

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

**CINÉTICA DO CRESCIMENTO MICELIANO DE *Lentinula edodes*  
(Berk.) Pegler EM BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR  
E SERRAGEM DE EUCALIPTO**

**MAGALI REGINA**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP – Campus de Botucatu, para a obtenção do título de Mestre em Agronomia – Área de Concentração Energia na Agricultura.

BOTUCATU – SP  
Janeiro – 2001

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

**CINÉTICA DO CRESCIMENTO MICELIANO DE *Lentinula edodes*  
(Berk.) Pegler EM BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR  
E SERRAGEM DE EUCALIPTO**

**MAGALI REGINA**

Orientador: Prof. Dr. Augusto Ferreira da Eira

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP – Campus de Botucatu, para a obtenção do título de Mestre em Agronomia – Área de Concentração Energia na Agricultura.

BOTUCATU – SP  
Janeiro – 2001

*À minha família e  
Ao paciente companheiro, Lelo.*

## AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Ciências Agronômicas - FCA/UNESP - Universidade Estadual Paulista do Campus de Botucatu, pela oportunidade de realizar este Curso.

Ao Professor Dr. Augusto Ferreira da Eira, pela orientação e apoio.

Ao Professor do Departamento de Biotecnologia do Instituto de Pesquisas Estudos e Ambiente Científica da UNIPAR, Dr. Nelson Barros Colauto, pela amizade, inspiração e pelos conselhos sempre providenciais.

Ao Professor do Departamento de Bioestatística do Instituto de Biociências, Dr. José Raimundo de Souza Passos, pela amizade, paciência e cuidadoso amparo estatístico.

Ao Professor do Departamento de Produção Vegetal, Lin Chau Min e sua esposa Margareth, pela amizade, consideração e apoio.

Ao Professor do Departamento de Recursos Naturais, Ademércio Antônio Paccola, pelos conselhos, amizade e atenção.

Ao Prof. do Departamento de Recursos Naturais Dr. Alcides Lopes Leão pela amizade, consideração e carinhosos conselhos.

À Professora do Departamento de Produção Vegetal Marli Teixeira de A. Minhoni, pela amizade e o carinho.

Aos funcionários do Módulo de Cogumelos pelo auxílio na montagem dos experimentos

Aos amigos que me apoiaram em diversas fases deste trabalho e, das mais diferentes maneiras, nesses dois anos e meio de Botucatu: José, Regina, João, Adriano, Elvino, Nelsinho, Cláudia, Renato, Paulo, Frederico, Silvia, Mariana, Ilma, Andréia, Selene, Carmem, Rosana, Amauri, Rai, Daniela, Vera, e todos os outros companheiros de pizza e cantoria.

À minha família pelo apoio espiritual, moral e físico

À CAPES, pelo apoio financeiro.

<b>Sumário</b>	<b>Página</b>
Lista de Quadros	vii
Lista de Figuras	x
1. Resumo	1
2. Summary	3
3. Introdução	4
4. Revisão Bibliográfica	6
4.1. Crescimento miceliano e degradação de compostos	7
4.2. Farelos e Relação C:N	11
4.3. Substratos	14
5. Material e Métodos	16
5.1. Linhagens	16
5.2. Substratos	17
5.3. Cinética de crescimento miceliano em meio de cultura	18
5.3.1. Adaptação micelial	18
5.3.2. Determinação do crescimento miceliano em área	19
5.4. Cinética de crescimento miceliano em substrato	20
5.4.1. Adaptação do micélio	20
5.4.2. Determinação do crescimento miceliano em volume	21
5.4.2.1. Preparo dos substratos	22
5.4.2.2. Preparo dos tubos de ensaio	22
5.4.2.3. Preenchimento dos tubos de ensaio	22
5.4.2.4. Inoculação e coleta de dados	23
5.5. Metodologia Estatística	24
5.5.1. Cinética de crescimento miceliano em meio de cultura	24
5.5.2. Cinética de crescimento miceliano em substrato	25

6. Resultados e Discussão	27
6.1. Cinética de crescimento miceliano do <i>Lentinula edodes</i> em meios de cultura	27
6.1.1. Efeito da porcentagem de farelo	31
6.1.2. Efeito do substrato base	37
6.2. Cinética de crescimento miceliano do <i>Lentinula edodes</i> em substratos	43
6.2.1. Efeito da porcentagem farelo	49
6.2.2. Efeito do substrato base	58
7. Conclusões	69
8. Referência Bibliográfica	72
9. Apêndice	77

<b>Lista de Quadros</b>	<b>Página</b>
Quadro 1. Teor de umidade dos componentes dos substratos	20
Quadro 2 -Teor de umidade dos componentes dos substratos	22
Quadro 3 - Comparação entre os betas pelo teste de Student-Newman-Kills (SNK) e de Mann-Whitney, segundo linhagem e meio de cultura.	28
Quadro 4 - Comparação entre os gamas pelo teste de Student-Newman-Kills (SNK) e de Mann-Whitney, segundo linhagem e substrato	29
Quadro 5 - Comparação entre os betas pelo teste de Student-Newman-Kills (SNK) e de Mann-Whitney, para linhagem 17 em serragem e em bagaço de cana-de-açúcar, suplementados com vários níveis de farelos.	31
Quadro 6 - Comparação entre os gamas pelo teste de Student-Newman-Kills (SNK) e de Mann-Whitney, para linhagem 17 em serragem e em bagaço de cana-de-açúcar, suplementados com vários níveis de farelos.	31
Quadro 7 - Comparação entre os betas pelo teste de Student-Newman-Kills (SNK) e de Mann-Whitney, para linhagem 55, em serragem e em bagaço de cana-de-açúcar, suplementados com vários níveis de farelos.	34
Quadro 8 - Comparação entre os gamas pelo teste de Student-Newman-Kills (SNK) e de Mann-Whitney, para linhagem 55, em serragem e em bagaço de cana-de-açúcar, suplementados com vários níveis de farelos.	34
Quadro 9 - Comparação entre os betas pelo teste de Student-Newman-Kills (SNK) e de Mann-Whitney, segundo linhagem 17 e níveis de suplementação de farelos, em serragem e bagaço de cana-de-açúcar	37
Quadro 10 - Comparação entre os gamas pelo teste de Student-Newman-Kills (SNK) e de Mann-Whitney, segundo linhagem 17 e níveis de suplementação de farelos, em serragem e bagaço de cana-de-açúcar	38
Quadro 11 - Comparação entre os betas pelo teste de Student-Newman-Kills (SNK) e de Mann-Whitney, segundo linhagem 55 e níveis de suplementação de farelos, em serragem e bagaço de cana-de-açúcar.	40
Quadro 12 - Comparação entre os gamas pelo teste de Student-Newman-Kills (SNK) e de Mann-Whitney, segundo linhagem 55 e níveis de suplementação de farelos, em serragem e bagaço de cana-de-açúcar.	40

Quadro 13 - Comparação entre os betas pelo teste de Student-Newmam-Kills (SNK) e de Mann-Whitney, segundo linhagem e substrato.	44
Quadro 14 - Comparação entre os gamas pelo teste de Student-Newmam-Kills (SNK) e de Mann-Whitney, segundo linhagem e substrato.	44
Quadro 15 - Comparação entre os deltas pelo teste de Student-Newmam-Kills (SNK) e de Mann-Whitney, segundo linhagem e substrato	44
Quadro 16- Comparação entre os betas pelo teste de Student-Newmam-Kills (SNK) e de Mann-Whitney, para linhagem 17 em serragem e em bagaço de cana-de-açúcar, suplementados com vários níveis de farelos.	49
Quadro 17 - Comparação entre os gamas pelo teste de Student-Newmam-Kills (SNK) e de Mann-Whitney, para linhagem 17 em serragem e em bagaço de cana-de-açúcar, suplementados com vários níveis de farelos.	49
Quadro 18 - Comparação entre os deltas pelo teste de Student-Newmam-Kills (SNK) e de Mann-Whitney, para L17 em serragem e em bagaço de cana-de-açúcar, suplementados com vários níveis de farelos.	50
Quadro 19 - Comparação entre os betas pelo teste de Student-Newmam-Kills (SNK) e de Mann-Whitney, para linhagem 55 em serragem e em bagaço de cana-de-açúcar, suplementados com vários níveis de farelos.	50
Quadro 20 - Comparação entre os gamas pelo teste de Student-Newmam-Kills (SNK) e de Mann-Whitney, para L55 em serragem e em bagaço de cana-de-açúcar, suplementados com vários níveis de farelos.	50
Quadro 21 - Comparação entre os deltas pelo teste de Student-Newmam-Kills (SNK) e de Mann-Whitney, para L55 em serragem e em bagaço de cana-de-açúcar, suplementados com vários níveis de farelos.	51
Quadro 22 - Comparação entre os betas pelo teste de Student-Newmam-Kills (SNK) e de Mann-Whitney, segundo linhagem 17 e níveis de suplementação de farelos, em serragem e bagaço de cana-de-açúcar	59
Quadro 23 - Comparação entre os gamas pelo teste de Student-Newmam-Kills (SNK) e de Mann-Whitney, segundo linhagem 17 e níveis de suplementação de farelos, em serragem e bagaço de cana-de-açúcar	59
Quadro 24 - Comparação entre os deltas pelo teste de Student-Newmam-Kills (SNK) e de Mann-Whitney, segundo linhagem 17 e níveis de suplementação de farelos, em serragem e bagaço de cana-de-açúcar	60

Quadro 25 - Comparação entre os betas pelo teste de Student-Newman-Kills (SNK) e de Mann-Whitney, segundo linhagem 55 e níveis de suplementação de farelos, em serragem e bagaço de cana-de-açúcar.	60
Quadro 26 - Comparação entre os gamas pelo teste de Student-Newman-Kills (SNK) e de Mann-Whitney, segundo linhagem 55 e níveis de suplementação de farelos, em serragem e bagaço de cana-de-açúcar.	61
Quadro 27 - Comparação entre os deltas pelo teste de Student-Newman-Kills (SNK) e de Mann-Whitney, segundo linhagem 55 e níveis de suplementação de farelos, em serragem e bagaço de cana-de-açúcar.	61

<b>Lista de Figuras</b>	<b>Página</b>
Figura 1. Curvas das velocidades instantâneas de crescimento miceliano de L17 nos vários meios de cultura.	30
Figura 2. Curvas das velocidades instantâneas de crescimento miceliano de L55 em vários meios de cultura	30
Figura 3. Curvas de velocidade instantânea de crescimento miceliano de L17 em meios de cultura à base de serragem com várias quantidades de farelo.	33
Figura 4. Curvas de velocidades instantâneas de crescimento miceliano para L17, em meios de cultura à base de bagaço de cana-de-açúcar com várias quantidades de farelo.	33
Figura 5. Curvas de velocidade instantânea de crescimento de L55, em meios de cultura à base de serragem com várias quantidades de farelo.	36
Figura 6. Curvas de velocidade instantânea de crescimento miceliano para L55, em meios de cultura à base de bagaço de cana-de-açúcar, com várias quantidades de farelo.	36
Figura 7. Curvas de velocidade instantânea de crescimento miceliano de L17, em meios de cultura, conforme efeito do substrato base utilizado.	39
Figura 8. Curvas de velocidade instantâneas de crescimento de L55, em meio de cultura, conforme substrato base utilizado	42
Figura 9. Curvas de velocidade instantânea de crescimento miceliano de L17 em vários substratos	48
Figura 10. Curvas de velocidades instantâneas de crescimento miceliano de L55 em vários substratos	48
Figura 11. Efeito do farelo na velocidade de crescimento de L17, em serragem (14º dia)	52
Figura 12. Efeito do farelo, na velocidade de crescimento de L55, em serragem (14º dia)	52
Figura 13. Curvas de velocidades instantâneas de crescimento miceliano de L17 em substratos à base de serragem, com várias quantidades de farelo	53
Figura 14. Curvas de velocidades instantâneas de crescimento miceliano de L55 em substratos à base de serragem., com várias quantidades de farelo	53

Figura 15. Efeito do farelo na velocidade de crescimento de L17, em bagaço de cana-de-açúcar (14º dia)	55
Figura 16. Efeito do farelo na velocidade de crescimento de L55, em bagaço de cana-de-açúcar (14º dia)	55
Figura 17. Curvas de velocidade instantânea de crescimento miceliano de L17, em substratos a base de bagaço de cana-de-açúcar, com várias quantidades de farelo	56
Figura 18. Curvas de velocidade instantânea de crescimento miceliano de L55, em substratos a base de bagaço de cana-de-açúcar, com várias quantidades de farelo	56
Figura 19. Efeito do substrato base em 0% de farelo, na velocidade de crescimento de L17 e L55 (14º dia)	63
Figura 20. Efeito do substrato base em 10% de farelo, na velocidade de crescimento de L17 e L55 (14º dia).	63
Figura 21. Efeito do substrato base em 20% de farelo, na velocidade de crescimento de L17 e L55 (14º dia).	63
Figura 22. Curvas de velocidades instantâneas de crescimento miceliano de L17, nas diferentes quantidades de farelo, em serragem e bagaço de cana-de-açúcar.	64
Figura 23. Curvas de velocidades instantâneas de crescimento miceliano de L55, nas diferentes quantidades de farelo, em serragem e bagaço de cana-de-açúcar.	66

## 1. Resumo

As pesquisas sobre o cultivo axênico de shiitake e produção de inóculo, para as condições brasileiras, são escassas. O estudo do crescimento miceliano visa compreender os aspectos físicos, químicos e ambientais que causam alterações no processo desse crescimento. O objetivo deste trabalho foi o de estudar a influência de aspectos nutricionais e a interferência do substrato na cinética de crescimento de linhagens de *Lentinula edodes*.

Os materiais utilizados foram duas linhagens de *Lentinula edodes*: L17 e L55 da micoteca do Módulo de Cogumelos da FCA e substratos à base de serragem (S) e bagaço de cana-de-açúcar (B) com a adição de três quantidades de farelos de arroz e de trigo (metade de cada): 0, 10 e 20%, perfazendo 6 tratamentos, os quais foram utilizados na cinética da área de crescimento miceliano em meio de cultura e do volume de crescimento em substrato.

Dos resultados obtidos foram extraídas as seguintes conclusões: A cinética de crescimento miceliano em superfície (área), independente das linhagens e substratos, seguiu um modelo matemático representado por uma equação exponencial. Os parâmetros estimados gama tiveram uma relação com a velocidade final instantânea de crescimento em área. A cinética de crescimento miceliano em volume, independente das linhagens e substratos, seguiu um modelo matemático representado por equação logarítmica. Os parâmetros estimados betas, gama e delta, não apresentaram relação com a velocidade de

crescimento em volume. Ocorreram interações significativas entre linhagens, substratos base e quantidades de farelos, tanto na cinética de crescimento em superfície quanto em volume. A linhagem L55 se apresentou mais adaptada à metodologia adotada por ser utilizada em cultivo axênico.

KINETIC OF MYCELIUM GROWTH OF *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler IN SUGAR CANE BAGASSE AND EUCALIPTUS SAWDUST. Botucatu, 2001. 90p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Energia na Agricultura) - Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista.

Author: MAGALI REGINA

Adviser: Prof. Dr. AUGUSTO FERREIRA DA EIRA

## 2. Summary

In Brazil there was little research related to Shiitake axenic culture. It was researched in this experiment the physical, chemical and environmental aspects in relation to different strains of *Lentinula edodes*. The aim of this research was to understand the substratum effects in the kinetics of the Shiitake mycelium growth. It was used two Shiitake strains and two different base substrate (eucalyptus sawdust and sugar cane bagasse) varying in three proportions of the supplements. The supplements, a blend of rice and wheat brans, were added in the proportion of 0, 10 and 20% of the base substrate. The experiment was composed of six treatments. It was concluded that the mycelium kinetics growth in culture medium followed a mathematical model that were represented by exponential equation. Gamma parameters were directly proportional to the instantaneous growth velocity in area. The mycelium growth kinetics in volume had no effect relation to the strains and substrate and it followed a mathematical model represented by logarithmic equation. Beta, gamma and delta parameters didn't show any correlation with the growth velocity in volume. There were significant differences between the strains and the mycelium growth in the supplemented substrate. The strain L55 was better adapted than L17.

