grande parte dos pequenos produtores brasileiros tem bioconversão abaixo da média do esperado por falta de tecnologia acessível. Dentre os fatores relacionados à alta produtividade de cogumelos, um dos mais importantes é a tecnologia de produção do *spawn*, também conhecida como "semente" ou "matriz". O objetivo desse trabalho foi avaliar a interação entre concentração de nutrientes, concentração de dextrose, fonte de nutrientes, velocidade do crescimento micelial da matriz primária, e a atividade de lacase (LAC) e manganês peroxidase (MnP) da matriz secundária sob efeitos na eficiência biológica do fungo *Pleurotus ostreatus*. O estudo foi subdividido em três ensaios. No primeiro, avaliou-se *in vitro* a interferência de diferentes nutrientes, concentração de dextrose e nutrientes sobre a velocidade do crescimento micelial da matriz fúngica. No segundo, foi correlacionada as interferências dessas condições da matriz *in vitro* sobre a eficiência biológica do *P. ostreatus*. E no terceiro ensaio foi avaliada a eficiência biológica do segundo ciclo de cultivo dos *spawns* selecionados, e a relação da atividade das enzimas lacase (LAC) e manganês peroxidase (MnP) do *spawn* sobre o resultado obtido da eficiência biológica. Meios de cultura à base de serragem e quirera com maior concentração do nutriente foram 150% mais velozes na corrida micelial *in vitro* da matriz primária em relação ao meio BDA comercial, com menores variações nas características miceliais. A variações de concentração de dextrose presente no meio de cultura não afetaram significativamente a velocidade do

crescimento micelial. O rápido crescimento micelial da matriz *in vitro* não teve correlação com a eficiência biológica de *P. ostreatus*. E as respectivas análises de atividade enzimática LAC e MnP nos tratamentos não demonstraram relação direta com os resultados obtidos de eficiência biológica do fungo. Velocidade de crescimento micelial na matriz primária, velocidade de crescimento micelial em matriz secundária, e atividade de LAC e MnP avaliadas no *spawn* não são variáveis diretamente proporcionais à EB% do fungo *Pleurotus ostreatus*. Não sendo assim variáveis indicadas para seleção prévia do *spawn*.

Palavra-chave: meio de cultura, velocidade crescimento micelial, atividade enzimática, métodos de controle de qualidade.

CHAPTER 1 INFLUENCE OF PHYSICAL, BIOLOGICAL AND ENZYMATIC PARAMETERS IN THE QUALITY OF SPAWN PRODUCTION AND IN THE BIOLOGICAL EFFICIENCY OF *Pleurotus ostreatus*.

STHEFANY RODRIGUES FERNANDES VIANA^{1*}, LETÍCIA OSÓRIO DA ROSA², JOSÉ RAIMUNDO DE SOUZA PASSOS³, MEIRE CRISTINA NOGUEIRA DE ANDRADE⁴

¹-Programa de Pós Graduação em Agronomia: Energia na Agricultura, Faculdade de Ciências Agronômicas, Univ. Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP), Brazil. ²- Laboratório de enzimas e biomassa (LEB) – Instituto de Biotecnologia – Universidade de Caxias do Sul (UCS) ³- Departamento de Bioestatística, Univ. Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências ⁴-Dra em agronomia, docente permanente do programa de pos graduação em agronomia (energia na agricultura), Faculdade de ciências agrárias, Univ. Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP), Botucatu, Brazil. *author for correspondence: sthefany.viana@yahoo.com.br

ABSTRACT: Mushroom production costs are on the rise in Brazil due to increased expenses with inputs, energy and labor. Higher yield and of raw materials in mushrooms is necessary, since most of the small Brazilian producers have bioconversion below the average expected for lack of accessible technology. Among the factors related to the high productivity of mushrooms, one of the most important is the spawn production technology, also known as "seed" or "matrix". The objective of this work was to evaluate the interaction between nutrient concentration, dextrose concentration, nutrient source, mycelial growth rate of the primary matrix, and the

activity of laccase (LAC) and manganese peroxidase (MnP) of the secondary matrix under effects on efficiency of the fungus *Pleurotus ostreatus*. The study was subdivided into three trials. In the first one, the interference of different nutrients, concentration of dextrose and nutrients on the mycelial growth rate of the fungal matrix was evaluated in vitro. In the second, the interference of these in vitro matrix conditions on the biological efficiency of *P. ostreatus* was correlated. And in the third experiment the biological efficiency of the second crop cycle of the selected spawns was evaluated, as well as the ratio of the activity of laccase (LAC) and manganese peroxidase (MnP) enzymes to the results obtained from the biological efficiency. Culture media based on sawdust and cherry with higher nutrient concentration were 150% faster in the in vitro mycelial race of the primary matrix in relation to the commercial BDA medium, with smaller variations in the mycelial characteristics. The variations in concentration of dextrose present in the culture medium did not significantly affect the rate of mycelial growth. The rapid mycelial growth of the in vitro matrix had no correlation with the biological efficiency of *P. ostreatus*. And the respective analyzes of enzymatic activity LAC and MnP in the treatments did not demonstrate a direct relation with the results obtained of biological efficiency of the fungus. Mycelial growth rate in the primary matrix, mycelial growth rate in the secondary matrix, and LAC and MnP activity evaluated in the spawn are not directly proportional to the EB% of the fungus *Pleurotus ostreatus*. Not being thus variables indicated for previous selection of the spawn.

Key words: culture medium, mycelial growth speed, enzymatic activity, quality control methods.

1.1 INTRODUÇÃO

Em São Paulo a fungicultura vem ganhando cada vez mais espaço. O último levantamento do Instituto de Economia Agrícola (IEA), da Secretaria de Agricultura e Abastecimento, apontou que em 2014 foram produzidas no estado 6 mil toneladas de cogumelos, com uma área de 127 hectares (Instituto de Economia Agrícola, 2014).

Segundo Cardoso et al., (2013) os cogumelos da espécie *Pleurotus ostreatus* (shimeji) ocupam a terceira posição mundial na produção de cogumelos comestíveis, ficando atrás apenas de espécies do gênero *Agaricus* (champignon) e da espécie

Lentinula edodes (shiitake). Isso ocorre devido ao seu sabor agradável, valores nutricionais, fácil adaptação aos diversos meios de cultivo e por suportarem ampla variação nas condições em que são cultivados.

Dentre os fatores relacionados à produtividade elevada nos cultivos de cogumelos, pode ser citado como um dos mais relevantes a produção de *spawn*¹, também conhecida como “inóculo” ou “matriz”. A qualidade do *spawn* é a primeira barreira enfrentada pelos fungicultores que querem fazer seu próprio composto, pois é necessário padrões de qualidade bem estabelecidos (FARNET et al., 2014; LARGETEAU, 2011).

Eira e Minhoni (1997), descrevem diferentes formatos de micélio em matrizes primária, e afirma que micélio com formação “fluffy” testado em composto de azevém pode levar a variações genéticas e/ou perdas das qualidades desejadas do cogumelo a ser produzido. Bernardi et al. (2007) descreve o vigor com densidade visual do micélio produzidos com casca de arroz, indicando que esse fator influenciou a qualidade da produção do mesmo, contudo o estudo não demonstra os dados dessa observação.

Autores descrevem também que o micélio necessita de tempo para adaptar os seus mecanismos enzimáticos, esses fatores são importantes uma vez que uma colonização acelerada do substrato, aumentará a competitividade do fungo a outros microrganismos, com maior produção enzimática e rendimento do cogumelo (RUIZ-RODRÍGUEZ et al., 2011; SHIN et al 1997; MORERIA et al.2000; RUIZ, 2011)

Lacase e manganês peroxidase representam a maioria das enzimas estudadas, por serem responsáveis pela transformação do material ligninocelulósico, que dão informações sobre a dinâmica desta transformação biológica, utilizadas também para determinar a preservação e qualidade das linhagens produzidas para *spawn* (BALDRIAN, 2006; EICHLEROVÁ et al., 2015).

Torna-se importante investigar o efeito de alterações físicas, biológica e enzimática na produção do *spawn* sobre a eficiência biológica do cogumelo *Pleurotus ostreatus*. Portanto, objetivou-se avaliar a influência dos processos de obtenção de *spawn* na eficiência biológica do fungo *P. ostreatus*, analisando a relação da atividade enzimática ligninolítica no *spawn*, velocidade de crescimento micelial *in vitro* sobre a eficiência biológica do *P. ostreatus*.

¹ Denomina-se *Spawn* ou “semente” o inóculo dos cogumelos comestíveis, ou seja, é o próprio fungo de interesse crescido em um determinado tipo de substrato.

1.2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisados primeiramente os efeitos da suplementação da matriz *in vitro*, e após foram conduzidos dois experimentos agronômicos de cultivo do fungo para determinar os efeitos da suplementação *in vitro* da matriz em relação a porcentagem de eficiência biológica e a atividade enzimática do *Spawn*. Os experimentos foram conduzidos nas estruturas da empresa Yuki Cogumelos, situada na cidade de Araçoiaba da Serra/SP- Brasil. A linhagem utilizada foi doada pelo produtor rural do fungo *P. ostreatus* da empresa.

1.2.1 Experimento I – Avaliação da corrida micelial do *Pleurotus ostreatus* *in vitro* em doze meios de cultura.

1.2.1.1 Produção da Matriz

Para iniciar a produção da matriz, foi aplicada a metodologia descrita por Minhoni et al. (2005). O isolamento da linhagem foi feita a partir da seleção de basidiocarpo sadio, produtivo, resistente e formato padrão (tamanho entre a 10-20mm), dando origem à primeira placa de Petri, utilizando meio BDA (GAVA, 2002; ROSA, 2007; TOURNAS et al., 1998). As placas com o fungo isolado, denominadas matrizes primárias, foram mantidas em estufa incubadores BOD a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, até cobertura de $\frac{3}{4}$ da superfície da placa (aproximadamente 6 dias).

O isolado utilizada foi rotulada para o experimento como *Pleurotus ostreatus* (PO), seguida por dois dígitos referentes ao ano de coleta do produtor (2012) e duas letras referindo-se ao produtor (YU): PO12/YU.

1.2.1.2 Método de preparo dos meios de cultura

Os meios de cultura preparados para a avaliação neste experimento são variações de substratos comercialmente utilizados por produtores rurais no Brasil. Portanto, foram utilizados substratos à base de batata (BDA), quirera de milho (QDA) e substrato comercial (SDA) de cultivo à base de serragem (Tabela 1). No preparo dos meios BDA e QDA foram testados combinações de 80g e 40 g de cada nutriente, e de dextrose 2,5g e 7,5g.

No meio à base de serragem foi pesado 80g de substrato recém-preparado contendo serragem de eucalipto, farelo de arroz, milho e trigo, submetidos à fervura,

em 500mL de água, durante 15 minutos, sendo em seguida filtrado em peneira de malha fina e analisado apenas a interferência da concentração de dextrose de 7,5 g , 2,5 g e nenhuma dextrose (tabela 1). Os preparos dos meios de cultura foram baseados em kohari et al. (1996).

Após o preparo dos meios de cultura, foram submetidos à autoclave a 121°C, a pressão de 1,5atm, durante 15 minutos para esterilização, sendo levados, posteriormente, ao laboratório para resfriamento. Quando o meio de cultura se aproximou a 45-50°C, foi vertido em placas de Petri esterilizadas (90x10mm) em cabine de segurança biológica.

Tabela 1. Composição dos meios de cultura utilizados para matriz in vitro da linhagem PO12/YU de *Pleurotus ostreatus*.

Tratamentos	Fonte de nutriente	Nutriente ⁽¹⁾ (g)	Dextrose ⁽¹⁾ (g)	Ágar- ágar ⁽¹⁾ (g)
Comercial	BDA(Difco®) ⁽²⁾	2	10	15
QDA-1	Quirera ⁽³⁾	40	7,5	15
QDA-2	Quirera	40	2,5	15
QDA-3	Quirera	80	7,5	15
QDA-4	Quirera	80	2,5	15
BDA-1	Batata ⁽⁴⁾	40	7,5	15
BDA-2	Batata	40	2,5	15
BDA-3	Batata	80	7,5	15
BDA-4	Batata	80	2,5	15
SDA-1	Substrato produção ⁽⁵⁾	80	7,5	15
SDA-2	Substrato produção	80	2,5	15
SDA-3	Substrato produção	80	0,0	15

⁽¹⁾ Volumes para produção de 500mL de cada meio de cultura; ⁽²⁾ Valores contidos na bula do PDA comercial Difco. ⁽³⁾ Quirera de milho; ⁽⁴⁾ Batata inglesa; ⁽⁵⁾ Substrato de produção comercial de *Pleurotus ostreatus*: para 48 kg de serragem úmida, foram utilizados farelo de trigo, milho e arroz, nas proporções de 2:1:1, respectivamente. A avaliação da corrida micelial foi realizada através de medições do diâmetro das colônias (média de 4 diâmetros), a cada 48 horas, durante o crescimento micelial na placa de Petri, incubadas no escuro em BOD a 25 ± 1 °C.