Key words: *Lentinula edodes*, brans, mycelium growth, bagasse, sawdust

### 3. Introdução

O *Lentinula edodes*, conhecido, popularmente como shiitake, é o segundo cogumelo cultivado mais importante no mundo (Chang 1996).

No Brasil, o seu consumo vem aumentando, assim como, o interesse pelo seu cultivo que além da forma tradicional, em toras, pode ser cultivado no sistema axênico. Porém o sucesso no seu cultivo consiste, acima de tudo, em compreender sua biologia e como o ambiente influencia seu crescimento e desenvolvimento (Przybylowicz & Donoghue, 1988)

Neste sentido, estudos comparativos de taxas de crescimento, freqüência de miceliação em espécies e linhagens com preferências variadas de ambiente, sob diferentes condições relevantes à condição natural, são cada vez mais necessários.

Os nutrientes viáveis para o seu crescimento, a temperatura adequada, o pH ideal, são fatores que, quando não conhecidos, podem alterar o comportamento de crescimento, desfavorecendo todo o processo e causando, certamente, alguns prejuízos.

Algumas respostas, aos problemas de crescimento enfrentados por produtores de inóculo, podem estar no mecanismo fisiológico do fungo que, sob condições adversas, retarda ou, até mesmo, estaciona seu crescimento miceliano (Przybylowicz & Donoghue, 1988)

A paralisação do crescimento pode ser ocasionado em substratos sólidos, também pelo envelhecimento do inóculo, que devido a ocorrência de autólise parcial e latência, pode acarretar lag fase no substrato final.

A diversidade de substratos ligno-celulósicos que podem ser utilizados na produção do shiitake, para o cultivo axênico, e, mais especificamente, o uso da serragem, que além do cultivo axênico, também é utilizada para a produção de inóculo, interfere, de modo distinto, no crescimento, tanto pelo aspecto químico e físico quanto pela forma como são acondicionados nos recipientes de produção, neste caso, normalmente em sacos plásticos de polipropileno ou polietileno expandido. O tamanho e localização do filtro de aeração, a distribuição do inóculo no substrato, também interfere diretamente na cinética de crescimento.

Este trabalho teve por objetivo estudar a cinética de crescimento de linhagens de *Lentinula edodes*, em condições de laboratório, em meio de cultura e substrato, verificando a influência da serragem e do bagaço de cana-de-açúcar, com várias porcentagens de farelos.

#### 4. Revisão Bibliográfica

O *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler, comumente conhecido na China como “Shiang-gu” e no Japão como “Shiitake” (Chang, 1996), cresce como saprófita em madeiras de árvores e forma corpos de frutificação a temperaturas entre 18 a 22°C, sob condições de umidade próximas a 90%, pode ser encontrado crescendo naturalmente, na China, Japão, Coréia, nas montanhas do Himalaia, norte de Bornéu, Filipinas e na parte norte da Tailândia (Campbell & Slee, 1987). O seu cultivo foi iniciado na China há cerca de 1100 AD e suas técnicas foram posteriormente introduzidas no Japão pelos agricultores chineses (Royse, 1985)

O reconhecido sabor do shiitake e seu alto valor nutricional, como fonte de proteína, vitaminas do complexo B e sais minerais (Cocharan, 1978), são acompanhados de substâncias com propriedades medicinais que atuam contra vírus, tumores e na redução do colesterol (Leathan, 1982). Estes atributos qualitativos promoveram um aumento do seu consumo nas últimas décadas, com expectativa de continuar em ascensão (Worral & Yang, 1992).

Com a necessidade de se atender à crescente demanda, novas técnicas de produção de inóculo, e de cultivo, vem sendo estudadas para propiciar a redução no tempo de colheita, melhor produtividade e diminuição nos custos, como o cultivo axênico que é uma alternativa que vem sendo utilizado por alguns produtores (Eira & Minhoni, 1996).

A produção comercial de inóculo de *L. edodes* segue um processo de multiplicação por transferência de inóculo que se inicia de uma linhagem pura e depois é multiplicado através de sucessivas etapas (Przybylowicz & Donoghue, 1988; Eira et al., 1997)

#### 4.1. Crescimento miceliano e degradação de compostos

Muitos dos conceitos e equações cinéticas referentes ao crescimento microbiano são derivados de estudos de microrganismos unicelulares, que tem um crescimento de população concentrado, o qual é mais facilmente mensurado. No entanto, o crescimento de fungos filamentosos é muito mais complexo em relação aos microrganismos unicelulares. (Prosser, 1994; Stanier et al, 1969)

O crescimento e desenvolvimento micelial pode ocorrer em meio líquido e superfícies sólidas (Klein, 1996). Em condições de laboratório, o meio sólido (ágar) é algumas vezes considerado mais natural, uma vez que os fungos, na natureza, utilizam como substratos, materiais sólidos como, por exemplo, madeira, restos de animais e vegetais, ou solo (Griffin, 1994).

Para qualquer crescimento micelial, em condições laboratoriais, pode-se definir vários parâmetros relacionados ao crescimento celular: taxa de alongamento, local de iniciação de formação de hifas secundárias, ângulos formados com a hifa axial original e frequência de iniciação de hifas secundárias, sendo a genética e o ambiente, os grandes responsáveis por estes processos (Trinci, 1974).

Além desses parâmetros, o crescimento miceliano pode ser avaliado através de medidas de área e volume. O diâmetro do crescimento miceliano, em meio sólido pode servir como uma medida de taxa de alongamento da hifa. No entanto, dados de diâmetros de colônia, têm sido mais utilizados na determinação de efeitos da temperatura no crescimento (Griffin, 1994).

Substâncias químicas particulares, comprimentos de onda de luz, propriedades físicas como estrutura granulométrica ou fluídica do meio, são exemplos do que pode ocasionar um tipo particular de crescimento micelial (Klein, 1996). Além disso, as diferenças podem ocorrer entre crescimento em duas dimensões e em três dimensões, na distribuição da zona de crescimento sobre a borda externa do micélio (Koch, 1975).

O crescimento acompanhado ao longo do tempo resulta em uma curva de crescimento do tipo sigmóide, que pode ser dividida em várias fases com diferentes propriedades fisiológicas. São estas: lag-fase - com pouco crescimento observado; fase exponencial - com crescimento auto catalítico; fase de declínio da taxa de crescimento - algumas vezes visto como fase estacionária, de curta duração e fase de morte - acompanhada de autólise, ou não. A fase exponencial é fortemente afetada por suplementos nutricionais, como fontes de nitrogênio e carbono (Griffin, 1994, Stanier et al 1969).

Segundo Donoghue & Denison (1995), o crescimento miceliano do *Lentinula edodes* é prejudicado em altas concentrações de CO<sub>2</sub>, alterando seu sistema enzimático e diminuindo a velocidade de miceliação. Os autores puderam comprovar que o fungo inoculado em substratos dentro de sacos plásticos, com maiores aberturas para troca gasosa, obtiveram um crescimento miceliano mais rápido.

O crescimento miceliano pode ser influenciado pela redução na concentração de nutrientes e oxigênio, acúmulo de produtos finais tóxicos, produção de metabólitos secundários e mudanças em fatores como o pH (Prosser, 1994).

A cinética de crescimento miceliano, em substratos sólidos, é pouco explorada, mas tem enorme importância nos estudos ecológicos, por exemplo, no crescimento

em solo, nos processos biotecnológicos com uso de "fermentação no estado sólido" e na degradação da madeira (Prosser, 1994).

Os fungos degradam compostos de vários materiais retirando carbono, nitrogênio, enxofre, necessários para o seu crescimento através da ação de enzimas secretadas durante o seu processo de desenvolvimento (Griffin, 1994)

Com relação à degradação da madeira e de material lignocelulósico, em geral, sabe-se que os mais eficientes degradadores naturais de lignina são os fungos causadores de podridão branca da madeira, que são na sua maioria basidiomicetos, este nome deriva da coloração que a madeira adquire em fases avançadas de degradação. Estes fungos degradam celulose, hemicelulose e lignina, sendo que a lignina é preferencialmente degradada em relação aos polissacarídeos e estes são os microrganismos mais conhecidos capazes de metabolizar, quase que completamente, a molécula de lignina a  $\text{CO}_2$  e água, porém quando comparado ao *Pleurotus* spp, o *Lentinula edodes* remove menos lignina e mais polissacarídeos (celulose e hemicelulose) (Moysen & Verachtert, 1991).

A degradação da lignina por fungos da podridão branca é um processo oxidativo, de ocorrência extracelular. Para que a sua degradação ocorra, é necessária a presença de uma fonte alternativa de carbono que é suprido, em condições naturais, por celulose, hemicelulose, carboidratos simples e glicerol (Boominathan & Reddy, 1992).

Quando o fungo é cultivado em substrato contendo apenas lignina como fonte de carbono, não há suporte para crescimento (Kirk et al., 1976). A celulose provê glicose para o fungo e, quando o fluxo de açúcar cessa, o fungo para de crescer e passa de uma fase de metabolismo primário para secundário. Deste modo, o fungo necessita de açúcares facilmente metabolizáveis, provenientes dos polissacarídeos do substrato (Jeffries et al, 1981)

Na verdade, o desenvolvimento da habilidade lignolítica tem sido mostrado através de várias pesquisas, que requer condições nutricionais e culturais, incluindo substrato metabolizável, altos níveis de oxigênio, limite de nitrogênio e várias outras condições de cultivo (Kirk & Farrell, 1987; Buswell, 1991)

Leatham & Kirk (1983) mencionam que, para a obtenção de rendimentos ótimos na degradação de material lignocelulósico, pobre em nitrogênio, a suplementação com este elemento é essencial, com espécies que não têm a atividade lignolítica regulada por nitrogênio, este poderia ser adicionado ao substrato sem que houvesse interferência na degradação de lignina, o que poderia resultar na rápida e eficiente utilização do substrato e no aumento da produtividade de cogumelos.

#### **4.2. Farelos e Relação C:N**

Os farelos de arroz e de trigo são tradicionalmente utilizados pelos produtores de shiitake suplementando com nitrogênio as serragens, tanto para a produção de “semente” como para a produção de basidiocarpos (Eira et al 1997).

O nitrogênio é um importante elemento para o crescimento de todos os organismos, necessário para a síntese de ácidos nucléicos, aminoácidos, proteínas e, no caso especial de fungos, para a síntese de quitina (componente da parede celular) (Griffin, 1994)

Teixeira (1996) enriquecendo serragem de *Eucaliptus grandis* (Hill ex Maiden) com farelo de arroz na concentração de 20% promoveu maior velocidade de miceliação e vigor de micélio quando comparada à utilização de levedo, glicose ou ainda ácido aspártico. Royse et al. (1985) sugerem que, dentre resíduos agrícolas, o farelo de arroz

acrescentado à serragem de madeira serve como fonte de nutrientes para um ótimo crescimento do *L. edodes*. Esses autores sugerem também que uma proporção de mistura de 10 a 40% desse suplemento estimularia o crescimento micelial. Por outro lado, Fasidi & Kadiri (1993), avaliando o crescimento micelial de *Lentinula submudus* sobre palha de *Andropogon tectorum* enriquecida com 10 a 50% de farelo de arroz, mostraram que a proporção de 30% desse suplemento promoveu maior desenvolvimento do fungo e, a proporção de 50%, estimulou maior densidade micelial. Esses autores atribuíram esse efeito estimulante do desenvolvimento micelial aos carboidratos, aminoácidos e minerais, presentes no farelo de arroz..

Quando a relação C:N do substrato é diminuída pela adição de farelos ou outros suplementos, pode haver inibição do crescimento do fungo. Singh & Verma (1996), estudando fontes de carbono e nitrogênio e interferência da relação entre esses elementos sobre o crescimento de linhagens de *Lentinula lateritia*, constataram que o desenvolvimento do fungo foi menor quando a razão (C:N) foi menor, ou seja, grande quantidade de N no substrato em relação ao teor de C pode ter um efeito inibitório sobre o crescimento desse fungo. Embora tenham encontrado, para as linhagens testadas, alto requerimento de carbono, os autores assinalaram que a relação C:N depende do gênero, espécie e linhagem do cogumelo. Segundo Kamra & Zadrazil (1988), o N em elevada concentração, reprime a degradação da lignina, retardando ou até inibindo completamente o desenvolvimento micelial. Maziero (1990) comentou que substratos ricos em nitrogênio não devem ser utilizados isoladamente para cultivos de cogumelos, devido ao fato de não proporcionarem uma total colonização do substrato e não permitirem a produção de corpos de frutificação. Com relação ao *L. edodes*, Song et al. (1987) constataram máximo crescimento micelial com relação C:N

de 30:1 e, à medida que aumentavam ou diminuíaam essa razão, obtinham menores valores de “biomassa” microbiana. Tokimoto & Kawai (1975), citou que a razão entre C e N afetou a velocidade de crescimento micelial, qualidade do cogumelo e integridade e longevidade dos blocos de substrato durante o ciclo da produção.

A eficiência do uso de carbono (massa de fungo produzido por quantia de carbono usado) claramente aumenta com a adição de fontes mais complexas de N (proteína de milho e farelo, extrato de levedura, extrato de malte e peptona). Em condições abaixo da quantidade mínima de N, os fungos metabolizam a celulose ou hemicelulose rapidamente, e isto é que possivelmente lhes dêem acesso a nutrientes minerais e fatores essenciais de crescimento presentes em baixa concentração na madeira, podendo então, rapidamente, metabolizar os açúcares resultantes para minimizar a competição de organismos não celulolíticos (Derikx et al, 1990).

A utilização de formas mais complexas de N ocasionou um crescimento maior em culturas de *Phanerochaete chrysosporium*. As formas menos complexas de N ( $\text{NH}_4\text{Cl}$  e glutamato) não estimularam o crescimento, isto correlacionando com a inibição relativamente grande da degradação de lignina. Adicionalmente, formas mais complexas de N promovem mais a degradação da lignina do que as formas menos complexas (Reid, 1983).

Em alguns casos as fontes de N mais simples aumentaram a concentração de proteínas das culturas, mas diminuíaam o crescimento miceliano e a degradação da lignina. Isto sugere que não existe relação entre alta concentração de proteína e crescimento (Boyle, 1998).

Embora esteja estabelecido que muitas fontes de N inibem a degradação de lignina pelos fungos da podridão branca (Buswell & Odier, 1987; Reid, 1989; Boyle & Cropp, 1992), porém *Pleurotus ostreatus* e *Lentinula edodes*, tem sido reportados como exceções (Freer & Detroy, 1982; Leatham & Kirk, 1983). O estudo de Boyle (1998), confirma isto, mas podem existir diferenças ente linhagens de um mesmo fungo.

Vários autores estudaram a influência de diversas fontes inorgânicas e orgânicas de nitrogênio sobre o crescimento de espécies de *Pleurotus* e *Agrocybe*, obtendo resultados bastante variáveis e sem conclusões quanto à necessidade de se suplementar o substrato com fonte externa de nitrogênio (Zadrazil & Brunnert, 1980).

De qualquer forma, diferenças metabólicas entre espécies e entre linhagens de uma mesma espécie podem causar grandes diferenças na habilidade de utilização de fontes de nitrogênio, dependendo da capacidade de se manter o pH do substrato. Quando o nitrogênio utilizado pelo fungo é proveniente de um sal, um rápido crescimento pode ser mantido somente se um outro íon mantém o pH ótimo de crescimento, ou é metabolizado aproximadamente à mesma taxa do íon que contém o átomo de nitrogênio. Se uma dessas condições não ocorre, o substrato pode se tornar demasiado alcalino ou ácido, dependendo do sal utilizado (Kurtzman & Zadrazil, 1982)

### 4.3. Substratos

A serragem é um componente largamente utilizado, na maioria das misturas, para a produção de sementes e cultivo axênico do shiitake (Eira et al 1997). A quantidade deste material pode variar de 60% a 90% da massa seca total da formulação do substrato. A serragem de eucalipto é mais comumente usada, embora a de outras espécies podem ser utilizadas (Han et al., 1981).

A utilização de outros substratos, além da serragem, como os substratos à base de resíduos agro-industriais, no cultivo axênico, é uma alternativa perfeitamente possível uma vez que o micélio do shiitake é apto a crescer em uma grande variedade de resíduos lignocelulósicos, oriundos na grande maioria do setor agro-industrial (Lacaz et al., 1970).

O tempo requerido para o shiitake degradar o substrato é relacionado com o tamanho das partículas. Partículas grandes são degradadas mais vagarosamente que as menores, por causa de sua pequena área específica (Przybylowicz & Donoghue, 1988).

A decomposição está relacionada à quantidade de celulose, hemicelulose e lignina. A quantidade dessas substâncias varia de acordo com o tipo de resíduo vegetal, por exemplo, em madeira (dependendo da madeira) varia entre 35-45% de celulose, 25-40% de hemicelulose e 20-35% de lignina. Já em palhas, a porcentagem de lignina é menor, variando de 10-20%, o teor de celulose entre 35-45% e o de hemicelulose, entre 25-30% (Boyle, 1998).

O *Lentinula edodes* tem sido cultivado com outros materiais, sozinhos ou misturados com serragem. Entre eles incluem palhas, sabugos de milho e outros resíduos agrícolas como o bagaço de cana-de-açúcar (Przybylowicz & Donoghue, 1988).

Com relação ao bagaço de cana-de-açúcar, suas principais características são: 100 a 150 kg.m<sup>-3</sup> de densidade e 48,21% de matéria seca. A matéria seca compõe-se de: 1,86% de proteína bruta, 45,09% de fibra bruta, 48,06% de extrato não nitrogenado, 2,26% de extrato etéreo e 2,73% de matéria mineral. Dentro da fração fibra bruta, predomina a celulose com 44,69%, a hemicelulose com 22,91% e a lignina com 14,89% (Burgi, 1985).

Rossi (1999) verificou que o bagaço de cana-de-açúcar necessita ser suplementado e que, quando feita com farelo de arroz, no cultivo axênico do shiitake, proporcionou melhor velocidade de crescimento micelial. Segundo Sturion (1994) o bagaço de cana-de-açúcar, quando acrescido de suplementos, é passível de ser utilizado para a produção de basidiomicetos comestíveis.

Segundo Rajarathnam & Bano (1987), a produtividade está relacionada com a qualidade da “semente”, pois quanto menor for o vigor do inóculo menor será a velocidade de colonização do substrato, quando em condições não assépticas, possibilitando um maior aparecimento de fungos contaminantes e conseqüentemente uma menor produtividade de cogumelos.

## **5. Material e Métodos**

O experimento foi conduzido no Módulo de Cogumelos Comestíveis do Departamento de Produção de Vegetal, localizado na Fazenda Experimental Lageado, Campus de Botucatu da Universidade Estadual Paulista - UNESP.

### **5.1. Linhagens**

Neste trabalho foram utilizadas as linhagens de *Lentinula edodes* BMA-LE 96/17 e BMA-LE 99/55, provenientes da micoteca do Módulo de Cogumelos FCA/UNESP, identificadas aqui como L17 e L55, respectivamente, sendo a primeira, geralmente, utilizada na produção de shiitake em toras e, a segunda, para cultivo axênico.

### **5.2. Substratos**

Os materiais utilizados como base para compor os substratos de cultivo foram a serragem de eucalipto e o bagaço de cana-de-açúcar. Nesses substratos estudou-se o efeito de 3 quantidades de farelos (0%, 10% e 20%) formando, dessa maneira, 6 tipos de substratos identificados da seguinte forma: S0%, S10%, S20% (serragem) e B0%, B10% e B20% (bagaço de cana-de-açúcar).

Nas várias fases do experimento, utilizou-se a mesma formulação de cada substrato que em base seca ficaram:

- S0%: 96% de serragem + 4% de  $\text{CaCO}_3$
- S10%: 86% de serragem + 5 % de farelo de trigo + 5% de farelo de arroz +4% de  $\text{CaCO}_3$
- S20%: 76% de serragem + 10 % de farelo de trigo + 10% de farelo de arroz +4% de  $\text{CaCO}_3$
- B0%: 96% de bagaço de cana-de-açúcar + 4% de  $\text{CaCO}_3$
- B10%: 86% de bagaço de cana-de-açúcar + 5 % de farelo de trigo + 5% de farelo de arroz +4% de  $\text{CaCO}_3$
- B20%: 76% de bagaço de cana-de-açúcar + 10 % de farelo de trigo + 10% de farelo de arroz +4% de  $\text{CaCO}_3$

### **5.3. Cinética de crescimento miceliano em meio de cultura**

Este experimento foi dividido em duas partes: adaptação micelial e determinação do crescimento miceliano em área.

#### **5.3.1. Adaptação micelial**

Antecedendo o experimento de determinação da área, fez-se a inoculação das linhagens nos diferentes meios de cultura para aumentar a adaptação do fungo aos nutrientes e diminuir a interferência de outros fatores na tomada dos dados.

Os meios de cultura foram preparados a partir dos extratos de cada substrato, obtidos por fervura, de 200g de substrato misturado a 1L de água destilada. Após 15 minutos de ebulição, a mistura foi coada e cada extrato recebeu  $10\text{g L}^{-1}$  de dextrose e  $15\text{g L}^{-1}$  de ágar, completando-se o volume a 1L, em frascos de vidro do tipo Duran e autoclavando-se a  $120^{\circ}\text{C}$  (1 atm), por 30 minutos.

A técnica utilizada para obtenção da matriz primária foi a da reprodução vegetativa. Para isto, foram colhidos, na área de produção do Módulo de Cogumelos da UNESP, basidiocarpos da linhagem L17 e L55 em tora e em substrato axênico, respectivamente.

Os meios de cultura contidos em frascos de vidros do tipo Duran foram vertidos para placas de Petri, em câmara de fluxo laminar e, após a completa solidificação do meio de cultura, ainda sob as mesmas condições, foi feita a inoculação dos fragmentos dos basidiocarpos. Cada placa de Petri, recebeu um fragmento de basidiocarpo, de 2 a 4 mm de comprimento, no centro da placa e, em seguida, foram identificadas, com a linhagem inoculada (L17 ou L55), o material base (serragem ou bagaço de cana-de-açúcar e o nível de

farelo (0, 10 ou 20%). As placas inoculadas foram postas em BOD, onde o micélio se desenvolveu a 25°C.

O micélio desenvolvido em placas serviu como inóculo da fase seguinte de determinação do crescimento miceliano em área. Assim que o micélio atingiu a distância de, aproximadamente, 5 mm do final da placa, fez-se a transferência, em câmara de fluxo laminar, para novas placas contendo o mesmo meio de cultura de origem. Utilizou-se um cortador circular com 1,3 cm de diâmetro para o corte do meio de cultura, com micélio, e, depois com o auxílio de uma alça estéril fez-se a transferência para a outra placa.

### **5.3.2. Determinação do crescimento miceliano em área.**

Os meios de cultura inoculados foram postos para incubar em BOD a 25°C. Antes, porém, cada placa foi marcada com 4 retas, interceptando-as ao centro e, dessa forma, dividindo a placa com 8 raios. Foram feitas medidas até a completa colonização das placas, a primeira medida foi 3 dias após a inoculação e as demais a 5, 6, 7, 8, 10, 11 e 13 dias. Foram feitas sempre próximas do horário em que foi realizada a inoculação, para o fechamento de ciclos de 24 horas.

As oito medidas foram utilizadas para calcular a área de crescimento do micélio no meio de cultura, em cada dia de medição. Após a análise estatística (item 5.5.1) dos parâmetros relacionados à área, calculou-se a velocidade instantânea de crescimento, permitindo, a partir disto, o estudo da cinética de crescimento miceliano em meio de cultura conforme o item 6.1.

O delineamento adotado foi inteiramente casualizado (DIC), em experimento fatorial 3x2x2 (3 níveis de farelo, 2 substratos base e 2 linhagens), com 4 repetições.

#### 5.4. Cinética de crescimento miceliano em substrato

O micélio crescido no meio de cultura, no experimento anterior, possibilitou a instalação deste, em substratos. Este experimento foi dividido em duas fases: adaptação do micélio e determinação do crescimento miceliano em volume. Para as duas fases, foram utilizadas as fórmulas dos substratos descritas no item 5.2.

##### 5.4.1. Adaptação do micélio

A preparação dos materiais, para a instalação da fase de adaptação micelial, foi feita a partir da verificação do teor de umidade (Quadro 1) de cada um deles, por secagem sob radiação infravermelha.

Quadro 1. Teor de umidade dos componentes dos substratos

	Bagaço de cana-de-açúcar	Serragem	Farelo de trigo	Farelo de arroz
Teor de umidade (%)	40	11	10	11

Descontando-se a porcentagem de umidade existente, cada material teve sua massa medida, conforme quantidade especificada na fórmula (5.2), em relação à matéria seca. Para maior homogeneidade, os materiais foram misturados ainda secos, com o auxílio de uma betoneira e, após alguns minutos, adicionou-se água para correção da umidade para 60%.

Cada substrato, após a correção da umidade, e devidamente homogeneizado, foi colocado em frascos de vidros transparentes e cilíndricos, com o auxílio de um funil de boca larga, na quantidade de 200g por frasco. Os substratos feitos à base de bagaço de cana-de-açúcar necessitaram de uma ligeira compressão para ficarem com densidade similar aos substratos à base de serragem. Os frascos de vidros foram fechados, com tampa tendo um respiro de algodão, para propiciar as trocas gasosas, e identificados. Após estas operações, os frascos foram autoclavados a 120°C (1 atm), por um período de 3 horas (Eira et al, 1997)

Após a esterilização, os substratos foram inoculados com o micélio, de mesmo tratamento, proveniente do experimento anterior (determinação de crescimento em área). Todo o processo de inoculação foi feito em câmara de fluxo laminar. Após a inoculação e identificação (linhagem, substrato e nível de farelo) os frascos foram acondicionados em sala com temperatura controlada a 25°C. Após a completa colonização, deu-se início à segunda etapa do experimento.

### 5.4.2. Determinação do crescimento miceliano em volume

Para a determinação do crescimento em volume seguiu-se as seguintes etapas: preparo dos substratos, preparo dos tubos de ensaio, preenchimento dos tubos de ensaio, inoculação e coleta de dados.

#### 5.4.2.1. Preparo dos substratos

Os substratos foram preparados conforme a fórmula do item 5.2 e, mesma metodologia à do item 5.4.1 para determinação do teor de umidade dos materiais (Quadro 2).

Quadro 2. Teor de umidade dos componentes dos substratos

	Bagaço de cana-de-açúcar	Serragem	Farelo de trigo	Farelo de arroz
Teor de umidade (%)	46	12,5	10	11

Cada substrato foi preparado, separadamente, de acordo com a seguinte ordem: medição dos materiais (massa seca), homogeneização, adição de água (para correção da umidade à 60%, preenchimento dos tubos de ensaio, fechamento e identificação.

#### 5.4.2.2. Preparo dos tubos de ensaio

Utilizaram-se tubos de ensaio de 23mm de diâmetro por 200mm de comprimento e, antes que recebessem os substratos, para evitar uma alta concentração de CO<sub>2</sub> no final do substrato, foi colocada, no fundo do tubo de ensaio, uma tampa de plástico de 20mm de diâmetro por 25mm de comprimento, com o fundo voltado para cima, e uma

circunferência de papelão perfurada, colocada acima da tampa, criando, dessa forma, uma região com ar.

#### **5.4.2.3. Preenchimento dos tubos de ensaio**

Foram colocados 20g de substrato por tubo de ensaio e, os substratos à base de bagaço de cana-de-açúcar, para que ficassem com a densidade similar aos de serragem, foram submetidos a uma ligeira compressão até atingirem a altura dos substratos à base de serragem, que foi de 7,7 cm.

Cada tubo de ensaio foi fechado com um chumaço de algodão e este, coberto com um papel. Depois de identificados, foram autoclavados à temperatura de 120°C (1 atm) por 1 hora.

#### **5.4.2.4. Inoculação e coleta de dados**

Os substratos, em tubos de ensaio, foram inoculados com o micélio crescido nos frascos de mesmo tratamento. O processo de inoculação foi realizado em câmara de fluxo laminar. Retirou-se, com uma pinça, uma quantidade de inóculo suficiente para cobrir a superfície do substrato contido nos tubos de ensaio, e, em todos os tubos, foi feita uma ligeira pressão para aproximar, adequadamente, o inóculo ao substrato. Após a inoculação, os tubos de ensaio foram identificados (linhagem, substrato e nível de farelo) e, em seguida, foram marcados com 8 retas do início ao fim do substrato, no sentido longitudinal do tubo de ensaio, para a coleta de dados. Ao término destes procedimentos, os tubos de ensaio foram incubados em BOD a 25°C.

As medidas foram feitas até a completa colonização do substrato. A primeira medida foi 3 dias após a inoculação e, as demais, a 5, 6, 7, 8, 10, 11, 13, 14, 16, 18, 19 e 21 dias após, sendo feitas sempre próximas do horário em que foi realizada a inoculação (ciclos de 24 horas).

As oito medidas foram usadas para calcular o volume de crescimento do micélio no substrato no decorrer da incubação, em cada dia de medição. Após a análise estatística dos parâmetros relacionados ao volume, calculou-se a velocidade instantânea de crescimento e o estudo da cinética de crescimento miceliano em substrato conforme item 6.2.

O delineamento estatístico adotado foi inteiramente casualizado, com 6 repetições, num esquema fatorial de 3x2x2.

## **5.5. Metodologia Estatística**

A metodologia estatística utilizada para avaliar a velocidade de crescimento miceliano seguiu modelos de regressão não linear, sendo detalhados a seguir.

### **5.5.1. Cinética de crescimento miceliano em meio de cultura**

Para o estudo do crescimento em área de miceliação, segundo os tratamentos já definidos, foi utilizado o modelo de regressão não linear, ajustado para cada uma das repetições, dos tratamentos:

$$Y_{ij} = \alpha + \beta\gamma^x + e_{ij} \quad (1)$$

sendo os índices:

$j = 1, 2, 3, \dots, 12$  (tratamentos);

$i = 1, 2, 3, 4$  (repetições);

$Y_{ij}$  = área de crescimento na repetição  $i$  e tratamento  $j$ ;

$x$  = dias

$e_{ij}$  = componente aleatório ou ruído na amostra  $i$  e no tratamento  $j$ .

$\alpha$  = parâmetro de locação

$\beta$  e  $\gamma$  são parâmetros de forma do modelo, relacionados à velocidade instantânea em um determinado dia. Pode-se avaliar os efeitos dos parâmetros do componente determinístico  $f(x) = \alpha + \beta(\gamma)^x$ , na velocidade instantânea, analisando-se a expressão da primeira derivada em relação à  $x$  (tempo)  $f'(x) = df/dx$

$$f'(x) = \beta\gamma^x \ln(\gamma) \quad (2)$$

Esta expressão define, portanto, a velocidade instantânea de crescimento ( $\text{cm}^2 \text{dia}^{-1}$ ) para cada repetição em cada tratamento. Verifica-se que a velocidade instantânea de crescimento é função dos parâmetros beta e gama.