1.2.1.3 Delineamento experimental e análise estatística

O experimento I teve delineamento experimental inteiramente casualizado correspondente a doze meios de cultura com 6 repetições, totalizando 72 placas de Petri. Na análise estatística da variável crescimento micelial tendo como fatores meios de cultura, quantidade de nutrientes e açúcares, foram ajustados modelos lineares generalizados com a distribuição gama e função de ligação logarítmica (NELDER; WEDDERBURN, 1972).

A qualidade dos ajustes de todos os modelos lineares generalizados ajustados foi feita através da análise de desvios (deviance), gráficos dos resíduos de Pearson padronizados. Para comparações entre tratamentos foi utilizado o teste de Tukey-Kramer (Westfall, et al., 1999) do procedimento genmod do programa estatístico SAS – Free Statistical Statistical Software, SAS University Edition.

1.2.2 Experimento II – Avaliação da eficiência biológica de doze *spawns* provenientes das matrizes do experimento I

1.2.2.1 Formulação, inoculação e incubação do substrato do *Spawn*

O substrato utilizado para o preparo do *spawn* foi composto por 75% de serragem de eucalipto suplementada com 25 % da mistura farelo de trigo, milho e arroz, nas proporções de 2:1:1, respectivamente. Este substrato é utilizado comercialmente pelos produtores do fungo. Também foi utilizado 2% de calcário calcítico para correção do pH para próximo de $6,0 \pm 0,2$. A mistura de todos os ingredientes foi realizada em betoneira, adicionando-se primeiramente a serragem, e posteriormente os farelos e o calcário. Após 1 minuto de mistura a seco, o substrato foi umidificado com água de abastecimento público até a obtenção de 62% de umidade. Após o preparo foram acondicionados em potes de vidro contendo 650g cada e então submetido à autoclavagem a 121°C 3 horas (MINHONI et al., 2005).

A inoculação do *spawn* foi realizada em laboratório, em cabine de segurança biológica com auxílio de bisturi previamente flambado, transferindo triângulos de 1/4 do meio de cultivo para os frascos de vidro com substratos. Cada placa originou quatro vidros de *spawn*. Após a inoculação os vidros foram incubados em câmara climatizada a $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, durante 21 dias.

1.2.2.2 Formulação, inoculação e incubação do substrato de cultivo

O substrato utilizado para a produção do *P. ostreatus* foi o mesmo utilizado na produção do *spawn*, com os mesmos tratamentos de esterilização. Após período do crescimento micelial do *spawn* foi selecionado um frasco de vidro de forma aleatória referente a cada tratamento (meio de cultura). No dia seguinte à esterilização dos potes de produção realizou-se a inoculação do substrato. Os potes de produção foram

inoculados transferindo aproximadamente 20g do *spawn* para o pote de produção, em laboratório, em cabine de segurança biológica. Ao final da inoculação, todos os potes foram identificados, e colocados na sala de incubação que seguem os mesmos parâmetros descritos acima para incubação do *spawn*.

1.2.2.3 Processo de indução de primórdios e colheita

A indução para a formação de basidiomas ocorreu após 21 dias de incubação dos potes de produção, momento em que se observou a formação de diferenciação micelial na boca dos potes. Para a indução na formação dos basidiomas foi raspado com um garfo cerca de 0,5 cm de profundidade do substrato da boca de cada pote, processo conhecido como “kinkake” e/ou retirada de estroma entre os produtores. Em seguida, os potes foram transferidos a uma câmara climatizada a 11°C, com umidade relativa de 90%. Num período entre 8-12 dias a colheita foi concluída. Os basidiomas foram colhidos, cuidadosamente, quando os píleos do cacho apresentarem em média 20 mm de diâmetro. Após a colheita os mesmos foram pesados.

1.2.2.4 Determinação da eficiência biológica

A determinação da eficiência biológica (EB) foi avaliada por meio da porcentagem de produção do cogumelo fresco, em relação ao peso seco do substrato utilizado. $EB = ([\text{peso fresco de cogumelos}/\text{peso seco do substrato inicial}] \times 100)$.

1.2.2.5 Delineamento experimental

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado correspondente aos 12 *Spawns* com 64 repetições cada, totalizando 768 potes de produção. Na análise estatística da variável eficiência biológica, foram ajustados modelos lineares generalizados com a distribuição gama e função de ligação logarítmica tendo como fatores os tratamentos (NELDER; WEDDERBURN, 1972).

A qualidade dos ajustes de todos os modelos lineares generalizados ajustados foi feita através da análise de desvios (deviance), gráficos dos resíduos de Pearson padronizados. Para comparações entre tratamentos foi utilizado o teste de Tukey-Kramer (Westfall, et al., 1999) do procedimento genmod do programa estatístico SAS – Free Statistical Statistical Software, SAS University Edition.

1.2.3 Experimento III – 2º Ciclo de cultivo

1.2.3.1 Seleção dos *spawns*

Após os resultados do primeiro ciclo de colheita obtidos no experimento anterior foram selecionados três *spawns* com maior, mediano e menor eficiência biológica. Para um segundo ciclo de cultivo utilizando as mesmas matrizes secundárias, adicionados de análises de atividade enzimáticas (LAC e MnP). As etapas de inoculação e incubação do *spawn* foram realizadas conforme descrito no item 1.2.2.1.

1.2.3.2. Avaliação enzimática do micélio

1.2.3.2.1 Obtenção do caldo enzimático

As amostras dos substratos de *spawns* foram analisadas para atividade enzimática de acordo com Baldrian (2006). As enzimas foram obtidas a partir de amostras úmidas de 3g de cada tratamento. A amostra fúngica foi desfragmentada durante 2 minutos em um cadinho com auxílio de um pistilo junto a água destilada gelada. Após este período agitou-se durante 2 h em um agitador orbital (100 rpm min⁻¹) em erlemeyers de 250mL em frascos imersos em banho de gelo. O líquido foi então filtrado através de papel de filtro VWR Collection nº 100 e centrifugado a 4000rpm durante 15 minutos. O sobrenadante foi utilizado para as medições das atividades enzimáticas.

1.2.3.2.2 Análise de Lacase

A atividade de lacase foi determinada com o uso do substrato 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) (ABTS). A mistura reacional (0,4mL) continha: 0,18mL de tampão acetato de sódio 0,2 M, pH 5,0; 0,18mL de extrato enzimático adequadamente diluído e 0,04 mL do substrato ABTS 5mM. A oxidação do ABTS foi monitorada pelo aumento da absorbância em 420 nm, durante 90 seg a 25°C, em uma placa de 96 poços. A unidade de atividade enzimática foi definida enzima capaz de oxidar 1 umol de ABTS por minuto utilizando-se $\epsilon_{420} = 3,6 \times 10^4 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ (WOLFENDEN; WILSON, 1982).

1.2.3.2.3 Análise Manganês Peroxidase

A atividade de manganês peroxidases foi determinada pelo método proposto por Kuwahara et al. (1984). A mistura reacional (2mL) continha: 1mL de tampão succinato de sódio 20 mM, pH 4,5; 0,1mL de vermelho de fenol 0,1 % (m/v); 0,1 mL de lactato de sódio 250 mM; 0,2 mL de albumina bovina 0,5% (m/v); 0,05 mL de MnSO₄ 2mM; 0,05 mL de H₂O₂ 2mM, sendo adicionados 0,5 mL de amostra. Após 5 min a 30°C, as reações foram interrompidas pela adição de 40 µL de NaOH, 2M. A formação do produto de oxidação foi quantificada pela variação da absorbância em espectrofotômetro ($\epsilon_{610} = 4,46 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) com 0,3 mL colocados em uma placa de 96 poços, sendo considerado um branco para cada amostra com tempo zero de reação.

1.2.3.2.4 Determinação da eficiência biológica

As análises agronômicas feitas nos tratamentos foram realizadas conforme descrito anteriormente no item 1.2.2.4.

1.2.3.3 Delineamento experimental

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado correspondente aos 06 *Spawns* com 32 repetições cada, totalizando 192 potes de produção. Na análise estatística da variável eficiência biológica percentual foi ajustado por modelos lineares generalizados com a distribuição gama e função de ligação logarítmica tendo como fator os tratamentos (NELDER; WEDDERBURN, 1972).

Foi realizado análise de correlação de Spearman entre a variável acima descrita e os tratamentos, seguidas dos valores-p do teste cuja hipótese de nulidade considera a correlação nula, contra a hipótese de que a correlação é diferente de zero. A qualidade dos ajustes de todos os modelos lineares generalizados ajustados foi feita através da análise de desvios (deviance), gráficos dos resíduos de Pearson padronizados. Para comparações entre tratamentos foi utilizado foi o teste de Tukey-Kramer (Westfall, et al., 1999) do procedimento genmod do programa estatístico SAS – Free Statistical Statistical Software, SAS University Edition.

1.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados do crescimento micelial para os doze meios de cultivo, após seis dias de incubação apresentaram diferença significativa (Tabela 2). Observou-se que combinações no meio de cultivo contendo nutrientes à base composto de serragem e quirera tiveram o mais rápido crescimento micelial em relação aos outros tratamentos. O meio com a menor velocidade de crescimento micelial entre os resultados obtidos foi o meio de cultivo comercial Difco®.

Tabela 2. Velocidade de crescimento micelial (cm/dia) *in vitro* da linhagem PO12-YU de *Pleurotus ostreatus* em meios de cultura sólidos à base de extrato de batata, milho e serragem de eucalipto, após seis dias de desenvolvimento, a 25 °C ±1 °C.

_____ Tratamento _____					
Fonte nutriente	Concentração nutriente (g)	Concentração dextrose (g)	cód.	média ⁽¹⁾ (cm/dia)	epm ⁽²⁾
Serragem	80	2,5	SDA-2	5,85 ^a	0,41
Serragem	80	7,5	SDA-1	5,73AB	0,44
Quirera	40	2,5	QDA-2	5,40AB	0,48
Serragem	80	0	SDA-3	5,18AB	0,40
Quirera	80	7,5	QDA-3	5,14BC	0,46
Quirera	40	7,5	QDA-1	5,11BC	0,43
Quirera	80	2,5	QDA-4	4,53C	0,46
Batata	40	7,5	BDA-1	4,40D	0,34
Batata	80	7,5	BDA-3	3,94DE	0,34
Batata	80	2,5	BDA-4	3,90DE	0,34
Batata	40	2,5	BDA-2	3,61DE	0,41
Difco	2	10	Comercial	2,10E	0,14

⁽¹⁾ Médias seguidas de letras iguais maiúsculas na coluna, não diferem entre si (Tukey-kramer, 5%).

⁽²⁾ Erro padrão da média.

O principal objetivo de um *spawn* é manter produtividade elevada, uniformidade dos corpos de frutificação, precocidade, resistência a pragas e doenças. Iniciando pelo crescimento da matriz primária *in vitro* a partir do crescimento micelial de um fragmento do cogumelo selecionado, que deve ser colocado em um substrato (meio de cultivo) que dê condições nutricionais e ambientais favoráveis ao seu desenvolvimento (EIRA; BUENO, 2005).

Os produtores brasileiros recorrem a textos técnicos dos autores Bononi et al. (1999), Eira e Bueno (2005), Rosa (2007) e Urben (2004), provavelmente por sua linguagem simples e aplicável aos desafios comumente enfrentados.

Eira e Bueno (2005), descrevem com mais detalhes a importância de se observar características visuais do micélio, citando três diferentes tipos de micélio observados na matriz primária. O micélio “fluffy”, em inglês significa fofo, que consiste de micélio semelhante às fibras de algodão, o qual é orientado a ser descartado, pois pode estar associado ou ser confundido com estroma observado em algumas situações crescendo sobre a cama de cultivo de *Agaricus bisporus*, apresentando assim uma queda na produtividade. Também é possível observar o micélio tipo “adensado” que apresenta baixa taxa de crescimento no meio de cultivo e também deve ser descartado. O terceiro tipo denominado rizomórfico é normalmente descrito como um micélio que preserva as condições genéticas relacionadas à produtividade e qualidade dos basidiocarpos, contendo hifas dicarióticas, com crescimento vigoroso e ramificado. Segundo Eira e Bueno (2005) o micélio “rizomórfico” deve ser selecionado a dar sequência à produção de *Spawn* ou armazenamento da cepa, porém, não foram encontrados dados científicos que confirmem essa afirmação.

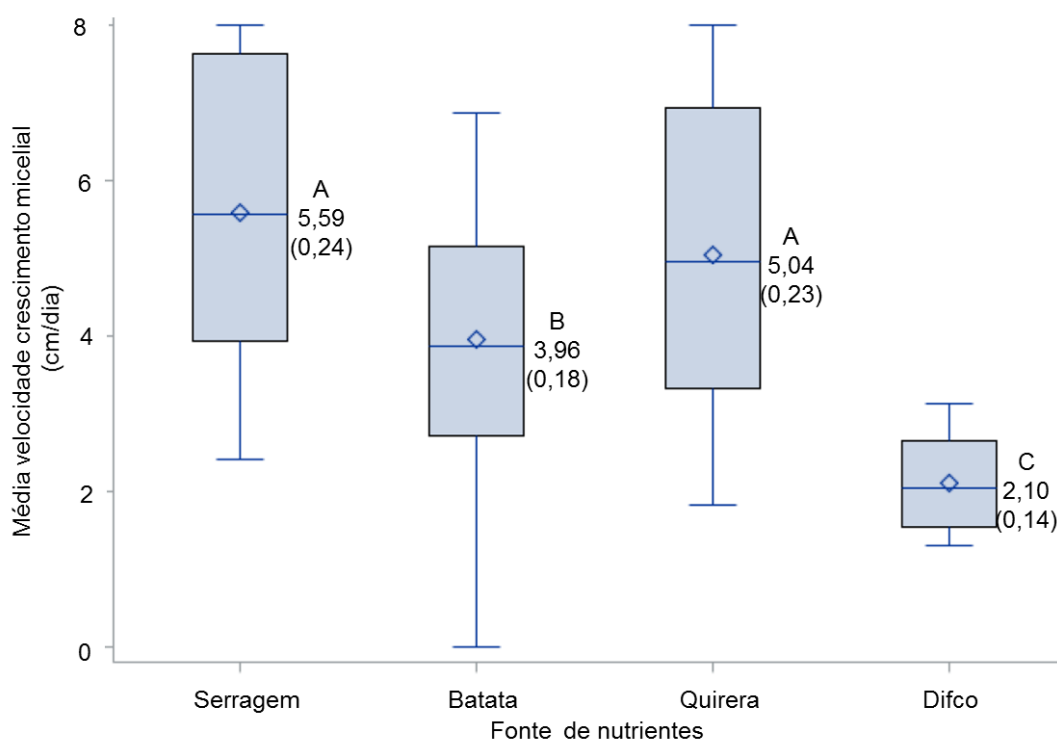
Miles e Chang (2004), analisaram diferentes meios relacionados à velocidade corrida micelial e seu vigor (fluffy, densado ou rizomórfico). Observaram que meios de cultivo à base de composto moído mais ágar davam menor variação no aspecto do micélio do que meios de cultivo à base de malte. Essa observação também foi percebida neste estudo em que o meio de cultivo utilizando como base o substrato de produção, serragem, além de ser rápido, apresentou menor variação micelial em relação a placas com batata e quirera, desenvolvendo micélio tipo rizomórfico em todas as placas.

Bernardi et al. (2007) descreveram significância entre diferentes grãos pertencentes à mesma família (Poaceae) em relação a corrida micelial de *Pleurotus ostreatus* ‘Florida’, podendo desta forma distinguir estatisticamente qual grão é o mais adequado para produção de *Spawn*. Andrade et al. (2008) também teve resultados parecidos, no qual meios à base de serragem obtiveram um crescimento micelial mais rápido quando comparado ao BDA. E descreve que meios de cultivo utilizando substrato de produção do fungo possibilita avaliar qual meio mais adequado, por estar simulando os nutrientes encontrados posteriormente no substrato de cultivo.

Considerando que o nutriente quirera é também um componente utilizado no substrato de cultivo, assim como Andrade et al. (2008) os resultados também indicam que meios contendo fontes de nutrientes contidos no substrato de cultivo do fungo

tendem a ter crescimento micelial beneficiada em relação aos outros meios de cultivo (Figura 1).

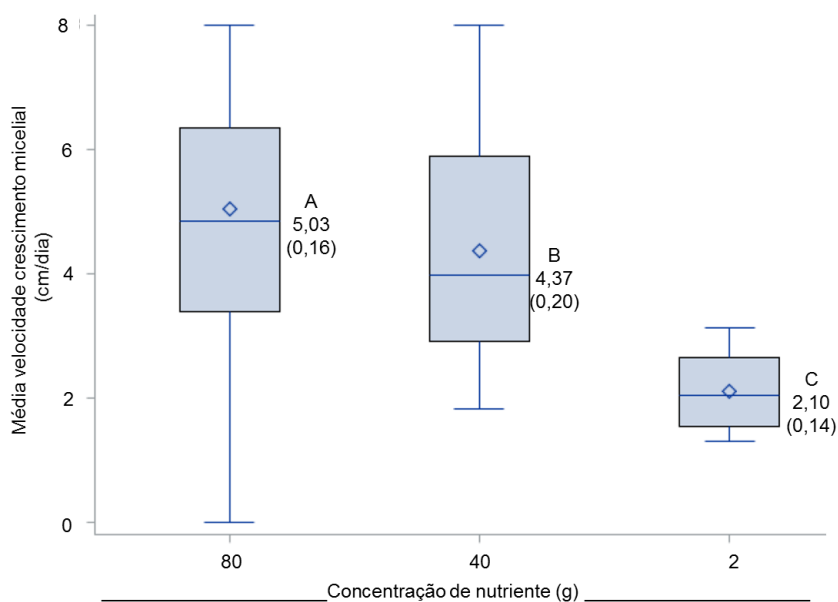
Figura 1. Box-plot da comparação da velocidade de crescimento micelial (cm) *in vitro* de *Pleurotus ostreatus* (PO12/YU) em meio sólido preparados à base de quirera, batata e extrato de serragem. Após 6 dias de incubação a $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ (6 repetições por meio de cultura). Médias seguidas de mesma letra, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey-kramer ao nível de 5% de significância. Erro padrão da média entre parênteses.



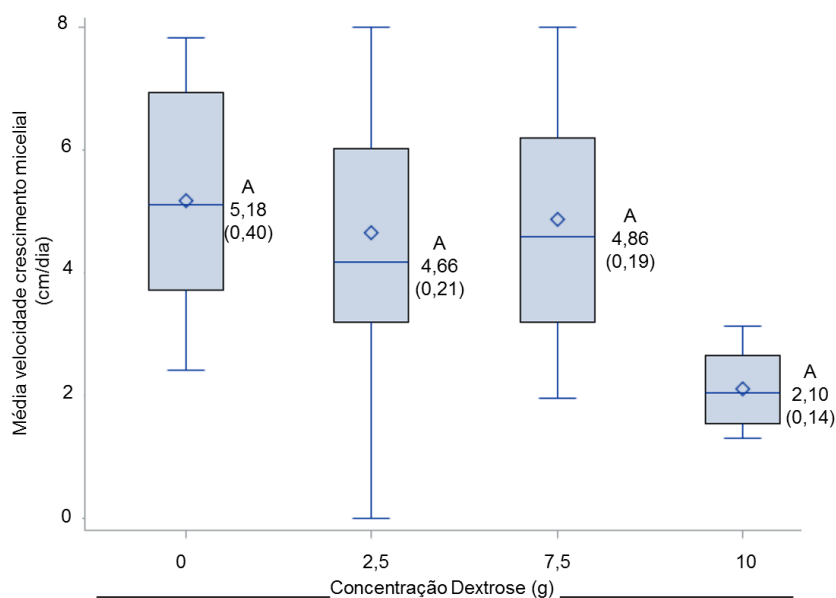
Médias seguidas de mesma letra, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey-kramer ao nível de 5% de significância. Erro padrão da média entre parênteses.

O meio de cultivo tem como objetivo fornecer uma quantidade de nutrientes suficiente para suportar o vigoroso crescimento vegetativo do micélio (DAHLBERG; LAPOLT, 1996). As diferentes concentrações de nutrientes nos meios de cultivo demonstraram que meios com maior concentração (80g) de quaisquer nutriente tiveram melhores resultados de velocidade de crescimento micelial em todos os tratamentos. No entanto, a concentração de dextrose nos meios de cultivo não afetaram de maneira significativa a velocidade do crescimento micelial *in vitro* de *P. ostreatus* (Figura 2).

Figura 2. Box-plot da comparação do crescimento micelial (cm) *in vitro* de *Pleurotus ostreatus* (PO12/YU) em meio sólido preparados com diferentes concentrações de nutrientes e dextrose. Após 6 dias de incubação a $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ (6 repetições por meio de cultura).



Médias seguidas de mesma letra, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey-kramer ao nível de 5% de significância. Erro padrão da média entre parênteses.



Médias seguidas de mesma letra, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey-kramer ao nível de 5% de significância. Erro padrão da média entre parênteses.

O rápido desenvolvimento do micélio sobre o composto é importante, pois além de reduzir o tempo de cultivo, evita-se risco de contaminação por outros fungos ou bactérias que podem comprometer a produtividade (MAMIRO; ROYSE, 2008;

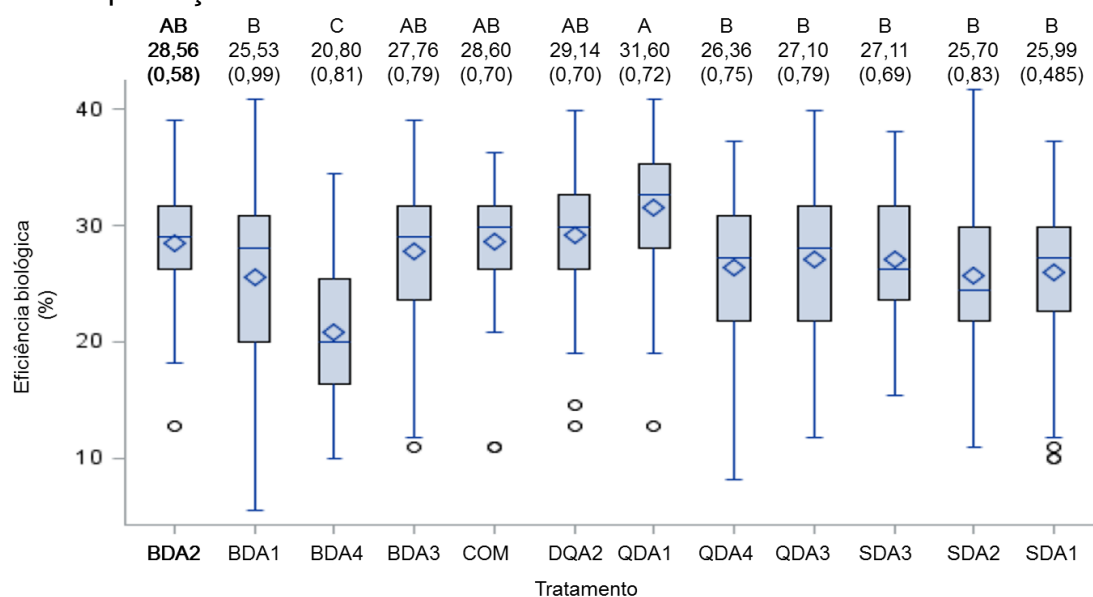
ROYSE, 2002; ROSSI, 2001). Mesmo sabendo que a velocidade do crescimento micelial rápida é de fundamental importância, outras variáveis podem afetar essa velocidade como: densidade, área de superfície, pH, entre outras, nem sempre sendo correspondente a velocidade do crescimento da matriz primária em placas de Petri.

Autores têm enfatizado que variações no formato e na quantidades do *spawn* interferem na eficiência biológica do cultivo, concluindo muitas vezes que existe um limite variando de 8-10% de inóculo para um desempenho adequado e satisfatório economicamente aos produtores (BERNARDI et al., 2007; BELLETTINI et al., 2016; PURI, 2011; YANG, 2013; STAMETS, 2000). Zhang et al. (2014) descreve que o aumento de inóculo no substrato de cultivo pode aumentar em até de 11,5% o rendimento dos cogumelos, reduzindo também o tempo de incubação do *spawn* e do cultivo.

Através da análise de correlação foi possível verificar que a velocidade do crescimento micelial nos meios de cultivo não tiveram correlação com a EB entre os doze *spawns* provenientes dos tratamentos da matriz *in vitro*, com $p > 0,05$ (0,61175). Indicando que o meio de cultura é fonte importante de manutenção do fungo isolado, entretanto, não corresponde às características fundamentais para sua produtividade, ou seja, o desenvolvimento rápido do micélio *in vitro* não deve ser uma premissa para visar a produtividade, e sim uma premissa que visa a manutenção da cultura de forma vigorosa.

Na análise agrônômica em todos os tratamentos, os cogumelos foram produzidos com sucesso. Os tratamentos QDA-1, QDA-2, comercial, BDA-3, BDA-2, BDA-1, QDA-4, QDA-3, SDA-3, SDA-2 E SDA-1 não tiveram diferença significativa variando de 25,53% a 31,60%, e o tratamento com menor eficiência biológica foi BDA-4 com eficiência biológica de 20,80% (Figura 3).

Figura 3. Box-plot da eficiência biológica em % da linhagem PO12/YU de *Pleurotus ostreatus*, cultivada em substrato sólido a base de serragem e farelos, no primeiro fluxo de produção.



Médias seguidas de letras iguais, não diferem entre si pelo teste Tukey-kramer, 5%. Erro padrão da média entre parênteses.

Nas tabelas 3 e 4 há sugestão de interação tripla entre as variáveis do meio de cultivo da matriz primária sobre o efeito na eficiência biológica de *P. ostreatus*, essa interação entre as variáveis demonstra a dificuldade de produtores rurais chegarem a conclusões claras durante as tomadas de decisão no cultivo.