Para a comparação dos parâmetros do modelo de regressão não linear (alfa, beta e gama) foi feita análise de variância não paramétrica com aplicação do teste de Kruskal-Wallis. Nos casos em que houve diferença significativa por esse teste, foram aplicados os seguintes testes: para cada linhagem, Student-Newman-Kills (SNK) ao nível de 5% significância e, para cada meio de cultura, Mann-Whitney ao nível de 5% de significância.

### 5.5.2. Cinética de crescimento miceliano em substrato

Para o estudo do crescimento em área de miceliação, segundo os tratamentos já definidos, foi utilizado o modelo de regressão não linear, ajustado para cada uma das repetições, dos tratamentos:

$$y_{ij} = \alpha + \beta \ln\left(\frac{x + \gamma}{-\gamma + \delta + x}\right) + e_{ij} \quad (3)$$

$\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$  são parâmetros de forma do modelo, relacionados à velocidade instantânea em um determinado dia. Pode-se avaliar os efeitos dos parâmetros do componente determinístico  $f(x) = \alpha + \beta \ln\left(\frac{x + \gamma}{-\gamma + \delta + x}\right)$ , na velocidade instantânea, analisando-se a expressão da primeira derivada em relação à  $x$  (tempo)  $f'(x) = df/dx$ .

$$f'(x) = -\frac{(2\gamma + \delta)\beta}{(x + \gamma)(-\gamma - \delta + x)} \quad (4)$$

Esta expressão define, portanto, a velocidade instantânea de crescimento ( $\text{cm}^3/\text{dia}$ ) para cada repetição em cada tratamento. Verifica-se que a velocidade instantânea de crescimento é função beta, gama e delta.

Para comparação dos parâmetros do modelo de regressão não linear (beta, gama e delta), referentes a cada um dos tratamentos, foi feita Análise de Variância não paramétrica com aplicação do teste de Kruskal-Wallis. Nos casos em que houve diferença significativa por esse teste, foram aplicados os seguintes testes: para cada linhagem, Student-Newman-Kills (SNK) ao nível de 5% de significância e, para cada substrato, Mann-Whitney ao nível de 5% de significância.

## 6. Resultados e Discussão

Os resultados obtidos em função da metodologia adotada serão apresentados em quadros e figuras de acordo com os itens a seguir.

### 6.1. Cinética de crescimento miceliano do *Lentinula edodes* em meios de cultura.

Para o estudo da cinética de crescimento miceliano em meio de cultura foram feitas as comparações dos parâmetros estatísticos e posteriormente a construção das curvas de velocidade.

O componente determinístico usado para obtenção da área de crescimento do *Lentinula edodes* nos tratamentos, é função beta e gama, como se pôde observar pela equação (1) citada em 5.5.1. lembrando que quando betas e gamas estimados, tem resultados diferentes (por exemplo: betas significativos e gamas não significativos), nas comparações entre os mesmos tratamentos, é assegurada a diferença estatística entre eles (Passos, 1999)<sup>1</sup>.

Analisando-se os betas e gamas medianos (Quadros 3 e 4), foi observado que o maior valor de gama gerou velocidade instantânea final maior (Figuras 1 e 2), e os betas, aparentemente, tiveram relação com a velocidade inicial, embora isto não tenha sido confirmado em todos os casos.

Os maiores valores de gama estimado, para cada linhagem, foram encontrados em serragem com farelos, como confirmam as Figuras 1 e 2, mostrando ser este o melhor substrato para crescimento em superfície.

---

<sup>1</sup> Informação pessoal: PASSOS, J.R.S.. Professor de Estatística Experimental do Instituto de Bioestatística/FMVZ /UNESP.

Quadro 3 - Comparação entre os betas pelo teste de Student-Newman-Kills (SNK) e de Mann-Whitney, segundo linhagem e meio de cultura.

Linhagem	Substratos					
	Serragem			Bagaço de cana-de-açúcar		
	S0%	S10%	S20%	B0%	B10%	B20%
L17	3,74 <sup>Aa*</sup>	5,07 <sup>Aa</sup>	3,58 <sup>Aa</sup>	18,16 <sup>Ba</sup>	5,26 <sup>Aa</sup>	5,29 <sup>Aa</sup>
L55	13,56 <sup>Ca</sup>	3,83 <sup>Aa</sup>	9,65 <sup>Ba</sup>	4,80 <sup>Db</sup>	20,75 <sup>ABb</sup>	38,04 <sup>Eb</sup>

\* Letras maiúsculas: Para cada linhagem, substratos representados pela mediana, seguidos de mesma letra, não diferem significativamente ao nível de 5% de significância pelo teste de Student-Newman-Kills. Letras minúsculas: Para cada substrato, linhagens representadas pela mediana seguidas de mesma letra, não diferem estatisticamente ao nível de 5% de significância pelo teste de Mann-Whitney. Medianas referentes a 4 repetições.

Quadro 4 - Comparação entre os gamas pelo teste de Student-Newman-Kills (SNK) e de Mann-Whitney, segundo linhagem e substrato.

Linhagem	Substratos					
	Serragem			Bagaço de cana-de-açúcar		
	S0%	S10%	S20%	B0%	B10%	B20%
L17	1,20 <sup>Aa*</sup>	1,24 <sup>Aa</sup>	1,29 <sup>Ba</sup>	1,09 <sup>Ca</sup>	1,23 <sup>Aa</sup>	1,25 <sup>Aa</sup>
L55	1,12 <sup>Ba</sup>	1,28 <sup>Aa</sup>	1,19 <sup>Aa</sup>	1,24 <sup>Ab</sup>	1,13 <sup>Bb</sup>	1,09 <sup>Bb</sup>

\* Letras maiúsculas: Para cada linhagem, substratos representados pela mediana, seguidos de mesma letra, não diferem significativamente ao nível de 5% de significância pelo teste de Student-Newman-Kills. Letras minúsculas: Para cada substrato, linhagens representadas pela mediana seguidas de mesma letra, não diferem estatisticamente ao nível de 5% de significância pelo teste de Mann-Whitney. Medianas referentes a 4 repetições

Observando as curvas dos vários tratamentos, para as duas linhagens, pode-se enfatizar alguns resultados: verificou-se que L17, ao longo do tempo, obteve velocidades instantâneas em S20%, significativamente maiores do que nos demais meios (Figura 1 e Quadro 28, em anexo) e, em L55, vários meios de cultura foram colonizados completamente ao 10º dia, porém o meio S10% teve uma velocidade significativamente superior aos demais tratamentos (Figura 2 e Quadro 29, anexo).

Estes resultados serão discutidos nos itens seguintes, onde será explorada a influência da adição farelos e dos substratos utilizados como base, na velocidade de crescimento miceliano em área.

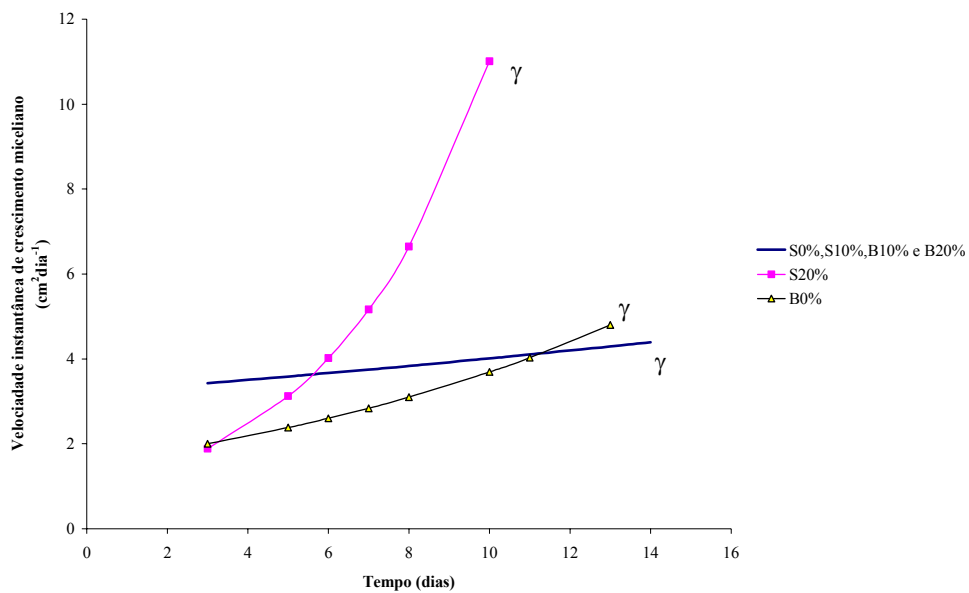
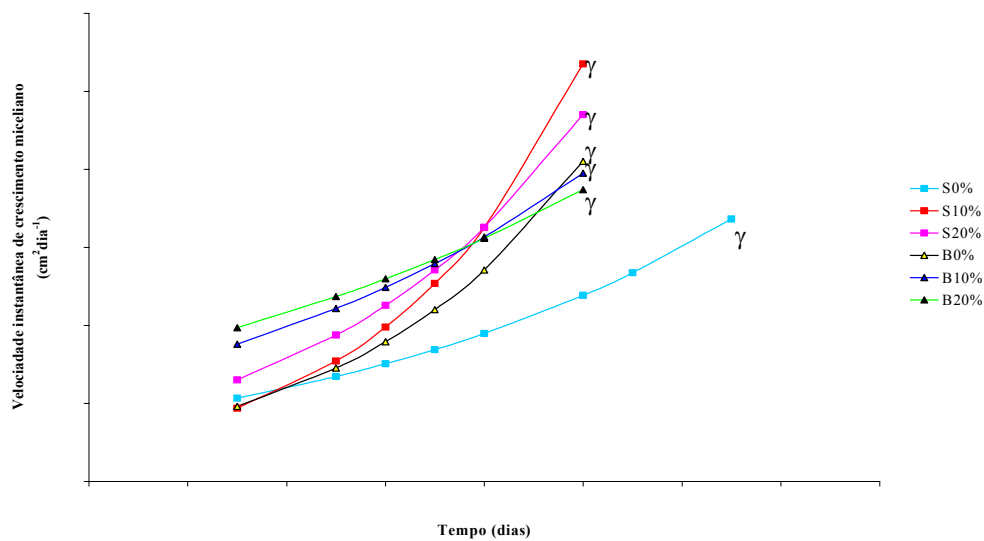


Figura 1. Curvas das velocidades instantâneas de crescimento miceliano de L17 nos vários meios de cultura.

Figura 2. Curvas das velocidades instantâneas de crescimento miceliano de L55 em vários meios de cultura.



### 6.1.1. Efeito da porcentagem de farelo

Analisando-se os parâmetros beta e gama de L17 (Quadro 5 e 6, respectivamente) verificou-se que os maiores valores de beta, tanto em serragem quanto em bagaço de cana de açúcar, resultaram em velocidades instantâneas iniciais maiores e os maiores valores de gama, assim como mencionado no item 6.1, resultaram em velocidades instantâneas finais maiores (Figura 3 e 4)

Quadro 5 - Comparação entre os betas pelo teste de Student-Newman-Kills (SNK), para L17 em serragem e em bagaço de cana-de-açúcar, suplementados com várias porcentagens de farelos.

		Serragem		
		S0%	S10%	S20%
L17		3,74 <sup>A*</sup>	5,07 <sup>A</sup>	3,58 <sup>A</sup>
	Bagaço de cana-de-açúcar			
		B0%	B10%	B20%
		18,16 <sup>A</sup>	5,26 <sup>B</sup>	5,29 <sup>B</sup>

\*Por linha: medianas seguidas de mesma letra, não diferem significativamente ao nível de 5% de significância pelo teste de Student-Newman-Kills. Medianas referentes a 4 repetições.

Quadro 6 - Comparação entre os gamas pelo teste de Student-Newman-Kills (SNK), para L17 em serragem e em bagaço de cana-de-açúcar, suplementados com vários níveis de farelos.

		Serragem		
		S0%	S10%	S20%
L17		1,20 <sup>A*</sup>	1,24 <sup>B</sup>	1,29 <sup>C</sup>
	Bagaço de cana-de-açúcar			
		B0%	B10%	B20%
		1,09 <sup>A</sup>	1,23 <sup>B</sup>	1,25 <sup>B</sup>

\* Por linha: medianas seguidas de mesma letra, não diferem significativamente ao nível de 5% de significância pelo teste de Student-Newman-Kills. Medianas referentes a 4 repetições.

A resposta à adição de farelos na velocidade instantânea de crescimento para L17, em serragem (Figura 3 e Quadro 30, anexo), mostra que a velocidade de crescimento de área teve um aumento proporcional à adição de farelos.

Em bagaço de cana-de-açúcar (Figura 4 e Quadro 31, em anexo), a velocidade de crescimento de área foi dependente da adição de farelos, porém entre as quantidades de 10 e 20% não houve diferença significativa.

A suplementação em meio de cultura, para esta linhagem, foi fundamental no aumento da velocidade instantânea de crescimento de área, com relação a isso, Reid (1983) verificou que a utilização de formas mais complexas de N (proteína de milho e farelo, extrato de levedura, extrato de malte e peptona) ocasionou um crescimento maior em culturas de *Phanerochaete chrysosporium*.

Straatsma et al (1991), verificou que os meios nutricionalmente mais ricos promoveram a formação de um micélio mais vigoroso do que os meios pobres.

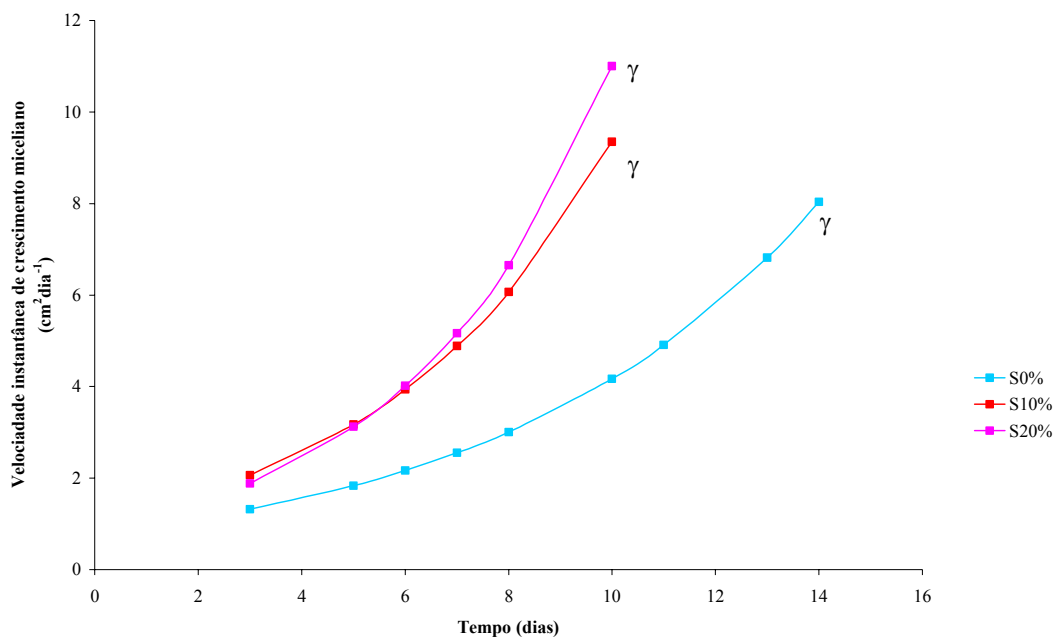


Figura 3. Curvas de velocidade instantânea de crescimento miceliano de L17 em meios de cultura à base de serragem com várias quantidades de farelo.