Tabela 3. Eficiência biológica média da linhagem PO12-YU de *Pleurotus ostreatus* segundo concentração de açúcar, quantidade de nutrientes e ingrediente do meio de cultura.

Concentração dextrose (g)	Quantidade nutriente (g)	Fonte de nutriente	
		Batata	Quirera
2,5	40	28,56aA (0,58)	29,14aA (0,70)
	80	20,80bB (0,81)	26,36aA (0,75)
7,5	40	25,53aB (0,99)	31,60aA (0,72)
	80	27,76aA (0,79)	27,10bA (0,79)

Médias seguidas de mesma letra maiúsculas na vertical e minúsculas na horizontal não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey Kramer ao nível de 95% de confiança. Erro padrão da média entre parênteses.

O meio à base de quirera demonstra menor variação quando levado em conta a EB da cultura. A única interação desfavorável para o meio quirera foi quando combinada 80g com a maior concentração de dextrose, essa situação pode estar relacionada com a repressão metabólica do fungo quando presente a altos índices de açúcares disponíveis no meio. Sabendo-se que a concentração do amido (polissacarídeo) em cereais geralmente é maior do que em tubérculos, e que o meio é realizado com batata fresca (peso úmido), contra quirera seca (peso seco), ou seja, apesar de serem calculados com o mesmo peso a concentração de amido presente na quirera provavelmente é maior que a presente na batata. A combinação de 7,5 açúcar com 80 g de quirera, resulta numa condição que torna o meio a base de quirera desfavorável a produtividade do fungo.

Quando utilizado 40g de nutriente por meio (menor concentração de nutriente) a variação da quantidade da dextrose não interfere significativamente a EB do fungo *P. ostreatus* entre meios à base de batata ou quirera. Já em relação a concentração de 2,5g de açúcar, combinados à nutriente batata, ao aumentar a concentração de nutriente, é observada queda EB (Tabela 3).

A mesma situação ocorre quando fixamos a variável concentração do nutriente, o meio com fonte de nutriente batata sofre maior efeito das interações entre as variáveis contidas no meio, quando comparada a quirera que se mantém mais constante.

Tabela 4. Eficiência biológica média da linhagem PO12-YU de *Pleurotus ostreatus* segundo concentração de açúcar, quantidade de nutrientes e ingrediente do meio de cultura.

Quantidade nutriente (g)	Fonte de nutriente	Concentração dextrose (g)	
		2,5	7,5
40	Batata	28,56aA (0,58)	25,53aB (0,99)
	Quirera	29,14aA (0,70)	31,60aA (0,72)
80	Batata	20,80bB (0,81)	27,76aA (0,79)
	Quirera	26,36aA (0,75)	27,10bA (0,79)

Médias seguidas de mesma letra maiúsculas na vertical e minúsculas na horizontal não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey-Kramer ao nível de 95% de confiança. Erro padrão da média entre parênteses.

Esses resultados demonstram que os meios de cultura à base de quirera são mais estáveis e promissores para manutenção do vigor das matrizes primárias, pois têm uma interferência menor das outras variáveis na produção do meio de cultura.

Na análise de interação entre as variáveis, foi verificado efeito significativo no meio batata entre o dextrose e a concentração de nutriente (Tabela 5). Mostrando que o meio de cultivo a base de batata com maior concentração de nutriente tende a se relacionar de maneira positiva com maior concentração de dextrose.

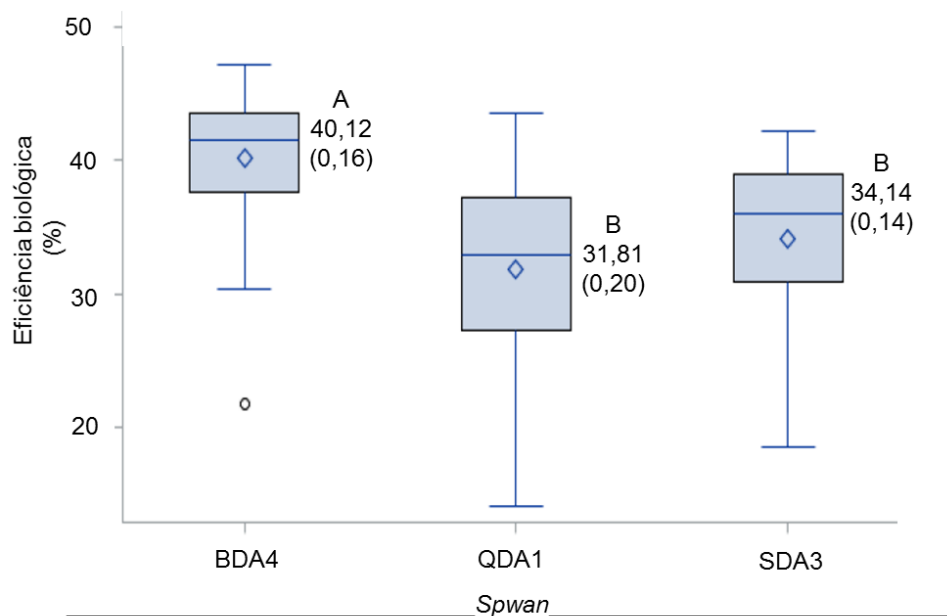
Tabela 5. Eficiência biológica média da linhagem PO12-YU de *Pleurotus ostreatus* segundo quantidade de nutrientes e concentração de açúcar no meio de cultura a base de batata.

Quantidade de nutriente	Meio batata	
	Concentração dextrose	
	2,5	7,5
40	28,56aA (0,58)	25,53aB (0,99)
80	20,80 bB (0,81)	27,76aA (0,79)

Médias seguidas de mesma letra maiúsculas na vertical e minúsculas na horizontal não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey Kramer ao nível de 95% de confiança. Erro padrão da média entre parênteses.

No segundo ciclo de cultivo do fungo foi analisado novamente o *spawn* QDA-1 mais produtivo, *Spawn* QDA-1 menos produtivo e SDA-3 como intermediário para uma reavaliação. Foram novamente colocados para análise de eficiência biológica mantendo as mesmas condições da produção anterior. Constando uma inversão de resultados, não havendo similaridade com o resultados do primeiro ciclo de produção. No qual, a EB o tratamento BDA-4 obteve a melhor eficiência biológica de 40,12%, e o tratamento com menor eficiência biológica foi QDA-1 e SDA-3 com eficiência biológica de 31,81% e 34,14% respectivamente (Figura 4).

Figura 4. Box-plot da porcentagem da eficiência biológica da linhagem PO12/YU de *Pleurotus ostreatus*, cultivada em substrato sólido a base de serragem e farelos, no primeiro fluxo de produção.



Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si (Tukey kramer, 5%). Erro padrão da média entre parênteses.

Kohari et al. (1996), faz comparação entre crescimento micelial e vigor e afirma que o *spawn* que germinou primeiramente era o mais promissor, contudo, não demonstra na pesquisa relação significativa do vigor observado e nem a velocidade do micélio anteriormente descrito por eles.

Além da reavaliação dos dados agrônômicos após 15 dias de incubação foi possível selecionar dentre o mesmo tratamento *spawn* com crescimento micelial 100% e *spawn* mais atrasado, como demonstra abaixo na Figura 5 e Tabela 5.

Figura 5. Variação de crescimento micelial realizado com mesmo meio de cultura QDA-1, no mesmo substrato nas mesmas condições de desenvolvimento do fungo *Pleurotus ostreatus* com 15 dias de incubação.

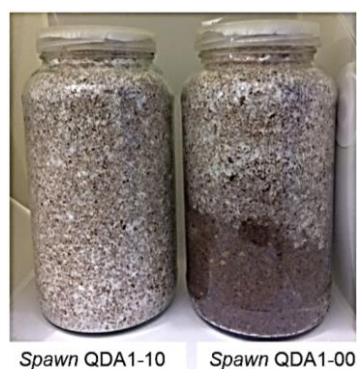
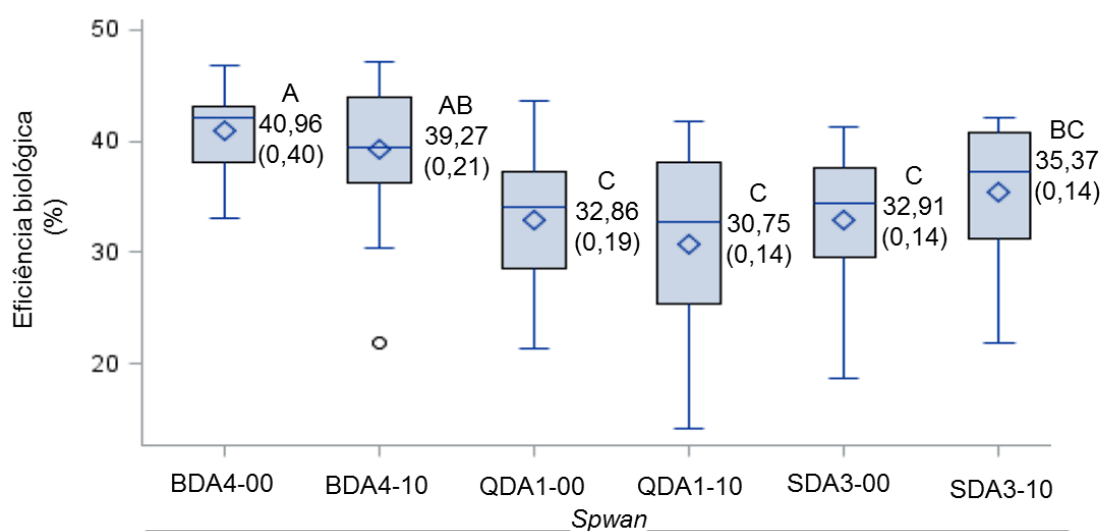


Tabela 5. Códigos utilizados na seleção de *Spawns* para avaliação do experimento III.

	Tratamentos	código
<i>Spawn</i> mais produtivo	<i>Spawn</i> fechada com 15 dias	QDA1-10
	<i>Spawn</i> não fechada	QDA1-00
<i>Spawn</i> menos produtivo	<i>Spawn</i> fechada com 15 dias	BDA4-10
	<i>Spawn</i> não fechada	BDA4-00
<i>Spawn</i> convencional	<i>Spawn</i> fechada com 15 dias	SDA3-10
	<i>Spawn</i> não fechada	SDA3-00

Em relação a diferença do crescimento micelial do *Spawn* (mais rápido e o mais lento) no mesmo tratamento, não houve diferencial estatístico entre EB dos *spawns* (Figura 6).

Figura 6. Box-plot da porcentagem da eficiência biológica da linhagem PO12/YU de *Pleurotus ostreatus*, cultivada em substrato sólido a base de serragem e farelos, no primeiro fluxo de produção.



Médias seguidas de letras iguais maiúsculas na coluna, não diferem entre si (Tukey, 5%). Erro padrão da média entre parênteses.

Lacase (LAC) e manganês peroxidase (MnP) foram analisadas em cada *spawn* avaliados no segundo ciclo, para verificar se estão diretamente relacionadas a eficiência biológica da matriz (BELLETTINI et al., 2016) contudo neste trabalho as

enzimas ligninocelulíticas (LAC e MNP) analisadas nos *spawns* através da análise de correlação entre LAC, MNP e EB% estatisticamente é nula. Não podendo assim ser considerada uma variável de controle de qualidade para prever produtividade das matrizes.

Os maiores valores de lacase foram observados no *spawn* da matriz QDA1-00 (lento) com valores de 1318,67 U/g e mínima no *spawn* SDA3-10 (rápido) com 517,11 U/g. Já manganês peroxidase com máxima no *spawn* QDA1-00 (lento) 98,34 U/g e valor mínimo em QDA1-10 (rápido) não havendo atividade (Tabela 6).

Tabela 6. Atividade enzimática lacase (LAC) e manganês peroxidase (MnP) (U/g) do *spawn* da linhagem PO12-YU de *Pleurotus ostreatus* em meio sólido à base de serragem, após quinze dias de desenvolvimento, a 25 °C ±1°C.

Fonte nutriente	Tratamento		CÓDIGO	LAC (U/g)	MnP (U/g)	
	Concentração Nutriente (g)	Concentração dextrose (g)				
Batata	80	2,5	Rápido	BDA4-10	1017,04	82,05
Batata	80	2,5	Lento	BDA4-00	1222,25	68,73
Quirera	40	7,5	Rápido	QDA1-10	1107,34	0,00
Quirera	40	7,5	Lento	QDA1-00	1318,67	98,34
Serragem	80	0	Rápido	SDA4-10	517,11	78,03
Serragem	80	0	Lento	SDA4-00	1096,39	90,30

Médias seguidas de letras iguais, maiúsculas para eficiência biológica e minúsculas para porcentagem de produtividade iguais, não diferem entre si (Tukey-kramer 5%).