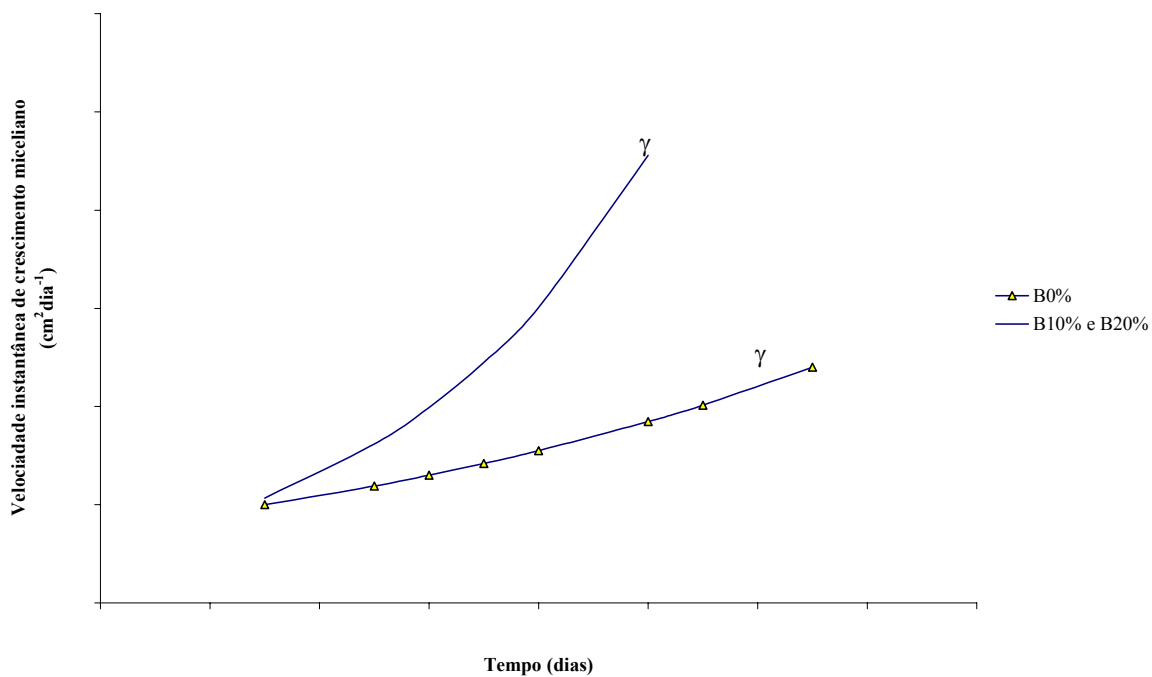


Figura 4. Curvas de velocidades instantâneas de crescimento miceliano para L17, em meios de cultura à base de bagaço de cana-de-açúcar com várias quantidades de farelo.

Para L55, as comparações entre betas e gamas (Quadro 7 e 8 respectivamente) revelaram que os maiores valores de beta tiveram relação com a velocidade instantânea inicial apenas em bagaço de cana-de-açúcar (Figura 6), não ocorrendo o mesmo em serragem. Os maiores valores de gama resultaram em velocidade final maior, tanto para serragem quanto para bagaço (Figura 5 e 6 respectivamente).

Quadro 7 - Comparação entre os betas pelo teste de Student-Newman-Kills (SNK), para L55 em serragem e em bagaço de cana-de-açúcar, suplementados com vários níveis de farelos.

		Serragem			
		S0%	S10%	S20%	
L55		13,56 <sup>A*</sup>	3,83 <sup>B</sup>	9,65 <sup>A</sup>	
	Bagaço de cana-de-açúcar				
			B0%	B10%	B20%
			4,80 <sup>A</sup>	20,75 <sup>B</sup>	38,04 <sup>B</sup>

\* Por linha: medianas seguidas de mesma letra, não diferem significativamente ao nível de 5% de significância pelo teste de Student-Newman-Kills. Medianas referentes a 4 repetições.

Quadro 8 - Comparação entre os gamas pelo teste de Student-Newman-Kills (SNK), para L55 em serragem e em bagaço de cana-de-açúcar, suplementados com vários níveis de farelos.

		Serragem			
		S0%	S10%	S20%	
L55		1,12 <sup>A*</sup>	1,28 <sup>B</sup>	1,19 <sup>B</sup>	
	Bagaço de cana-de-açúcar				
			B0%	B10%	B20%
			1,24 <sup>A</sup>	1,13 <sup>B</sup>	1,09 <sup>B</sup>

\* Por linha: medianas seguidas de mesma letra, não diferem significativamente ao nível de 5% de significância pelo teste de Student-Newman-Kills. Medianas referentes a 4 repetições.

Para L55, em serragem (Figura 5), a elevação nas porcentagens de farelo não promoveu o aumento da velocidade de área de miceliação (Quadro 32, em anexo), mas esta foi dependente da adição de farelos, uma vez que sem suplementação o micélio demorou a finalizar a colonização. A maior velocidade de área de miceliação foi encontrada com a adição intermediária de 10% de farelos, a partir do 8º dia. O limite do diâmetro da placa impediu a constatação de que esta velocidade permaneceria crescente nos dias seguintes, porém pode-se imaginar que sim.

Em bagaço de cana-de-açúcar, da mesma forma que em L17, B10% e B20% (Figura 6) (Quadro 33, em anexo), foram construídos em uma única curva de velocidade instantânea de crescimento, por não apresentarem diferença significativa entre eles. No entanto, em L55, ao contrário do que ocorreu em L17, a curva de velocidade instantânea de crescimento foi independente da adição de farelos. O aumento da velocidade em B0% , com o tempo, foi superior aos demais tratamentos. O limite da placa também impossibilitou verificar a velocidade nos demais dias, mas como no caso anterior, também se supõe que permaneceria crescente.

Segundo Dix & Webster (1995) quando as condições nutricionais ao redor do micélio são insuficientes, ao invés da produção de “biomassa” estimada por dia o crescimento é direcionado para as hifas principais, permitindo-as a um crescimento mais acelerado.

Os resultados de velocidade, em bagaço de cana-de-açúcar, coincidem com os encontrados por Rossi (1994), quando testou este material com várias porcentagens de farelo e verificou que baixos índices de farelo promoveram maior velocidade de miceliação de *L.edodes*. No entanto, diferenças metabólicas entre espécies e entre linhagens de uma mesma

espécie podem causar grandes diferenças na habilidade de utilização do nitrogênio (Kurtzman & Zadrazil, 1982).

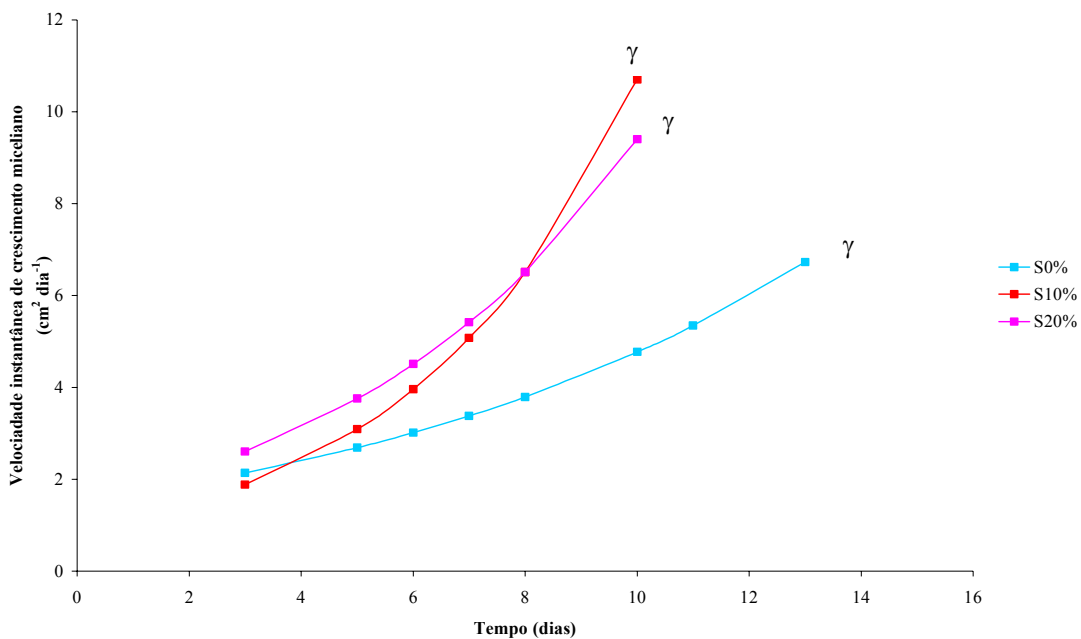


Figura 5. Curvas de velocidade instantânea de crescimento de L55, em meios de cultura à base de serragem com várias quantidades de farelo.

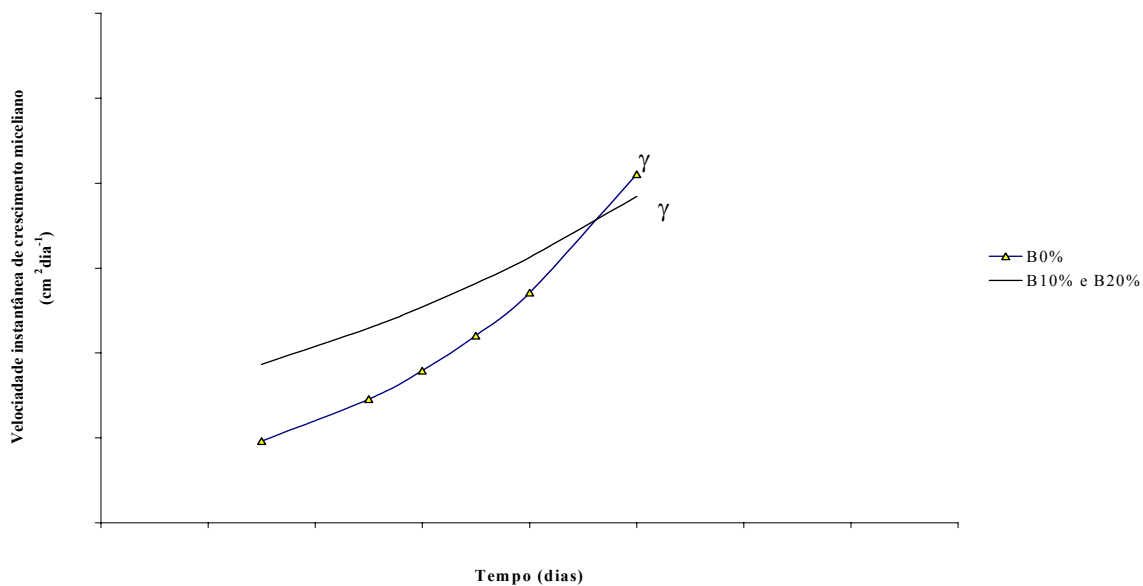


Figura 6. Curvas de velocidade instantânea de crescimento miceliano para L55, em meios de cultura a base de bagaço de cana-de-açúcar, com várias quantidades de farelo.

### 6.1.2. Efeito do substrato base

Analisando-se os betas (Quadro 9) com diferença significativa verificou-se que os maiores valores deste parâmetro resultaram em velocidade instantânea inicial maior e maiores valores de gama (Quadro 10) velocidade instantânea final maior, como pode ser verificado na Figura 7.

Quadro 9 - Comparação entre os betas pelo teste de Student-Newman-Kills (SNK), segundo L17 e porcentagens de suplementação de farelos, em serragem e bagaço de cana-de-açúcar

		Substratos	
		S0%	B0%
L17		3,74 <sup>A*</sup>	18,16 <sup>B</sup>
		S10%	B10%
		5,07 <sup>A</sup>	5,26 <sup>A</sup>
		S20%	B20%
		3,58 <sup>A</sup>	5,29 <sup>B</sup>

\* Por linha: medianas seguidas de mesma letra, não diferem significativamente ao nível de 5% de significância pelo teste de Student-Newman-Kills. Medianas referentes a 4 repetições.

Quadro 10 - Comparação entre os gamas pelo teste de Student-Newman-Kills (SNK), segundo L17 e porcentagens de suplementação de farelos, em serragem e bagaço de cana-de-açúcar.

		Substratos	
L17	S0%	B0%	
	1,20 <sup>A*</sup>	1,09 <sup>B</sup>	
	S10%	B10%	
	1,24 <sup>A</sup>	1,23 <sup>A</sup>	
	S20%	B20%	
	1,29 <sup>A</sup>	1,25 <sup>B</sup>	

\* Por linha: medianas seguidas de mesma letra, não diferem significativamente ao nível de 5% de significância pelo teste de Student-Newman-Kills. Medianas referentes a 4 repetições.

A influência dos substratos base, serragem e bagaço de cana-de-açúcar, na velocidade instantânea de crescimento miceliano de L17, em cada porcentagem de farelo, pode ser verificado na Figura 7 e nos Quadros 34, 35 e 36, em anexo.

A serragem promoveu velocidades significativamente maiores de crescimento de área em relação ao bagaço de cana-de-açúcar, exceto no nível 10% que não houve diferença entre os materiais utilizados como base.

Com relação à serragem como material base o mesmo foi observado por Teixeira (1996), que enriquecendo serragem de *Eucalyptus grandis* com farelo de arroz promoveu maior velocidade de miceliação.

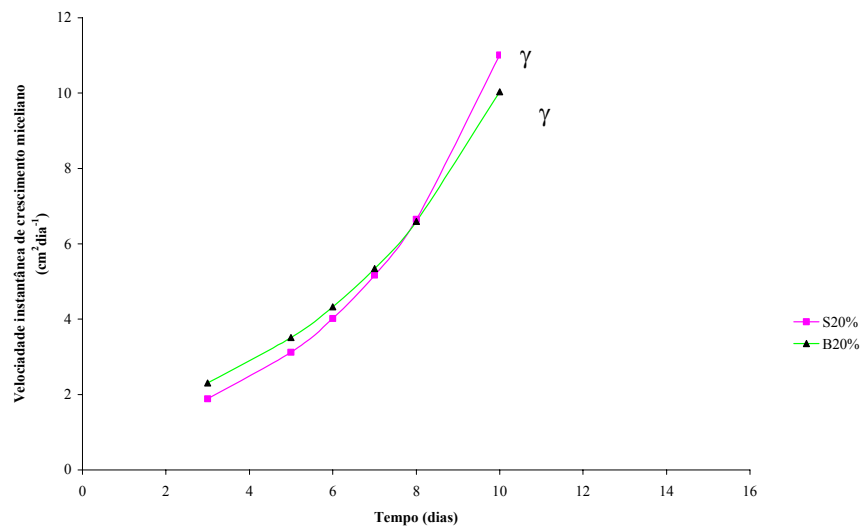
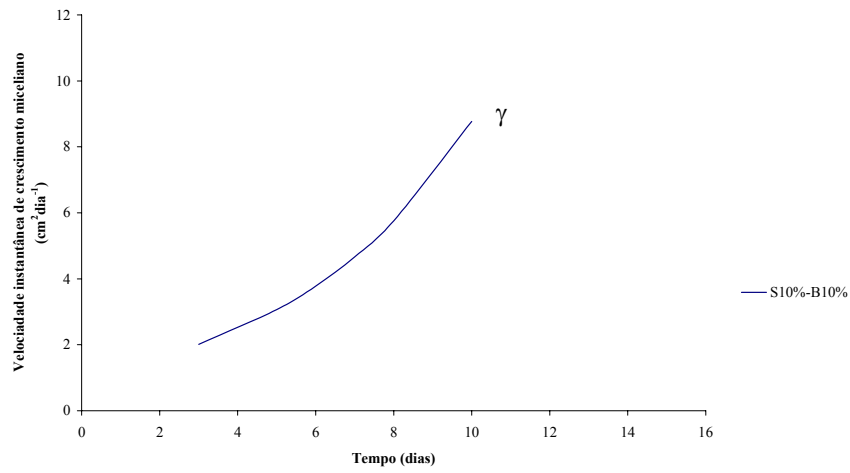
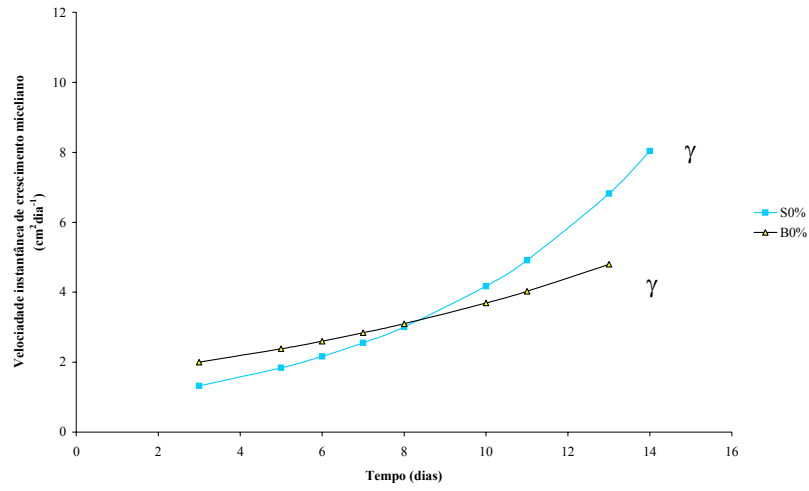


Figura 7. Curvas de velocidade instantâneas de crescimento miceliano de L17, em meios de cultura, conforme efeito do substrato base utilizado.

Analisando-se os parâmetros beta (Quadro 11) verificou-se que os maiores valores deste parâmetro resultaram e uma velocidade instantânea inicial maior e nos maiores valores de gama (Quadro 12) em uma velocidade instantânea final maior, como pode ser observado na Figura 8.

Quadro 11 - Comparação entre os betas pelo teste de Student-Newman-Kills (SNK), segundo L55 e porcentagens de suplementação de farelos, em serragem e bagaço de cana-de-açúcar.

		Substratos	
		S0%	B0%
L55		13,56 <sup>A*</sup>	4,80 <sup>B</sup>
		S10%	B10%
		3,83 <sup>A</sup>	20,75 <sup>B</sup>
		S20%	B20%
		9,65 <sup>A</sup>	38,04 <sup>B</sup>

\* Por linha: medianas seguidas de mesma letra, não diferem significativamente ao nível de 5% de significância pelo teste de Student-Newman-Kills. Medianas referentes a 4 repetições.

Quadro 12 - Comparação entre os gamas pelo teste de Student-Newman-Kills (SNK), segundo L55 e porcentagens de suplementação de farelos, em serragem e bagaço de cana-de-açúcar.

		Substratos	
		S0%	B0%
L55		1,12 <sup>A*</sup>	1,24 <sup>B</sup>
		S10%	B10%
		1,28 <sup>A</sup>	1,13 <sup>B</sup>
		S20%	B20%
		1,19 <sup>A</sup>	1,09 <sup>B</sup>

\* Por linha: medianas seguidas de mesma letra, não diferem significativamente ao nível de 5% de significância pelo teste de Student-Newman-Kills. Medianas referentes a 4 repetições.

Em L55 (Figura 8), a serragem promoveu maiores velocidades de área de miceliação (Quadros 37, 38 e 39, anexos) ao longo do tempo, exceto em 0% em que o bagaço de cana-de-açúcar foi melhor material base em relação à serragem.

Embora a serragem tenha se mostrado melhor material base, o bagaço de cana-de-açúcar iniciou com velocidades maiores, a quantidade de nutrientes solúveis extraídos do bagaço de cana-de-açúcar, provavelmente mais elevado do que em serragem, possibilitou velocidade instantânea inicial superior, em comparação à da serragem, conforme a área de crescimento foi aumentando esses açúcares presentes no meio à base de bagaço de cana-de-açúcar tornaram-se insuficientes para manter o crescimento naquela velocidade.

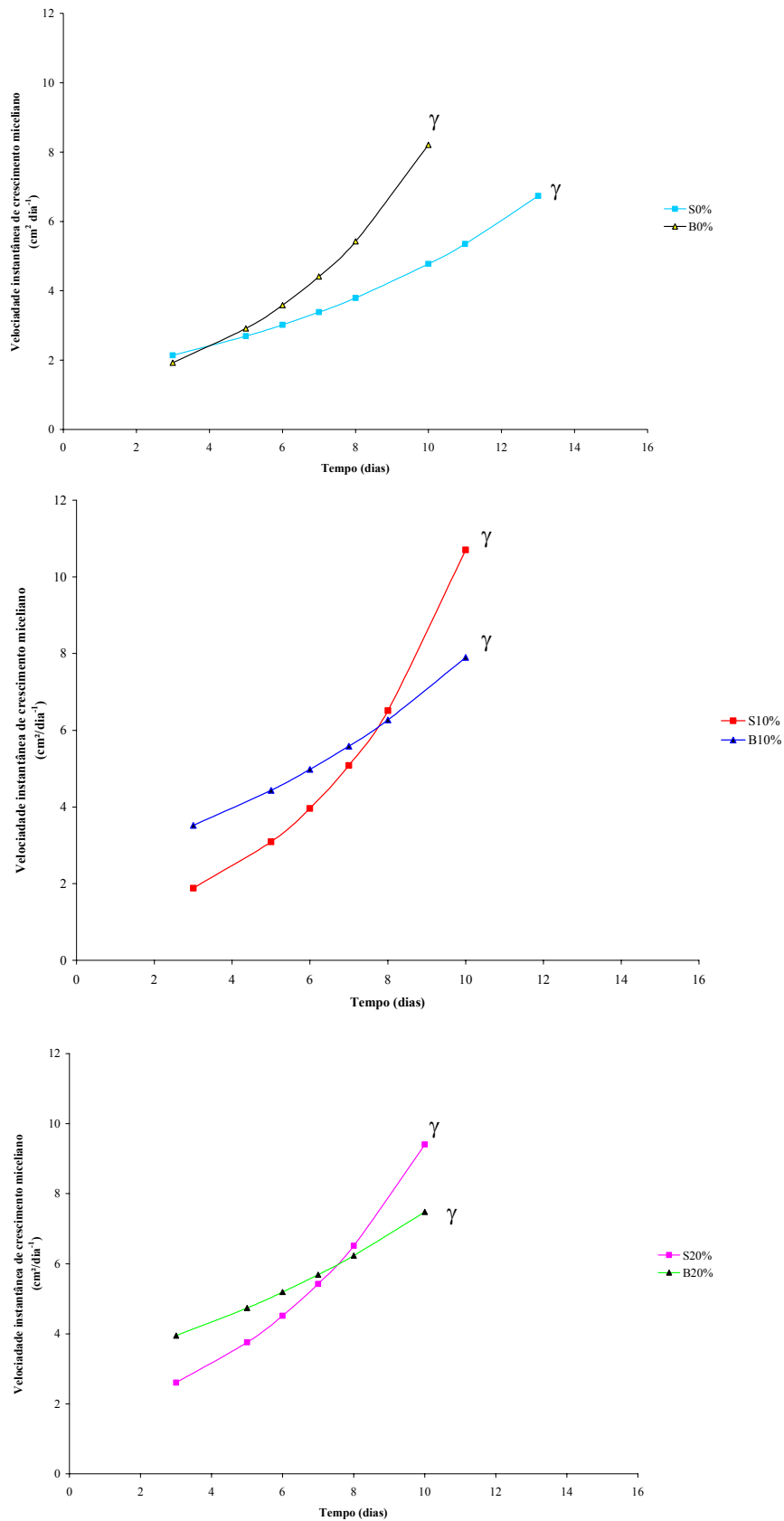


Figura 8. Curvas de velocidades instantâneas de crescimento de L55, em meio de cultura, conforme substrato base utilizado.

## 6.2. Cinética de crescimento miceliano do *Lentinula edodes* em substratos

A velocidade de crescimento miceliano do *Lentinula edodes*, em substrato, é função dos parâmetros beta, gama e delta. No entanto, os resultados dos betas e gamas estimados, nos quadros que se seguem, foram iguais, o que implica dizer que o resultados de comparação entre os deltas estimados, dos tratamentos, poderá ajudar a concluir se ocorreu diferença significativa ou não. Lembrando que basta um dos dois lados dos parâmetros estimados (de um lado beta e gama, de outro delta) ter resultado significativo para que se conclua que as velocidades são estatisticamente diferentes.

O componente determinístico usado para obtenção do volume de crescimento do *Lentinula edodes* nos tratamentos, é função beta, gama e delta como se pode observar pela equação (3) citada em 5.5.2. Não foi encontrada nenhuma relação direta dos parâmetros estimados beta, gama e delta (Quadros 13, 14 e 15, respectivamente) com as velocidades instantâneas de crescimento miceliano em volume (Figuras 9 e 10) embora gama tenha apresentado, em alguns casos, relação com velocidade inicial de crescimento e, delta com a velocidade final, isto não foi observado de forma que se pudesse concluir uma relação entre eles.

Quadro 13 - Comparação entre os betas pelo teste de Student-Newman-Kills (SNK) e de Mann-Whitney, segundo linhagem e substrato.

Linhagem	Substratos					
	Serragem			Bagaço de cana-de-açúcar		
	S0%	S10%	S20%	B0%	B10%	B20%
L17	1,20 <sup>Ba*</sup>	0,97 <sup>Aa</sup>	0,84 <sup>Ca</sup>	1,05 <sup>Aa</sup>	0,98 <sup>Aa</sup>	1,05 <sup>Aa</sup>
L55	0,94 <sup>Bb</sup>	1,40 <sup>Cb</sup>	1,11 <sup>Ab</sup>	1,05 <sup>Aa</sup>	1,06 <sup>Aa</sup>	0,96 <sup>Da</sup>

\* Letras maiúsculas: para cada linhagem, substratos representados pela mediana, seguidos de mesma letra, não diferem significativamente ao nível de 5% de significância pelo teste de Student-Newman-Kills. Letras minúsculas: para cada substrato, linhagens representadas pela mediana seguidas de mesma letra, não diferem significativamente ao nível de 5% de significância pelo teste de Mann-Whitney. Medianas referentes a 6 repetições

Quadro 14 - Comparação entre os gamas pelo teste de Student-Newman-Kills (SNK) e de Mann-Whitney, segundo linhagem e substrato.

Linhagem	Substratos					
	Serragem			Bagaço de cana-de-açúcar		
	S0%	S10%	S20%	B0%	B10%	B20%
L17	1,20 <sup>Ba*</sup>	0,97 <sup>Aa</sup>	0,84 <sup>Ca</sup>	1,05 <sup>Aa</sup>	0,98 <sup>Aa</sup>	1,05 <sup>Aa</sup>
L55	0,94 <sup>Bb</sup>	1,40 <sup>Cb</sup>	1,11 <sup>Ab</sup>	1,05 <sup>Aa</sup>	1,06 <sup>Aa</sup>	0,96 <sup>Da</sup>

\* Letras maiúsculas: para cada linhagem, substratos representados pela mediana, seguidos de mesma letra, não diferem significativamente ao nível de 5% de significância pelo teste de Student-Newman-Kills. Letras minúsculas: para cada substrato, linhagens representadas pela mediana seguidas de mesma letra, não diferem significativamente ao nível de 5% de significância pelo teste de Mann-Whitney. Medianas referentes a 6 repetições

Quadro 15 - Comparação entre os deltas pelo teste de Student-Newman-Kills (SNK) e de Mann-Whitney, segundo linhagem e substrato.

Linhagem	Substratos					
	Serragem			Bagaço de cana-de-açúcar		
	S0%	S10%	S20%	B0%	B10%	B20%
L17	27,9 <sup>Ca*</sup>	20,6 <sup>Aa</sup>	22,5 <sup>Da</sup>	18,1 <sup>Ba</sup>	20,0 <sup>Aa</sup>	18,1 <sup>Ba</sup>
L55	25,4 <sup>Bb</sup>	24,5 <sup>Cb</sup>	23,3 <sup>Aa</sup>	22,6 <sup>Ab</sup>	23,7 <sup>Db</sup>	22,4 <sup>Ab</sup>

\* Letras maiúsculas: para cada linhagem, substratos representados pela mediana, seguidos de mesma letra, não diferem significativamente ao nível de 5% de significância pelo teste de Student-Newman-Kills. Letras minúsculas: para cada substrato, linhagens representadas pela mediana seguidas de mesma letra, não diferem significativamente ao nível de 5% de significância pelo teste de Mann-Whitney. Medianas referentes a 6 repetições

Assim como foi feito para os meios de cultura, atribuiu-se também aos tratamentos, estatisticamente iguais, uma única curva de velocidade instantânea de crescimento e curvas independentes, aos com diferença estatística.

O volume de crescimento miceliano em substratos, dentro de tubos de ensaio, gerou curvas de velocidade instantâneas que merecem algumas considerações iniciais, antes de serem apresentadas.

Na verdade, o uso de sacos plásticos pelos produtores de semente, é bastante similar à condição do cilindro (tubo de ensaio). Normalmente, alguns dias após a inoculação, agita-se o saco plástico distribuindo o inóculo, com isso, pode-se obter uma velocidade de crescimento volumétrico de até o cubo do tempo de incubação, tal como enfatizado por Stanier et al. (1969). O desenvolvimento do micélio oriundo de um ponto de inoculação, em substrato sólido, é dado pela extensão radial da hifa em três dimensões, e assume um formato convexo (esférico) tal como o de culturas líquidas, agitadas orbitalmente. As enzimas extracelulares ajudam na penetração do substrato sólido, mas a profundidade de penetração é dependente da adequada aeração (Dix & Webster, 1995).

Sob essas circunstâncias, observou-se no presente trabalho que a adaptação do micélio (crescimento anterior em frascos) e limitação do diâmetro do tubo, onde o micélio foi, "direcionado" a crescer apenas para baixo, foram fatores que contribuíram, nos primeiros dias, para uma grande velocidade instantânea de crescimento miceliano em volume, em todos os tratamentos. No entanto, em seguida, ocorreu uma queda acentuada da velocidade instantânea, e depois, permaneceu praticamente constante em alguns tratamentos (meio do tubo). A partir deste ponto, a velocidade instantânea voltou a aumentar, em direção ao final do

substrato, onde, pela metodologia adotada havia uma concentração provavelmente maior de oxigênio no fundo do tubo e maior possibilidade de trocas gasosas.

Acredita-se que se uma simulação tridimensional fosse realizada, relativamente ao crescimento miceliano do cilindro utilizado, os valores das velocidades ( $\text{cm}^3\text{dia}^{-1}$ ) poderiam ser pelo menos quatro vezes maior do que os encontrados.

A diminuição da velocidade instantânea de crescimento miceliano, no meio do tubo, pode ter sido ocasionado, provavelmente, pela baixa oxigenação do substrato neste ponto, como verificaram Leatham & Stahmann (1987), que a troca gasosa inadequada é fator inibitório para o crescimento micelial de *L. edodes*, ou ainda por outros fatores como o acúmulo de produtos finais tóxicos e produção de metabólitos secundários (Stanier et al., 1969, Prosser, 1994).

Parte do carbono existente nos substratos sofre oxidação, resultando na produção de “biomassa” junto com produtos finais do metabolismo. Em alguns substratos, ou para algumas espécies, a oxidação pode ser ineficiente de forma que grande parte do ATP produzido é dirigido para outros propósitos sem ser o de crescimento (Edwards, 1993).

No presente trabalho, a baixa oxigenação não ocasionou a parada completa de crescimento, porém uma forte retração do processo. Sabe-se que através do acúmulo de reservas, os fungos são capazes de manter-se até encontrar condições favoráveis para a retomada normal de crescimento (Dickinson & Bottomley, 1980). Pode-se constatar isto, com o aumento da velocidade instantânea do meio para o final do tubo (maior oxigenação).