O dextrose está relacionado com repressão catabólica de muitos fungos, sendo relacionada provavelmente com a economia de energia (PISCITELLI et al., 2011). No atual experimento essa repressão catabólica em meios com alta concentração de dextrose na matriz *in vitro* não foi uma condição transmitida para a matriz secundária, não causando efeito significativo na atividade enzimática e nem mesmo da EB% do fungo. Isso pode se dar pela alta capacidade de se adaptar aos meio que o *Pleurotus ostreatus* têm, contudo ao longo prazo pode causar efeitos de mutação na manutenção da linhagem levando o fungo a diminuir a cinética de síntese de lacase.

Bettin (2010), em sua pesquisa concluiu que concentrações de 0,5% de glicose do meio de cultivo é considerada a mais vantajosa, mesmo dobrando ou quadruplicando a concentração inicial de glicose, não ocorre melhoria na produção de biomassa.

Golveia (2016), afirma que para todos os tratamentos contendo diferentes resíduos vegetais o aumento da atividade de lacase foram acompanhadas por diminuição dos níveis de açúcar, com maiores médias no 6º e 7º dia de produção 1500U.mL⁻¹ e 2400 U.ml⁻¹ respectivamente.

A flutuação da enzima lacase também está relacionada ao teor de proteína e carboidratos contido no meio (WANG et al., 2014), nutrientes que podem ter efeitos interativos entre si, sendo esse uma variável não avaliada neste experimento podendo desta maneira ter influenciado nos resultados observados (BELLETINI, 2016).

Análises de lacase e manganês peroxidase são também utilizadas para avaliar a preservação de matrizes fúngicas a longo prazo, no qual essa habilidade está associada ao desempenho do fungo em degradar substratos lignocelulolíticos, sendo muito citadas em trabalhos atuais em preservação das características genéticas e de biotecnologia (EICHLEROVÁ et al., 2015) (OHGA; ROYSE, 2001). Entretanto, sua habilidade de degradar substratos lignocelulolíticos não representaram um informações aplicável a seleção de *spawn* a produtores de cogumelos, que atuam no Brasil com técnicas de seleção arriscadas.

O produtor deve estar atento às fases de cultivo relacionadas ao metabolismo e preferências de sua linhagem selecionada, buscando encontrar “tempos” corretos de cada fase (incubação, maturação, indução), que nem sempre serão exatamente as mesmas entre os isolados, podendo ser esse um dos fatores que ocasione a flutuação da produtividade durante o ano. Além de que, se os produtores não conseguem manter seu padrão mínimo de seus processos, estão a todo momento oferecendo novas “situações” a seus fungos, ficando cada vez mais difícil a tomada de decisão.

Por mais que os tratamentos de cultivo estivessem no mesmo tempo em relação às datas, seu “período metabólico” era diferente, não tendo desta forma, comparações entre os tratamentos de forma linear, nem atividade enzimática, nem mesmo com eficiência biológica. Patrick (2014), descreve em seu trabalho que a produção de enzimas está relacionada a diferentes estágios de degradação do substrato, sendo que a Lacase tem seu maior pico aos primeiros sete dias e antes do primeiro fluxo (40.56 Ug⁻¹). MnP também está em maiores quantidades antes do primeiro fluxo, contudo em níveis mais baixos (7.44 Ug⁻¹) em *Pleutorus sapidus*.

Bánfi et al. (2015), também observaram maiores picos de Lac e MNP antecedendo o primeiro fluxo, seguidos por celulasas e hemicelulasas durante fluxo de produção. Através das enzimas lignolíticas é possível verificar a “capacidade e

facilidade” que o fungo tem de metabolizar diferentes nutrientes provindos do substrato. Isso é descrito entre os produtores como a voracidade e rusticidade de cada fungo.

Nesse trabalho foi possível concluir que isolados de um mesmo cogumelo podem variar suas características de interesse, sendo desta forma importante a avaliação dos isolados antes de sua seleção. Segundo Eira e Bueno (2005), a região onde é feita a matriz pode influenciar na qualidade do *Spawn* produzido, sendo que estas características geralmente estão mais adaptadas a aquela região. É essencial o entendimento das fases e metabolismo de cada isolado do fungo de interesse para então selecionar e obter a matriz que melhor atende às expectativas do produtor e seu manejo.

1.4 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos e de acordo com a condução dos experimentos propostos, conclui-se que:

- O meio de cultura contendo nutrientes a partir do substrato mostrou-se mais promissor referente a velocidade do crescimento micelial.
- A velocidade do crescimento micelial da matriz primária (*in vitro*) não teve relação com a eficiência biológica do *Pleurotus ostreatus*.
- A velocidade do crescimento micelial da matriz secundária não teve relação com a eficiência biológica do *Pleurotus ostreatus*.
- Através das análises enzimáticas de lacase e manganês peroxidase realizadas no *spawn* do fungo, não foi possível relacioná-la com a eficiência biológica do cultivo *P. ostreatus*.

REFERÊNCIAS

ALANANBEH, K. M., Bouqellah, N. A., Kaf, N. S. A. Cultivation of oyster mushroom *Pleurotus ostreatus* on date-palm leaves mixed with other agro-wastes in Saudi Arabia. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v.21, p.616–625, 2014.

ANDRADE, Meire et al. 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.**, Maringá, v. 30, n. 3, p.333-337, 2008.

BALDRIAN, Petr. Fungal laccases – occurrence and properties. **Fems Microbiology Reviews**, Czech Republic, v. 30, n. 2, p.215-242, mar. 2006. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-4976.2005.00010.x>.

BÁNFI, Renáta et al. Characterisation of the large-scale production process of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) with the analysis of succession and spatial heterogeneity of lignocellulolytic enzyme activities. **Fungal Biology**, Hungary, v. 119, n. 12, p.1354-1363, dez. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.funbio.2015.10.003>.

BELLETTINI, M. B. et al. Factors affecting mushroom *Pleurotus* spp. **Saudi Journal of Biological Sciences**, Amsterdam, 2016.

BETTIN, F. et al. Production of laccases in submerged process by *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 in relation to carbon and organic nitrogen sources antifoam and Tween 80. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. v.36, p.1-9, 2010.

BERNARDI, Eduardo et al. Utilização de diferentes substratos para a produção de inóculo de *Pleurotus ostreatus* Sing1 Use. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 38, n. 1, p.84-89, 2007.

BONONI, V. L. et al. **Cultivo de cogumelos comestíveis**. 2. ed. São Paulo: Icone, 209 p, 1999.

CARDOSO, J. C. P.; DEMENJOUR, P. L. M. M.; PAZ, M. F. Cultivo do cogumelo comestível *Pleurotus ostreatus* em bagaço de bociuva e de cana-de-açúcar pela técnica JUN-CAO. **Evidência**, Joaçaba, v. 13, n. 1, p. 31-40, jun. 2013.

DAHLBERG, K.R., LAPOLT, D.L.. Mushroom Casing *Spawn*. US Patent No. 5,503,647, 1996.

EICHLEROVÁ, Ivana et al. Long term storage of *Pleurotus ostreatus* and *Trametes versicolor* isolates using different cryopreservation techniques and its impact on laccase activity. **Fungal Biology**, [s.l.], v. 119, n. 12, p.1345-1353, dez. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.funbio.2015.10.004>.

EIRA, A. F.; BUENO, F. S. **Cultivo de cogumelo: shimeji e hiratake**. Viçosa, MG: CPT, 2005.

EIRA, A. F.; MINHONI, M. T. A. Manual teórico-prático do cultivo de cogumelos comestíveis. 2.ed. Botucatu: **Fundação de Estudos e Pesquisas Agrícolas e Florestais**, 115p, 1997.

FARNET, Anne-marie et al. Do spawn storage conditions influence the colonization capacity of a wheat-straw-based substrate by *Agaricus subrufescens*? **Comptes Rendus Biologies**, [s.l.], v. 337, n. 7-8, p.443-450, jul. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.crv.2014.06.002>.

GAVA, M. A. **Desempenho de diferentes meios de cultura utilizados na avaliação de fungos presentes em ambientes de produção de alimentos**. 2002. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

GOLVEIA, J. C. S. Indução de lacase de *Pycnoporus sanguineus* cct 4518 induzida por resíduos agroindustriais e ensaio de biorremediação de estrogênio sintético (EE2). 2016. p. 82. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, MG, 2016.

IEA. Instituto de Economia Agrícola. São Paulo: Banco de dados do IEA. 2014 Secretaria de agricultura e abastecimento Disponível em: http://ciagri.iea.sp.gov.br/nia1/subjetiva.aspx?cod_sis=1&idioma=1 Acessado em: 08/08/2016.

JESUS, J. P. F. Desenvolvimento de cinco linhagens de *Ágaricus bisporus* Lange (Imbach) ("Champignon de Paris") em diferentes formulações de composto e meios de cultura. 2011. p. 77. Dissertação de Mestrado em Agronomia, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Botucatu, SP, 2011.

KOHARI, E. K. et al. Potencial de crescimento micelial do fungo *Pleurotus* sabor-caju em serragem e casca de *Pinus* spp. e resíduo de infusão de erva-mate. In: WORKSHOP SUL-AMERICANO SOBRE USOS ALTERNATIVOS DE RESÍDUOS DE ORIGEM FLORESTAL E URBANA, p. 150-155, 1996.

LARGETEAU M.L., Llarena–Hernandez R.C., C. Regnault-Roger, J.M. Savoie. The medicinal *Ágaricus* mushroom cultivated in Brazil: biology, cultivation and non-medicinal valorization, **Appl. Microbiol. Biot.** 92, 897–907, 2011.

MAMIRO, D. P.; ROYSE, D. J. The influence of *spawn* type and strain on yield, size and mushroom solids content of *Ágaricus bisporus* produced on non-composted and spent mushroom compost. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 99, n. 8, p. 3205-3212, 2008.

MINHONI, M. T. A. et al. Cultivo de *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler – (Shiitake). 2. ed. Botucatu: FEPAF, 72 p, 2005.

MOREIRA M. T., MIELGO I., FEIJOO G., LEMA J. M. Evaluation of diferente fungal strains in the decolourisation of synthetic dyes. **Biotechnology letters**. 22 ,1499-1503, 2000.

NELDER, JOHN A; WEDDERBURN, ROBERT W (1972). Generalized linear models. **Journal of the Royal Statistical Society Series A**, 135 (3): 370–384. doi:10.2307/2344614.

WESTFALL, P. H., TOBIAS, R. D., ROM, D., WOLFINGER, R. D., AND HOCHBERG, Y. (1999), Multiple Comparisons and Multiple Tests Using the SAS System, Cary, NC: SAS Institute Inc.

OHGA, S.; ROYSE, D. J. Transcriptional regulation of laccase and cellulase genes during growth and fruiting of *Lentinula edodes* on supplemented sawdust. **FEMS Microbiology Letters**, Oxford, v. 201, n. 1, p. 111-115, 2001.

PATRICK, F. et al. Ligninolytic enzymes activities of *Pleurotus sapidus* P969 during vegetative growth and fruit development on sugarcane residues-based substrates. **The International Journal of Biotechnology**, , 3(4): 58-71, 2014.

PISCITELLI, A; GIARDINA, P; LETTERA, V; PEZZELLA, C; SANNIA, G; FARACO, V. Induction and transcriptional regulation of laccases in fungi. **Current Genomics**, 12:104–12, 2011

PURI, S. Agricultural wastes as substrate for *spawn* production. **International Journal of Science and Nature**, Jankipuram, v. 2, n. 4, p. 733-736, 2011.

ROSA, L. H. Produção de semente de cogumelos comestíveis e medicinais. Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2007. Disponível em: <[http://www.respostatecnica.org.br/dossie-tecnico/downloads DT/ODE=>](http://www.respostatecnica.org.br/dossie-tecnico/downloads_DT/ODE=>). Acesso em: 03/10/2017

ROSSI, I.H., MONTEIRO, A.C., MACHADO, J.O. Desenvolvimento micelial de *Lentinula edodes* como efeito da profundidade e suplementação do substrato. **Pesq. Agrop. Bras.** 36 (6), 887-891, 2001.

ROYSE, D. J. Influence of *spawn* rate and commercial delayed release nutrient levels on *Pleurotus cornucopiae* (oyster mushroom) yield, size, and time to production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Heidelberg, v. 58, n. 4, p. 527-531, 2002.

RUIZ-RODRÍGUEZ A., Polonia I., Soler-Rivas C., Wichers H. J. Ligninolytic enzymes activities of Oyster mushrooms cultivated on OMW (olive mill waste) supplemented media, *spawn* and substrates. **International Biodeterioration & Biodegradation** 65, 285-293, 2011.

SHIN K. S., OH I. K., KIM C. H. J. Production and purification of remazol brilliant blue decolorizing peroxidase from the culture filtrate of *pleurotus ostreatus*. **Applied and Environmental Microbiology**. 63, 1744-1748, 1997.

SHU-TING, C.; MILES, P. G. Mushrooms: cultivation, nutritional value, medicinal effect, and environmental impact. 2. ed. **Boca Raton: CRC Press**, 2004.

STAMETS, P. MycoMedicinals: An informational booklet on medicinal mushrooms. 2. ed. **Berkeley: Ten Speed Press**, p. 48, 2000.

TOURNAS, V. et al. Yeasts, molds and mycotoxins. In: ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Bacteriological analytical manual**. 8. ed. Gaithersburg: AOAC, 1998. cap. 18, p. 1-11.

TRINCI A.P.J. The hyphal growth unit of wild type and spreading colonial mutants of *Neurospora crassa*. **Archives of Microbiology** 91:127–136, 1973.

URBEN, A. F. **Produção de cogumelos por meio de tecnologia chinesa modificada**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2004.

ZHANG, R. Y. et al. Adopting stick *spawn* reduced the *spawn* running time and improved mushroom yield and biological efficiency of *Pleurotus eryngii*. **Scientia Horticulturae**, v. 175, p. 156–159, 2014.

WANG, F.; HU, J.H.; GUO, C.; LIU, C.Z. Enhanced laccase production by *Trametes versicolor* using corn steep liquor as both nitrogen source and inducer, **Bioresource Technology**, 2014.

WOLFENDEN, B.S.; WILLSON, R.L. Radical-cations as reference chromogens in the kinetic studies of one-electron transfer reactions: pulse radiolysis studies of 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline6-sulphonate). **J. Chem. Soc. Perkin Trans. II**. 02: 805-812, 1982.

YANG, W., GUO, F., WAN, Z. Yield and size of oyster mushroom grown on rice/wheat straw basal substrate supplemented with cotton seed hull. **Saudi J. Biol. Sci.** 20, 333–338, 2013.

CAPÍTULO 2 INTERFERÊNCIA NA EFICIÊNCIA BIOLÓGICA DO FUNGO *Pleurotus ostreatus* EM RELAÇÃO AO NÚMERO DE REPICAGEM DA MATRIZ PRIMÁRIA E AO TEMPO DE ARMAZENAMENTO DO SPAWN SOB REFRIGERAÇÃO.

STHEFANY RODRIGUES FERNANDES VIANA^{1*}, LETÍCIA OSÓRIO DA ROSA², JOSÉ RAIMUNDO DE SOUZA PASSOS³, MEIRE CRISTINA NOGUEIRA DE ANDRADE⁴

^{1*}Programa de Pós Graduação em Agronomia: Energia na Agricultura, Faculdade de Ciências Agronômicas, Univ. Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho" (UNESP), Brazil. ² Laboratório de enzimas e biomassa (LEB) – Instituto de Biotecnologia – Universidade de Caxias do Sul (UCS) ³ Departamento de Bioestatística, Univ. Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências ⁴Dra em agronomia, docente permanente do programa de pos graduação em agronomia (energia na agricultura), Faculdade de ciências agrárias, Univ. Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP), Botucatu, Brazil. *author for correspondence: sthefany.viana@yahoo.com.br

RESUMO: A alta produtividade dos cultivos de cogumelos comestíveis ainda é limitada por uma série de fatores, no qual um dos primeiros desafios é a produção da *Spawn*. O objetivo desse estudo foi avaliar a influência de repicagens sucessivas na matriz *in vitro* e o efeito do armazenamento do *spawn* sob a eficiência biológica do fungo *Pleurotus ostreatus*. Para isso foi instalado dois ensaios. No primeiro foi avaliada a interferência de 10 sucessivas repicagens da matriz fúngica *in vitro* em função da eficiência biológica do fungo *P. ostreatus* e suas respectivas atividades enzimáticas de lacase (LAC) e manganês peroxidase (MnP). No segundo, avaliou a influência do tempo de armazenamento do *spawn*, sob a eficiência biológica do *P. ostreatus* e suas respectivas atividades enzimáticas de LAC e MnP. A eficiência biológica das 10 repicagens teve diferencial estatístico, contudo, os resultados não tiveram relação com o número de repicagens, sendo que a primeira repicagem não obteve maior EB que as repicagens subsequentes. Os oito tratamentos correspondentes a diferentes tempos de armazenamento do *spawn*, apresentaram diferencial estatístico nos dados de eficiência biológica, contudo também não tiveram relação com o tempo. Ou seja, *spawn* armazenado com 95 dias obtiveram maior média de 34,48% de EB, e *spawn* com 34 dias de armazenamento média de 25,22% de EB. A atividade de lacase e manganês peroxidase não foram proporcionalmente relacionadas as suas respectivas EB, não sendo uma variável indicada para seleção prévia do *Spawn*.

Palavras-chave: repicagem, armazenamento, refrigeração, manutenção spawn.

CHAPTER 2 INTERFERENCE IN THE BIOLOGICAL EFFICIENCY OF THE FUNGUS *Pleurotus ostreatus* IN RELATION TO THE REPRINTING NUMBER OF THE PRIMARY MATRIX AND THE TIME OF STORING THE SPAWN UNDER REFRIGERATION.

STHEFANY RODRIGUES FERNANDES VIANA^{1*}, LETÍCIA OSÓRIO DA ROSA², JOSÉ RAIMUNDO DE SOUZA PASSOS³, MEIRE CRISTINA NOGUEIRA DE ANDRADE⁴

¹-Programa de Pós Graduação em Agronomia: Energia na Agricultura, Faculdade de Ciências Agronômicas, Univ. Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP), Brazil. ²- Laboratório de enzimas e biomassa (LEB) – Instituto de Biotecnologia – Universidade de Caxias do Sul (UCS) ³- Departamento de Bioestatística, Univ. Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências ⁴Dra em agronomia, docente permanente do programa de pos graduação em agronomia (energia na agricultura), Faculdade de ciências agrárias, Univ. Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP), Botucatu, Brazil. *author for correspondence: sthefany.viana@yahoo.com.br

The high productivity of edible mushroom crops is still limited by a number of factors, in which one of the first challenges is the production of Spawn. The objective of this study was to evaluate the influence of successive replications on the in vitro matrix and the effect of spawn storage under the biological efficiency of the *Pleurotus ostreatus* fungus. Two tests were installed. In the first, the interference of 10 successive replications of the fungal matrix in vitro was evaluated as a function of the biological efficiency of the fungus *P. ostreatus* and its respective enzymatic activities of laccase (LAC) and manganese peroxidase (MnP). In the second, it evaluated the influence of spawn storage time, under the biological efficiency of *P. ostreatus* and their respective enzymatic activities of LAC and MnP. The biological efficiency of the 10 repetitions had a statistical difference, however, the results were not related to the number of repetitions, and the first repetition did not obtain higher EB than the subsequent repetitions. The eight treatments corresponding to different storage times of the spawn presented a statistical difference in the biological efficiency data, however they also had no relation with the time. That is, spawn stored with 95 days obtained higher mean of 34.48% of EB, and spawn with 34 days of mean storage of 25.22% of EB. The activity of laccase and manganese peroxidase were not proportionally related to their respective EB, not being a variable indicated for the previous selection of *spawn*.

Key words: mother *spawn*, storage, refrigeration, maintenance *spawn*.

2.1 INTRODUÇÃO

A alta produtividade dos cultivos de cogumelos comestíveis ainda é limitada por uma série de fatores, no qual um dos primeiros desafios é a produção da *spawn* (ZHANG et al., 2014).

Os termos, matriz, micélio, *spawn* e semente são sinônimos do material utilizado para inocular e produzir diferentes tipos de cogumelos, representando a primeira técnica da produção. Para a maioria dos cogumelos cultiváveis a produção de *spawn* segue etapas semelhantes, iniciando com substratos preparados em condições laboratoriais e chamados tecnicamente de meios de cultura. O preparo do meio de cultura deve ser adequado ao desenvolvimento das hifas isoladas do fungo sadio selecionado com características desejadas, conhecido como matriz primária.

Após o desenvolvimento do fragmento *in vitro*, inicia-se o preparo do substrato em grão ou serragem para inoculação do *spawn* ou *matriz secundária*. Seguida de inoculação, é feita a incubação do *spawn*, armazenamento e controle de qualidade (JESUS, 2011).

Todas as etapas devem ser realizadas em laboratório com infraestrutura adequada e conhecimento específicos em microbiologia, para controle estrito das condições de assepsia, pois, contaminações por outros fungos, bactérias e insetos são muito frequentes. No qual, um *spawn* saudável possui micélio branco, sem manchas coloridas ou aspecto leitoso (contaminações), deve conter aspecto cottonoso e cheiro parecido com a do cogumelo fresco (LEVY, 2004).

Grande parte dos *spawns* comercializados são produzidas a partir de matrizes obtida por reprodução assexuada. Durante o processo de isolamento das matrizes primárias deve-se descartar as que o micélio cresce semelhante a algodão (“fluffy”), que poderá produzir um micélio estéril que reduz a produtividade. O micélio do tipo rizomórfico (semelhante a pequenas raízes) é o ideal para obtenção de produtividade adequada (EIRA, 2003).

Os cogumelos do gênero *Pleurotus* são classificados como fungos sapróbios e aeróbios, por isso nutrientes e oxigênio devem estar disponíveis para que ocorram as devidas reações metabólicas necessárias à sua sobrevivência. Para isolamento de fungos filamentosos é normalmente recomendado o ágar-batata-dextrose (BDA), encontrado facilmente no comércio, sob forma desidratada. Essa formulação de meio de cultura comumente utilizado para realização de matriz primária, pode conter

alterações nas quantidades dos ingredientes, variando densidade e concentração de nutricional desejados à cultura (TOURNAS et al., 1998).

O cultivo *in vitro* busca compreender as condições ótimas de crescimento do fungo, em relação ao meio de cultura, temperatura, pH e tempo de incubação sendo este um pré-requisito para o cultivo comercial (HERRERA, 2001). Recomenda-se que o meio de cultura deve ser o mais próximo do qual será cultivado, sugerindo realizar um extrato de composto (MINHONI et al., 2005). Porém, mesmo possuindo características semelhantes ao do cultivo, muitas vezes é difícil extrapolar os resultados de laboratório para condições à campo (JESUS, 2011).

O crescimento micelial pode ser mensurado de várias formas, como crescimento radial, vigor, velocidade de crescimento e massa micelial, no qual o meio de cultura sólido se faz pertinente já que o fungo se desenvolvem na natureza em substratos sólidos (ANDRADE et al., 2008). Com base na avaliação da velocidade da corrida micelial no meio de cultivo, é possível determinar qual substrato é mais adequado para o desenvolvimento dos fungos *in vitro*.

Sabendo da importância da produção de matrizes na produtividade do cultivo, ainda há pouco conhecimento sobre as interferências dessas na produção de cogumelos, resultando inconstância de alta produtividade.

Assim, objetivou-se avaliar a interferência de repicagens sucessivas na matriz primária *in vitro*, a interferência da atividade enzimática lignolítica do *spawn* e o efeito do armazenamento do *spawn* de *P. ostreatus* sobre a eficiência biológica.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

Dois experimentos de colheita foram conduzidos para determinar os efeitos do número de repicagens e tempo de armazenamento do *spawn* na porcentagem de eficiência biológica do fungo *Pleurotus ostreatus*. Os experimentos foram conduzidos nas estruturas da empresa Yuki Cogumelos, situada na cidade de Araçoiaba da Serra, SP- Brasil. A linhagem utilizada foi doada pelo produtor rural do fungo *P. ostreatus* e nomeada como PO12/YU.

2.2.1 Experimento I – Avaliação do número de repicagens em relação a eficiência biológica do fungo *Pleurotus ostreatus*

2.2.1.1 Produção da Matriz

Realizado conforme descrito nos itens 1.2.1.1. Após aproximadamente 6 dias, a cobertura micelial atingiu $\frac{3}{4}$ da superfície da placa a matriz fúngica e foi repicada conforme Minhoni (2005) suscetivelmente a cada 7 dias de corrida micelial em média, nas mesmas condições descritas acima. Completando em um prazo de 63 dias dez repicagens.

2.2.1.2 Formulação, inoculação e incubação do substrato do *Spawn*

Realizado conforme descrito nos itens 1.2.2.1.

2.2.1.3 Formulação, inoculação, incubação do substrato de cultivo

Realizado conforme descrito nos itens 1.2.2.2.

2.2.1.4 Processo de indução de primórdios e colheita

Realizado conforme descrito nos itens 1.2.2.3.

2.2.1.5 Determinação da eficiência biológica

Realizado conforme descrito nos itens 1.2.2.4.

2.2.1.6 Avaliação enzimática do micélio

2.2.1.6.1 Obtenção do caldo enzimático

Realizado conforme descrito nos itens 1.2.3.2.1.

2.2.1.6.2 Análise lacase

Realizado conforme descrito nos itens 1.2.3.2.2.

2.2.1.6.3 Análise manganês peroxidase

Realizado conforme descrito nos itens 1.2.3.2.3.

2.2.1.7 Delineamento experimental

O experimento I teve delineamento experimental inteiramente casualizado correspondente a dez *spawns* com 32 repetições, totalizando 320 potes de produção. Na análise estatística da variável eficiência biológica tendo como fatores repicagens foi ajustado modelo linear generalizado com a distribuição gama e função de ligação logarítmica (NELDER; WEDDERBURN, 1972).