As fases de declínio, no crescimento de uma cultura podem ser causadas, entre outras coisas, pela exaustão de algum nutriente que se tornou limitante ou pelo acúmulo de produtos residuais (Griffin, 1994). No caso do presente trabalho, a baixa oxigenação, no meio do tubo, e os substratos não suplementados com farelos, foram fatores que alteraram o crescimento miceliano.

Observando os vários substratos de crescimento para L17 (Figuras 9), verificou-se que em S20%, o micélio colonizou com velocidade de crescimento de volume, estatisticamente, superior aos demais tratamentos (Quadro 40, anexo) e para L55 (Figura 10) a velocidade de colonização foi significativamente superior em S10% (Quadro 41, anexo).

Em L17 os substratos que tiveram maiores velocidades instantâneas no 3º dia, levaram mais tempo para colonizar o tubo, mas o mesmo não ocorreu em L55, pois os substratos com maiores velocidades, no 3º dia, foram os que colonizaram mais rapidamente.

Portanto, mesmo L17 tendo as maiores velocidades instantâneas iniciais, a forte diminuição da velocidade instantânea no 5º dia, comparada à de L55, provavelmente relacionada à baixa oxigenação, faz supor numa maior sensibilidade desta linhagem a essa condição. A influência da adição de farelos e dos substratos utilizados como base serão analisados em seguida.

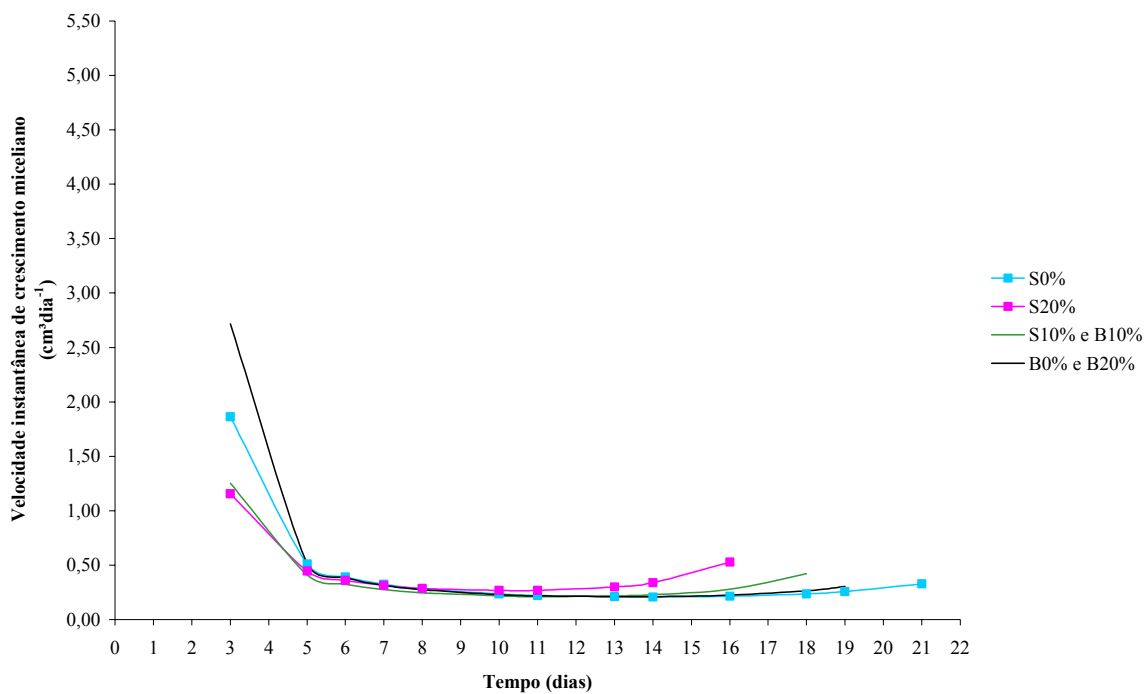


Figura 9. Curvas de velocidades instantâneas de crescimento miceliano de L17 em vários substratos.

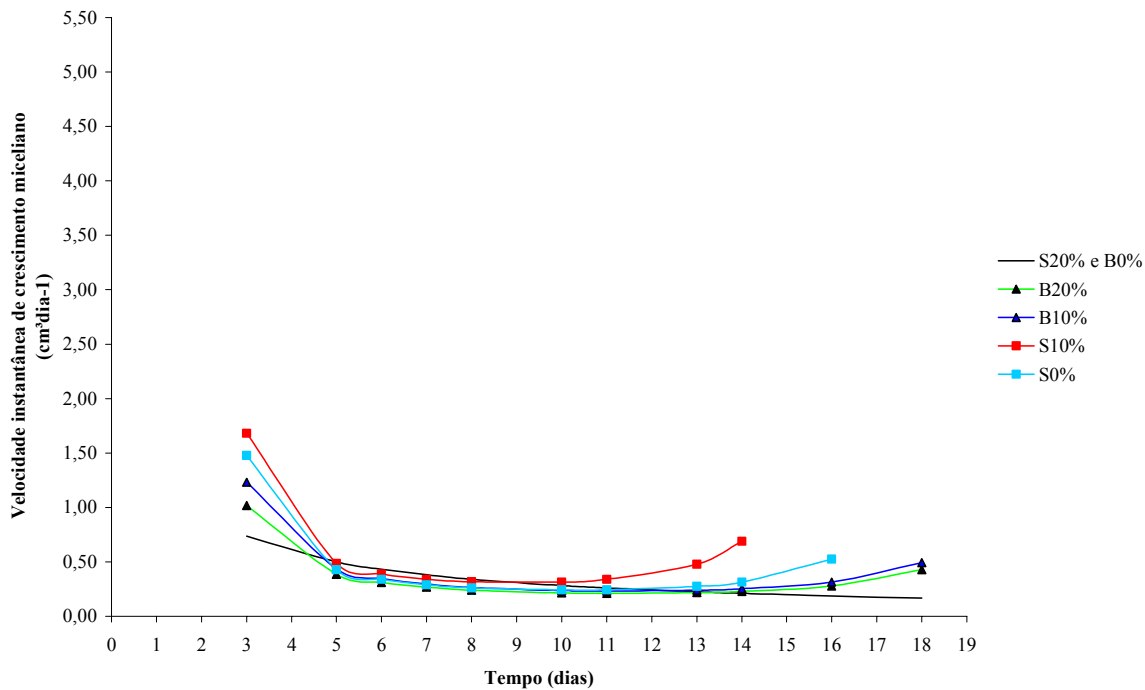


Figura 10. Curvas de velocidades instantâneas de crescimento miceliano de L55 em vários substratos

### 6.2.1. Efeito da porcentagem de farelo

Os parâmetros beta, gama e delta de L17 (Quadros 16, 17 e 18, respectivamente), assim como os de L55 (Quadros 19, 20 e 21, respectivamente) não apresentaram alguma relação com as velocidades instantâneas iniciais ou finais como ocorreu em meio de cultura.

Quadro 16 - Comparação entre os betas pelo teste de Student-Newman-Kills (SNK), para L17 em serragem e em bagaço de cana-de-açúcar, suplementados com várias porcentagens de farelos.

	S0%	S10%	S20%
L17	1,20 <sup>B*</sup>	0,97 <sup>A</sup>	0,84 <sup>A</sup>
	B0%	B10%	B20%
	1,05 <sup>A</sup>	0,98 <sup>A</sup>	1,05 <sup>A</sup>

Por linha: medianas seguidas de mesma letra, não diferem significativamente ao nível de 5% de significância pelo teste de Student-Newman-Kills. Medianas referentes a 6 repetições.

Quadro 17 - Comparação entre os gamas pelo teste de Student-Newman-Kills (SNK), para L17 em serragem e em bagaço de cana-de-açúcar, suplementados com várias porcentagens de farelos.

	S0%	S10%	S20%
L17	1,20 <sup>B*</sup>	0,97 <sup>A</sup>	0,84 <sup>A</sup>
	B0%	B10%	B20%
	1,05 <sup>A</sup>	0,98 <sup>A</sup>	1,05 <sup>A</sup>

Por linha: medianas seguidas de mesma letra, não diferem significativamente ao nível de 5% de significância pelo teste de Student-Newman-Kills. Medianas referentes a 6 repetições.

Quadro 18 - Comparação entre os deltas pelo teste de Student-Newman-Kills (SNK), para L17 em serragem e em bagaço de cana-de-açúcar, suplementados com várias porcentagens de farelos.

	S0%	S10%	S20%
L17	27,9 <sup>A*</sup>	20,6 <sup>B</sup>	22,5 <sup>C</sup>
	18,1 <sup>B</sup>	20,0 <sup>A</sup>	18,1 <sup>A</sup>

Por linha: medianas seguidas de mesma letra, não diferem significativamente ao nível de 5% de significância pelo teste de Student-Newman-Kills. Medianas referentes a 6 repetições.

Quadro 19 - Comparação entre os betas pelo teste de Student-Newman-Kills (SNK), para L55 em serragem e em bagaço de cana-de-açúcar, suplementados com várias porcentagens de farelos.

	S0%	S10%	S20%
L55	0,94 <sup>A*</sup>	1,40 <sup>B</sup>	1,11 <sup>C</sup>
	1,05 <sup>A</sup>	1,06 <sup>A</sup>	0,96 <sup>A</sup>

Por linha: medianas seguidas de mesma letra, não diferem significativamente ao nível de 5% de significância pelo teste de Student-Newman-Kills. Medianas referentes a 6 repetições.

Quadro 20 - Comparação entre os gamas pelo teste de Student-Newman-Kills (SNK), para L55 em serragem e em bagaço de cana-de-açúcar, suplementados com várias porcentagens de farelos.

	S0%	S10%	S20%
L55	0,94 <sup>A*</sup>	1,40 <sup>B</sup>	1,11 <sup>C</sup>
	1,05 <sup>A</sup>	1,06 <sup>A</sup>	0,96 <sup>A</sup>

Por linha: medianas seguidas de mesma letra, não diferem significativamente ao nível de 5% de significância pelo teste de Student-Newman-Kills. Medianas referentes a 6 repetições.

Quadro 21 - Comparação entre os deltas estimados pelo teste de Student-Newman-Kills (SNK), para L55 em serragem e em bagaço de cana-de-açúcar, suplementados com várias porcentagens de farelos.

	S0%	S10%	S20%
L55	25,4 <sup>A*</sup>	24,5 <sup>B</sup>	23,3 <sup>C</sup>
	B0%	B10%	B20%
	22,6 <sup>A</sup>	23,7 <sup>B</sup>	22,4 <sup>A</sup>

Por linha: medianas seguidas de mesma letra, não diferem significativamente ao nível de 5% de significância pelo teste de Student-Newman-Kills. Medianas referentes a 6 repetições.

Em serragem, a quantidade de 20% de farelo, para L17, além de proporcionar maior velocidade instantânea (Figura 13 e Quadro 42, anexo). A velocidade de crescimento de volume foi proporcional à adição de farelos (Figura 11).

Os farelos são utilizados como uma das opções de enriquecimento, principalmente para a suplementação de ácido aspártico e tiamina que segundo Song et al. (1987) conduzem ao máximo de miceliação. Teixeira (1996) obteve maior velocidade miceliação para *L. edodes* com adição de farelo de arroz, superando os tratamentos com levedura e dextrose mais levedura.

Os resultados encontrados por Capelari (1996) para *Agrocybe perfecta* foram inversos, com o aumento da concentração de nitrogênio, foi observado menor velocidade de colonização do substrato.

Na linhagem L55 (Figura 14) a suplementação, em serragem, possibilitou maiores velocidades instantâneas de crescimento de volume (Quadro 43, anexo), porém no substrato S10% o micélio teve uma colonização mais rápida que nos demais tratamentos (Figura 12).



Figura 11. Efeito da quantidade de farelo na velocidade de crescimento de L7, em serragem (14º dia).



Figura 12. Efeito da quantidade de farelo, na velocidade de crescimento de L55, em serragem (14º dia).

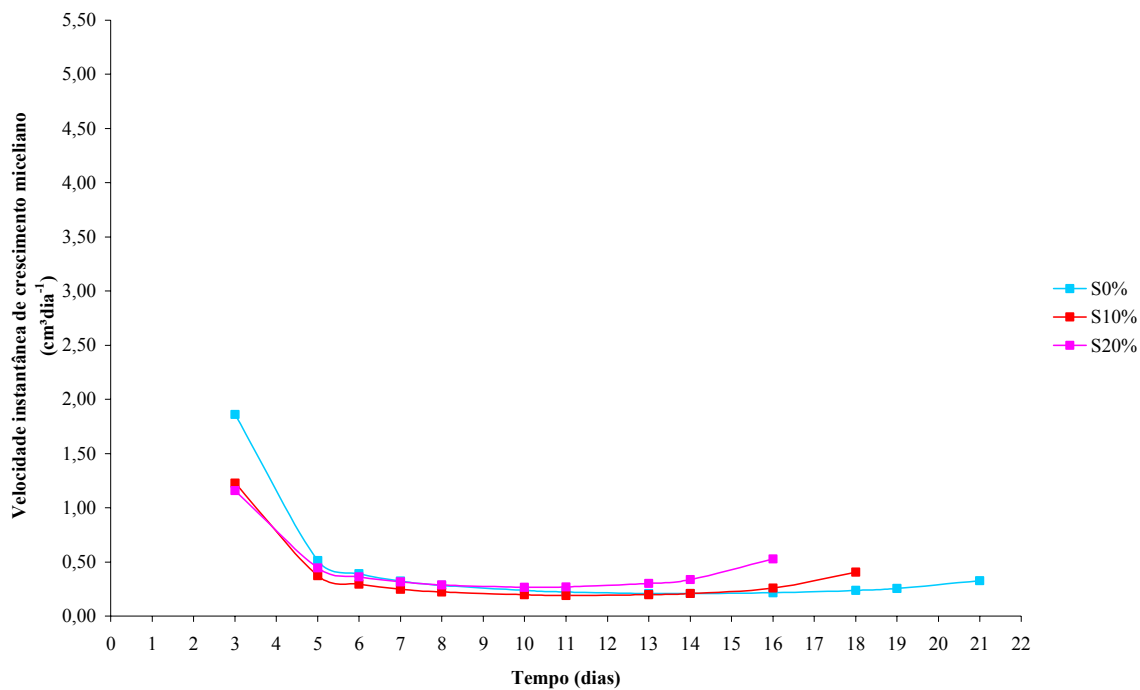


Figura 13. Curvas de velocidades instantâneas de crescimento miceliano de L17 em substratos à base de serragem, com várias quantidades de farelo.