A qualidade dos ajustes de todos os modelos lineares generalizados ajustados foi feita através da análise de desvios (deviance), gráficos dos resíduos de Pearson padronizados. Para comparações entre tratamentos foi utilizado foi o teste de Tukey-Kramer (Westfall, et al., 1999) do procedimento genmod do programa estatístico SAS – Free Statistical Statistical Software, SAS University Edition.

2.2.2 Experimento II – Avaliação da eficiência biológica do fungo *Pleurotus ostreatus* em função do tempo de armazenamento do *Spawn*

2.2.2.1 Produção da Matriz

Realizado conforme descrito nos itens 1.2.1.1. Após aproximadamente 6 dias, a cobertura micelial atingiu $\frac{3}{4}$ da superfície da placa a matriz fúngica e foi repicada conforme Minhoni (2005) suscetivelmente a cada 7 dias de corrida micelial em média, nas mesmas condições descritas acima. Completando em um prazo de 63 dias dez repicagens.

2.2.2.2 Formulação, inoculação e incubação do substrato do *Spawn*

Realizado conforme descrito nos itens 1.2.2.1.

O armazenamento dos *spawns* foram correspondentes à oito períodos: 34, 40, 55, 60, 74, 79, 95 e 100 dias, com 32 repetições de cada tratamento em potes de produção dos cogumelos sob refrigeração $4^{\circ}\text{C}\pm 1$.

2.2.2.3 Formulação, inoculação, incubação do substrato de cultivo

Realizado conforme descrito nos itens 1.2.2.2.

2.2.2.4 Processo de indução de primórdios e colheita

Realizado conforme descrito nos itens 1.2.2.3.

2.2.2.5 Determinação da eficiência biológica

Realizado conforme descrito nos itens 1.2.2.4.

2.2.3 Delineamento experimental

O delineamento experimental inteiramente casualizado correspondente aos 08 *spawns* com 32 repetições cada, totalizando 256 potes de produção. Na análise estatística da variável eficiência biológica tendo como fatores tempo de armazenamento foi ajustado o modelo linear generalizado com a distribuição gama e função de ligação logarítmica (NELDER; WEDDERBURN, 1972).

A qualidade dos ajustes de todos os modelos lineares generalizados ajustados foi feita através da análise de desvios (deviance), gráficos dos resíduos de Pearson padronizados. Para comparações entre tratamentos foi utilizado o teste de Tukey-Kramer (Westfall, et al., 1999) do procedimento genmod do programa estatístico SAS – Free Statistical Statistical Software, SAS University Edition.

2.2.4 Avaliação enzimática do micélio

2.2.4.1 Obtenção do caldo enzimático

Realizado conforme descrito nos itens 1.2.3.2.1.

2.2.4.2 Análise lacase

Realizado conforme descrito nos itens 1.2.3.2.2.

2.2.4.3 Análise manganês peroxidase

Realizado conforme descrito nos itens 1.2.3.2.3.

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para os 10 *spawns* correspondentes as 10 repicagens da matriz, os resultados de eficiência biológica após 16 dias de colheita apresentaram diferença significativa. Contudo não houve uma relação de melhoria da eficiência biológica em relação as repicagens mais recentes. Marino (2007), também observou que repicagens sucessivas nas matrizes *in vitro* de *Pleurotus sajor-caju* não afetaram a produtividade.

Em relação a atividade enzimática dos *spawns* também não houve relação com à eficiência biológica como demonstra a Tabela 1.

Tabela 1. Eficiência biológica e atividade enzimática no cultivo da linhagem PO12-YU de *Pleurotus ostreatus* cultivado em substrato a base de serragem esterilizada, em diferentes repicagens da matriz fúngica (32 repetições por tratamento).

Tratamento	Media EB ⁽¹⁾ (%)	epm ⁽²⁾	LAC ⁽³⁾ (U/g)	MnP ⁽⁴⁾ (U/g)
6º repicagem	39,84 A	0,39	1949,49	9,09
9º repicagem	38,86 AB	0,32	1418,56	15,65
10º repicagem	38,77 ABC	0,51	1974,55	128,58
4º repicagem	38,32 ABC	0,33	1591,12	20,30
2º repicagem	37,59 ABC	0,48	1412,17	12,69
7º repicagem	37,27 ABC	0,43	1214,44	6,34
3º repicagem	36,44 ABC	0,50	1863,13	71,48
1º repicagem	34,81 BC	0,32	1186,23	45,47
8º repicagem	34,52 BC	0,34	1585,53	43,57
5º repicagem	32,01 C	0,28	2961,74	105,74

⁽¹⁾ EB: Eficiência biológica. ⁽²⁾EPM: erro padrão médio; ⁽³⁾LAC: lacase; ⁽⁴⁾MnP: manganês peroxidase. Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si (Tukey-kramer, 5%).

O tempo de colheita teve maior média no tratamento 5^o repicagem com menor eficiência biológica, levando média de 16 dias (epm 0,12) para conclusão da colheita, ou seja, colheita retardatária em *Pleurotus* pode ser considerado um indicativo de *Spawn* de baixo vigor. Contudo também apresentou entre os tratamentos alta atividade enzimática de lacase, autores observam uma correlação positiva entre a atividade de lacase e o início da fase logarítmica, com seu maior pico (12200 U L-1) no início da fase estacionária, indicando talvez um momento metabólico distinto dos outros tratamentos (TLECUITL-BERISTAIN et al., 2008).

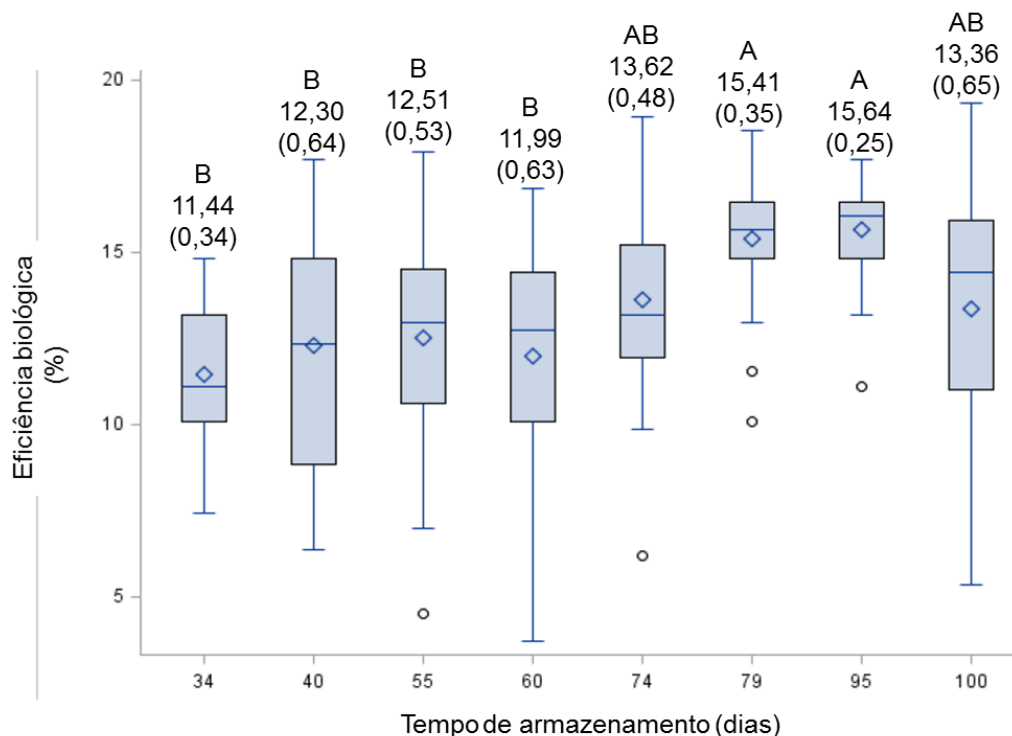
Ruiz-Rodriguez et al. (2010), relaciona a grande quantidade de enzimas ligninolíticas produzidas pelo fungo *Pleurotus* com sua capacidade de produzir bons corpos de frutificação. A flutuação da atividade enzimática sob o tempo é observada por muitos autores, contudo o pico dessas enzimas tem grande influência dependendo da cepa, substrato utilizado entre outros.

Salmones et al. (2005), descrevem que a atividade de lacase favorece o desenvolvimento vegetativo do fungo *Pleurotus*, responsável também pelo aumento da densidade (vigor) micelial e resistência à contaminações. Na pesquisa de ruiz-rodríguez et al. (2011), o pico de lacase na cepa k15 de *Pleurotus* apresentou maior atividade com 14 dias de incubação, já em outras cepas o maior pico variou de 21 – 28 dias de incubação.

Esses dados demonstram que possivelmente, o *Spawn* da 5^o repicagem estava num tempo metabólico diferente dos outros tratamentos, podendo desta maneira alterar os resultados de produção caso fossem repetidos.

Observando que o tempo metabólico dos *Spawns* podem interferir de maneira significativa nos resultados de produção, o experimento que avalia o tempo de armazenamento dos *Spawns* podem ter a mesma condição. Para os oito tratamentos correspondentes a diferentes tempos de armazenamento do *Spawn*, apresentaram diferencial estatístico, conforme demonstrado na Tabela 2.

Figura 1. Box-plot da eficiência biológica no cultivo da linhagem PO12-YU de *Pleurotus ostreatus* cultivado em substrato a base de serragem esterilizada, em diferentes tempos de armazenamento do *Spawn*.



Médias seguidas de letras iguais maiúsculas na coluna, não diferem entre si (Tukey-kramer, 5%). Erro padrão da média entre parênteses.

O *spawn* com 34 dias sendo a mais recente, teve menor média de EB% ou seja, não houve uma relação de melhoria da eficiência biológica em relação ao menor tempo de armazenamento do *Spawn*. Entretanto, é possível observar há uma tendência de melhoria da EB% conforme o tempo de armazenamento aumenta.

Muitas pesquisas são realizadas para avaliar o efeito do armazenamento de cepas por criopreservação de curto, médio e longo prazo, avaliando o efeito do congelamento e de diferentes formas de preservação, porém poucas pesquisas são encontradas para avaliar condições rotineiras dos produtores rurais, como por exemplo armazenagem do *Spawn* em geladeiras domésticas que variam de 2-10°C.

Farnet et al. (2014), avaliou a estocagem do *Spawn* de *Agaricus subrufescens* durante 15 e 30 dias em 10 e 15°C cada, e observou que não houve interferência significativa nos resultados de cultivo. A autora também menciona uma tendência de melhoria de colonização do fungo após o período de armazenamento, como demonstrado neste experimento. Explica que o armazenamento do *Spawn*

provavelmente teve um efeito sobre o micélio, aumentando assim sua atividade metabólica e portanto seu potencial de transformação do substrato.

Em relação a atividade enzimática dos *spawns* o tempo de armazenamento não houve uma relação com a eficiência biológica, sendo a maior média de LAC foi para o tratamento 74 dias 1682,97 U/g e MnP 38,70 U/g e a menor média de atividade enzimática para o tratamento de 55 dias com 431,03 U/g e MnP 12,27U/g. Farnet et al. (2014), também não apresentou efeito da atividade enzimática de lacase nos diferentes tratamentos de armazenamento.

2.4 CONCLUSÕES

- Não foi verificada relação entre o número de repicagens da matriz *in vitro* e tempo de armazenamento do *Spawn* na eficiência biológica do fungo *Pleurotus ostreatus*.

- A atividade de lacase e manganês peroxidase não foram proporcionalmente relacionadas as suas respectivas EB%, não sendo uma variável indicada para seleção prévia do *Spawn*.

REFERÊNCIAS

ANDRADE, Meire et al. 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.**, Maringá, v. 30, n. 3, p.333-337, 2008.

EIRA, A.F. Cultivo do cogumelo medicinal *Ágaricus blazei* (Murril) ss. Heinemann ou *Ágaricus brasiliensis* (Wasser et al.). Viçosa: Aprenda Fácil, 390p., 2003.

FARNET, Anne-marie et al. Do spawn storage conditions influence the colonization capacity of a wheat-straw-based substrate by *Agaricus subrufescens*? **Comptes Rendus Biologies**, [s.l.], v. 337, n. 7-8, p.443-450, jul. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.crv.2014.06.002>.

HERRERA, O. M. Produção, economicidade e parâmetros energéticos do cogumelo *Ágaricus blazei* um enfoque na Cadeia Produtiva. 2001. 183 f. Tese (Doutorado em Ciências Agronomicas) - Faculdade de Ciências Agronômicas. Universidade Estadual Paulista, Botucatu.2001.

JESUS, J. P. F. Desenvolvimento de cinco linhagens de *Ágaricus bisporus* Lange (Imbach) ("Champignon de Paris") em diferentes formulações de composto e meios de cultura. 2011. p. 77. Dissertação de Mestrado em Agronomia, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Botucatu, SP, 2011.

LEVY, C. E. Detecção e Identificação dos Fungos de Importância Médica. Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde, p. 381, 2004.

MINHONI, M. T. A. et al. **Cultivo de Lentinula edodes (Berk.) Pegler – (Shiitake)**. 2. ed. Botucatu: FEPAF, 72 p, 2005.

MARINO, R. H. et al. Crescimento e cultivo de diferentes isolados de *Pleurotus ostreatus* (JACQ:FR.) KUMMER em serragem da casca de coco. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v. 75, p. 29–36, 2008.

NELDER, JOHN A; Wedderburn, Robert W. Generalized linear models. **Journal of the Royal Statistical Society Series A**, 135 (3): 370–384, 1972. doi:10.2307/2344614.

WESTFALL, P. H., TOBIAS, R. D., ROM, D., WOLFINGER, R. D., AND HOCHBERG, Y., Multiple Comparisons and Multiple Tests Using the SAS System, Cary, NC: SAS Institute Inc. 1999

TLECUITL-BERISTAIN, S., SÁNCHEZ, C., LOERA, O., ROBSON, G. D., DÍAZ-GODÍNEZ, G. Laccases of *Pleurotus ostreatus* observed at different phases of its growth in submerged fermentation: production of a novel laccase isoform. **Mycological research**, v. 11 2, p. 1080 – 1084, 2008.

TOURNAS, V.; STACK, M.E.; MISLIVEC, P.B.; KOCH, H.A.; BANDLER, R. Yeasts, molds and mycotoxins. Food and drug administration: **bacteriological analytical manual**. Anais...Gaithersburg: 1998.

RUIZ-RODRIGUEZ, A., SOLER-RIVAS, C., POLONIA, I., WICHERS, H.J. Effect of olive mil waste (OMW) supplementation to Oyster mushrooms substrates on the cultivation parameters and fruiting bodies quality. **International Biodeterioration & Biodegradation** 64, 638-645, 2010.

RUIZ-RODRÍGUEZ A., Polonia I., Soler-Rivas C., Wichers H. J. Ligninolytic enzymes activities of Oyster mushrooms cultivated on OMW (olive mill waste) supplemented media, *spawn* and substrates. **International Biodeterioration & Biodegradation** 65, 285-293, 2011.

SALMONES, D.; MATA, G.; WALISZEWSKI, K.N. Comparative culturing of *Pleurotus* spp. on coffee pulp and wheat straw: biomass production and substrate biodegradation. **Bioresource Technology**, v.96, p.537-544, 2005.

WOLFENDEN, B.S.; WILLSON, R.L. Radical-cations as reference chromogens in the kinetic studies of one-electron transfer reactions: pulse radiolysis studies of

2,2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline6-sulphonate). **J. Chem. Soc. Perkin Trans. II.** 02: 805-812, 1982.

ZHANG, R. Y. et al. Adopting stick *spawn* reduced the *spawn* running time and improved mushroom yield and biological efficiency of *Pleurotus eryngii*. **Scientia Horticulturae**, v. 175, p. 156–159, 2014.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Para se obter um *Spawn* a partir de novos isolados, é sugerido realizar testes de sua eficiência biológica juntamente a capacidade de colonização no composto antes de sua comercialização. Desta forma, variáveis como velocidade do crescimento micelial em meio de cultura, lacase, manganês peroxidase nas condições de cultivo realizadas neste trabalho não foram suficientes para seleção prévia do *Spawn* correspondente a boa produtividade do fungo *P. ostreatus*.

REFERÊNCIAS

- BALDRIAN, P. Fungal laccases – occurrence and properties. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 30, n. 2, p. 215–242, mar. 2006.
- BELLETTINI, M. B. et al. Factors affecting mushroom *Pleurotus* spp. **Saudi Journal of Biological Sciences**, 2015.
- BETT, C. F.; PERONDI, M. A. Análise do mercado de cogumelos comestíveis e medicinais: uma prospecção de alternativa de renda para a agricultura familiar na região sudoeste do paraná market analysis of edible mushrooms and medical: an exploration of alternative income for the family. **Synergismus scyentifica UTF PR**, v. 06, n. 01, 2011
- BETTIN, F. et al. Production of laccases in submerged process by *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 in relation to carbon and organic nitrogen sources antifoam and Tween 80. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. v.36, p.1-9, 2010.
- COGORNI, P. F. B. O. et al. The production of *Pleurotus sajor-caju* in peach palm leaves (*Bactris gasipaes*) and evaluation of its use to enrich wheat flour. **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 34, n. 2, p. 267–274, 2014.
- DASHTBAN, M.; SCHRAFT, H.; QIN, W. Fungal Bioconversion of Lignocellulosic Residues ; Opportunities & Perspectives. **International Journal of Biological Sciences**. v.5, p. 578-595, 2009.
- DEKKER, R.F.H. et al. Influence of nutrients on enhancing laccase production by *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05. **International Microbiology**. v.10, p. 177-185, 2007.
- DIAS, E. Cultivo do cogumelo *Pleurotus Sajor-caju* em diferentes resíduos agrícolas. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 6. p. 1363-1369, 2003
- DONINI, L. P. et al. Efeito da suplementação com farelos no crescimento in vitro de *Pleurotus ostreatus* em meios à base de capim-elefante (*Pennisetum* spp.). **Arq. Inst. Biol., São Paulo**, v. 73, n. 3, p. 303–309, 2006.
- FONSECA-MALDONADO, R. et al. Synergistic action of co-expressed xylanase/laccase mixtures against milled sugar cane bagasse. **Process Biochemistry**. 2014.
- FORTES, R.; NOVAES, M. Efeitos da suplementação dietética com cogumelos *Ágaricales* e outros fungos medicinais na terapia contra o câncer. **Rev Bras Cancerol**, v. 52, n. 61, p. 363–371, 2006.
- HOWARD, R.L. et al. Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. **African Journal of Biotechnology**. v. 2, p. 602-619, 2003.

KNOP, D., YARDEN, O., HADAR, Y. The ligninolytic peroxidases in the genus *Pleurotus*: divergence in activities, expression, and potential applications. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v. 99, p. 1025–1038, 2015.

LINKE, D. et al. Laccases of *Pleurotus sapidus*: characterization and cloning. **Journal of Agricultural and Food Chemistry.** v. 53, p. 9498-9505, 2005.

LIU, L. et al. Fermentation optimization and characterization of the laccase from *Pleurotus ostreatus* strain 10969. **Enzyme Microbiology Technol.** v. 44, p. 426-433, 2009.

MACHADO, A.R.G. et al. Nutritional value and proteases of *Lentinus citrinus* produced by solid state fermentation of lignocellulosic waste from tropical region. **Saudi J. Biol. Sci.**, 2015.

MAJEAU, J.; BRAAR, S.K.; TYAGI, R.D. Laccases for removal of recalcitrant and emerging pollutants. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 2331-2350, 2010.

MARCO, J.C.I. Produção e caracterização de mananases de *Aspergillus foetidus* cultivado em casca do grão de soja. 2014. 72 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Microbiana), Universidade de Brasília, Brasília, 2014.

MOROZOVA, O. V. et al. “Blue” Laccases. **Biochemistry**, v. 72, p. 1136 – 1150, 2007.

NECOCHEA, R. et al. Phylogenetic and biochemical characterization of a recombinant laccase from *Trametes versicolor*. **Microbiology Letters**, v. 244, p. 235-241, 2005.

PARENTI, A. et al. Induction of laccase activity in the white rot fungus *Pleurotus ostreatus* using water polluted with wheat straw extracts. **Bioresource Technology**, v. 133, p. 142–149, 2013.

RIBEIRO, J. J. O. Caracterização de cogumelos de *pleurotus ostreatus* e *lentinula edodes* produzidos em resíduos agroindustriais. 2009. Tese (Doutorado em microbiologia agrícola), Univerisidade Fedreal de Viçosa, Minas Gerais, 2009.

RIVA, S. Laccases: blue enzymes for green chemistry. **Trends in Biotechnology**, v. 24, p. 219 – 226, 2006.

SAVOIE, J.M., SALMONES, D., MATA, G. Hydrogen peroxide concentration measured in cultivation substrates during growth and fruiting of the mushrooms. *Ágaricus bisporus* and *Pleurotus* spp. **J. Sci. Food Agric.** v. 87, p. 1337–1344, 2007.

SILVA, R.; HARAGUCHI, S. K.; MUNIZ, E. C.; RUBIRA, A. F. Aplicações de fibras lignocelulósicas na química de polímeros e em compósitos. **Química Nova**, v. 32, p. 661-671, 2009

TSUJIYAMA, S., UENO, H. Performance of wood-rotting fungi- based enzymes on enzymic saccharification of rice straw. **J. Sci. Food Agric.** v. 93, p. 2841–2848, 2013.

VELIOGLU, Z., UREK, R.O. Optimization of cultural conditions for biosurfactant production by *Pleurotus djamor* in solid state fermentation. **J. Biosci. Bioeng.** v. 120, p. 526–531, 2015.

ZHANG, R. Y. et al. Adopting stick *spawn* reduced the *spawn* running time and improved mushroom yield and biological efficiency of *Pleurotus eryngii*. **Scientia Horticulturae**, v. 175, p. 156–159, 2014.

APÊNDICE A – Fluxograma dos procedimentos experimentais para avaliação de Spawn do *Pleurotus ostreatus*.

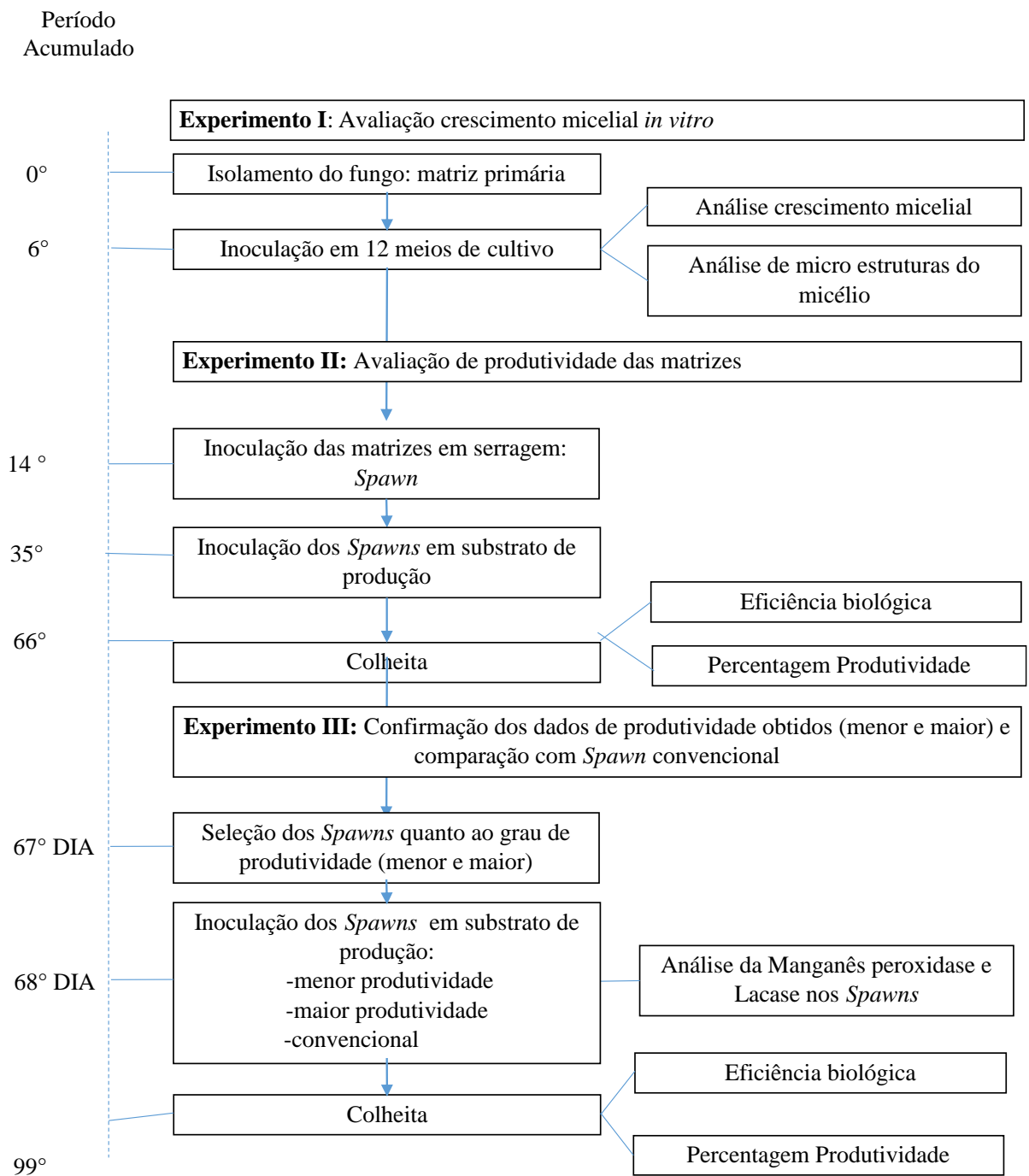


Figura 2. Fluxograma dos procedimentos experimentais para avaliação de Spawn de *Pleurotus ostreatus*.

APÊNDICE B - Fluxograma dos procedimentos de escolha para avaliação do 2º ciclo de produção do spawn de *Pleurotus ostreatus*.