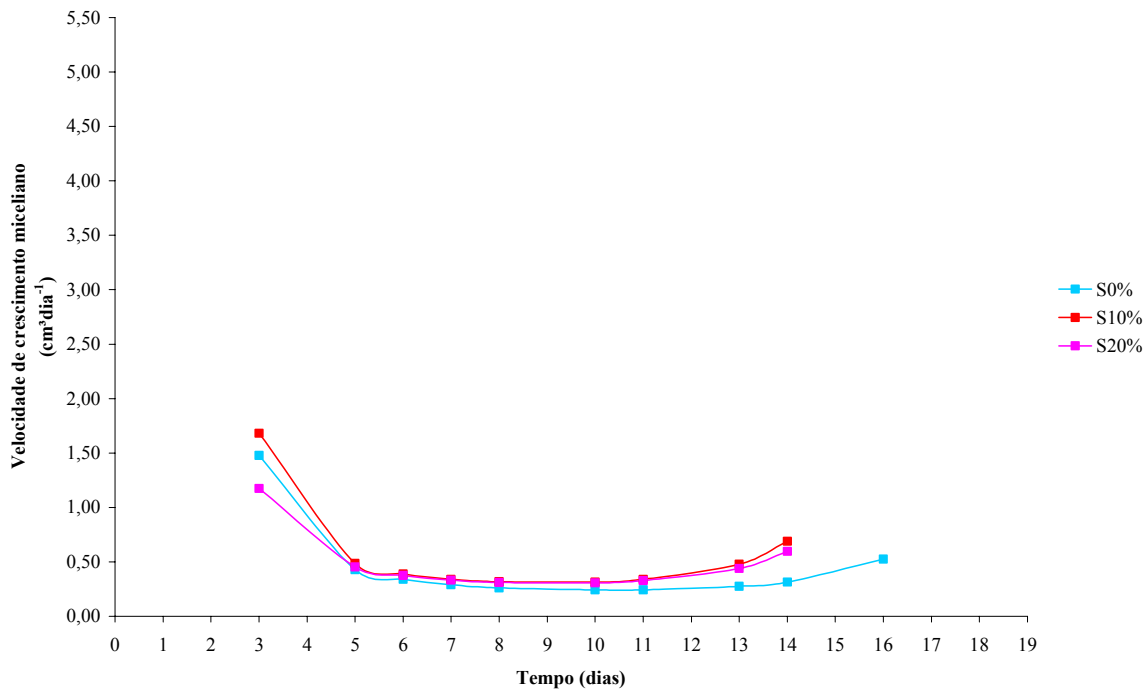


Figura 14. Curvas de velocidades instantâneas de crescimento miceliano de L55 em substratos à base de serragem, com várias quantidades de farelo.

Analisando os substratos à base de bagaço de cana-de-açúcar, observa-se que a adição de farelos, para L17 (Figura 17), não aumentou proporcionalmente a velocidade de crescimento, porém os substratos suplementados tiveram velocidades superiores em relação à B0% (Figura 15 e Quadro 44, anexo). Verificou-se uma grande velocidade inicial de L17 em B0%, e isto pode ter sido devido às condições nutricionais ao redor do micélio, que quando são insuficientes, ao invés da produção de “biomassa” o crescimento é direcionado para as hifas principais, permitindo-as a um crescimento mais acelerado Dix & Webster (1995).

Em L55, a adição de 10% de farelos, em bagaço de cana-de-açúcar (Figura 18), resultou em velocidades instantâneas de crescimento de volume superiores a 0% e 20%, considerados estatisticamente iguais (Figura 16 e Quadro 45, anexo), confirmando os resultados encontrados, para esta linhagem, em meio de cultura à base de serragem (item 6.1.2) e em substrato a base de serragem, visto anteriormente, onde ocorreu um aumento significativo da velocidade instantânea com uma porcentagem intermediária de farelos .



Figura 15. Efeito do farelo na velocidade de crescimento de L17, em bagaço de cana-de-açúcar (14º dia).



Figura 16. Efeito do farelo na velocidade de crescimento de L55 em bagaço de cana-de-açúcar (14º dia).

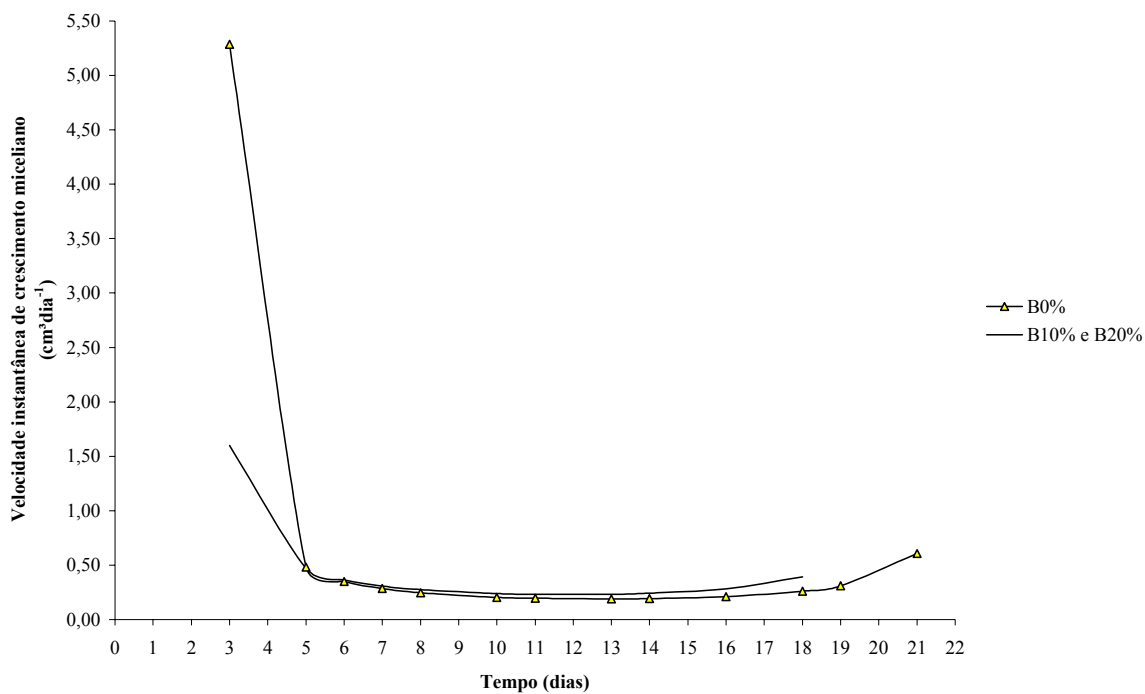


Figura 17. Curvas de velocidades instantâneas de crescimento miceliano de L17, em substratos a base de bagaço de cana-de-açúcar, com várias quantidades de farelo.

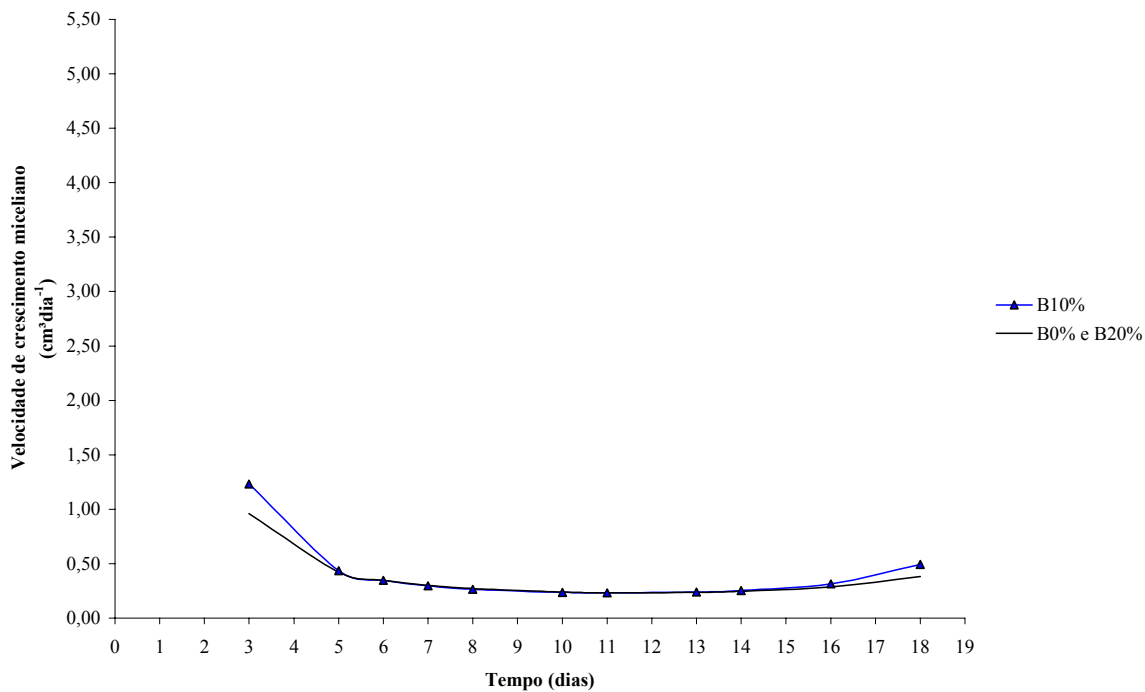


Figura 18. Curvas de velocidades instantâneas de crescimento miceliano de L55, em substratos a base de bagaço de cana-de-açúcar, com várias quantidades de farelo.

A adição de farelos, tanto em serragem quanto em bagaço, em L17, promoveu, inicialmente velocidades instantâneas inferiores à B0%. Este fato pode estar relacionado com o aumento de nitrogênio, promovido pela adição dos farelos, que, segundo Kamra & Zadrazil (1988), pode inibir a degradação da lignina. Porém, Mata & Savoie (1998) estudando o crescimento de *Lentinula edodes* em palha de trigo, verificaram que o crescimento inicial do micélio não estava diretamente relacionado com secreções de enzimas, mas mais, provavelmente, ligado à habilidade de utilizar fontes de carbono solúveis.

Porém ao longo do tempo os substratos, com maior porcentagem de farelos (10 e 20%), em L17, colonizaram mais rapidamente o tubo. Portanto a adição de farelos foi fundamental na velocidade de colonização desta linhagem em qualquer um dos substratos. Com relação a isso Capelari (1996), verificou que substâncias relativamente fáceis de serem metabolizadas, como o farelo de trigo, de arroz ou farinha de soja, resultaram no aumento da taxa de decomposição do substrato em relação ao bagaço de cana-de-açúcar sem suplementação. Leatham & Kirk (1983) mencionam que, para a obtenção de rendimentos ótimos na degradação de material lignocelulósico, pobre em nitrogênio, a suplementação com este elemento é essencial.

Para L55, a adição de farelos não afetou as velocidades instantâneas, no início da colonização, como em L17. Porém um nível limite de nitrogênio pôde ser verificado uma vez que ocorreu, de uma maneira geral, maior velocidade instantânea de miceliação com o nível de 10% de farelo. Sendo 10%, a porcentagem que resultou em melhores velocidades de crescimento, é provável que isto esteja relacionado a trocas gasosas que com uma quantidade maior de farelos seria prejudicada no meio do tubo, e com uma quantidade menor, embora tivesse capacidade de troca, teria nutrientes insuficientes para o seu

crescimento, portanto uma quantidade intermediária de farelos resultaria em melhores velocidades de crescimento. Entretanto outros fatores podem estar relacionados a este acontecimento como a degradação de compostos para o seu crescimento. Neste sentido alguns estudos mostram que o desenvolvimento da habilidade lignolítica requer entre outros fatores, condições nutricionais e culturais, incluindo substrato metabolizável, altos níveis de oxigênio, limite de nitrogênio (Kirk & Farrell, 1987; Buswell, 1991). Kirke & Farrell, 1987, ainda afirmam que, excesso de nitrogênio inibe a produção de enzimas lignolíticas em *Phanerochaete chrysosporium*.

#### **6.2.2. Efeito do substrato base**

Da mesma forma que no efeito do substrato base os valores dos parâmetros beta, gama e delta de L17 (Quadros 22, 23 e 24, respectivamente), assim como os de L55 (Quadros 25, 26 e 27, respectivamente) não apresentaram alguma relação com as velocidades instantâneas iniciais ou finais.

Quadro 22 - Comparação entre os betas pelo teste de Student-Newman-Kills (SNK), segundo L17 e quantidade de suplementação de farelos, em serragem e bagaço de cana-de-açúcar

		Substratos	
		S0%	B0%
L17		1,21 <sup>A*</sup>	1,06 <sup>B</sup>
		S10%	B10%
		0,97 <sup>A</sup>	0,98 <sup>A</sup>
		S20%	B20%
		0,84 <sup>A</sup>	1,05 <sup>B</sup>

Por linha: medianas seguidas de mesma letra, não diferem significativamente ao nível de 5% de significância pelo teste de Student-Newman-Kills. Medianas referentes a 6 repetições.

Quadro 23 - Comparação entre os gamas pelo teste de Student-Newman-Kills (SNK), segundo L17 e quantidade de suplementação de farelos, em serragem e bagaço de cana-de-açúcar.

		Substratos	
		S0%	B0%
L17		1,21 <sup>A*</sup>	1,06 <sup>B</sup>
		S10%	B10%
		0,97 <sup>A</sup>	0,98 <sup>A</sup>
		S20%	B20%
		0,84 <sup>A</sup>	1,05 <sup>B</sup>

Por linha: medianas seguidas de mesma letra, não diferem significativamente ao nível de 5% de significância pelo teste de Student-Newman-Kills. Medianas referentes a 6 repetições.

Quadro 24 - Comparação entre os deltas pelo teste de Student-Newman-Kills (SNK), segundo L17 e quantidade de suplementação de farelos, em serragem e bagaço de cana-de-açúcar.

		Substratos	
		S0%	B0%
L17		27,9 <sup>A*</sup>	18,1 <sup>B</sup>
		S10%	B10%
		20,6 <sup>A</sup>	20,0 <sup>A</sup>
		S20%	B20%
		22,5 <sup>A</sup>	18,1 <sup>B</sup>

Por linha: medianas seguidas de mesma letra, não diferem significativamente ao nível de 5% de significância pelo teste de Student-Newman-Kills. Medianas referentes a 6 repetições.

Quadro 25 - Comparação entre os betas pelo teste de Student-Newman-Kills (SNK), segundo L55 e quantidade de suplementação de farelos, em serragem e bagaço de cana-de-açúcar.

		Substratos	
		S0%	B0%
L55		0,94 <sup>A*</sup>	1,05 <sup>B</sup>
		S10%	B10%
		1,40 <sup>A</sup>	1,06 <sup>B</sup>
		S20%	B20%
		1,11 <sup>A</sup>	0,96 <sup>A</sup>

Por linha: medianas seguidas de mesma letra, não diferem significativamente ao nível de 5% de significância pelo teste de Student-Newman-Kills. Medianas referentes a 6 repetições.

Quadro 26 - Comparação entre os gamas pelo teste de Student-Newman-Kills (SNK), segundo L55 e quantidade de suplementação de farelos, em serragem e bagaço de cana-de-açúcar.

		Substratos	
		S0%	B0%
L55		0,94 <sup>A*</sup>	1,05 <sup>B</sup>
		S10%	B10%
		1,40 <sup>A</sup>	1,06 <sup>B</sup>
		S20%	B20%
		1,11 <sup>A</sup>	0,96 <sup>A</sup>

Por linha: medianas seguidas de mesma letra, não diferem significativamente ao nível de 5% de significância pelo teste de Student-Newman-Kills. Medianas referentes a 6 repetições.

Quadro 27 - Comparação entre os deltas pelo teste de Student-Newman-Kills (SNK), segundo L55 e quantidade de suplementação de farelos, em serragem e bagaço de cana-de-açúcar.

		Substratos	
		S0%	B0%
L55		25,4 <sup>A*</sup>	22,6 <sup>B</sup>
		S10%	B10%
		24,5 <sup>A</sup>	23,7 <sup>B</sup>
		S20%	B20%
		23,3 <sup>A</sup>	22,3 <sup>A</sup>

Por linha: medianas seguidas de mesma letra, não diferem significativamente ao nível de 5% de significância pelo teste de Student-Newman-Kills. Medianas referentes a 6 repetições.

A influência do substrato base utilizado, na velocidade instantânea de crescimento de L17, dentro das várias porcentagens de farelos (Quadros 46, 47 e 48, anexos), representada na Figura 22, mostrou que em 0% o bagaço de cana-de-açúcar, promoveu melhores velocidades, em 10% a velocidade foi independente do material base utilizado, e em 20%, a serragem resultou como melhor material em termos de velocidade instantânea de crescimento de volume (Figuras 19, 20 e 21).



Figura 19. Efeito do substrato base em 0% de farelo, na velocidade de crescimento de L17 e L55 (14º dia)



Figura 20. Efeito do substrato base em 10% de farelo, na velocidade de crescimento de L17 e L55(14º dia).



Figura 21. Efeito do substrato base em 20% de farelo, na velocidade de crescimento de L17 e L55(14º dia)

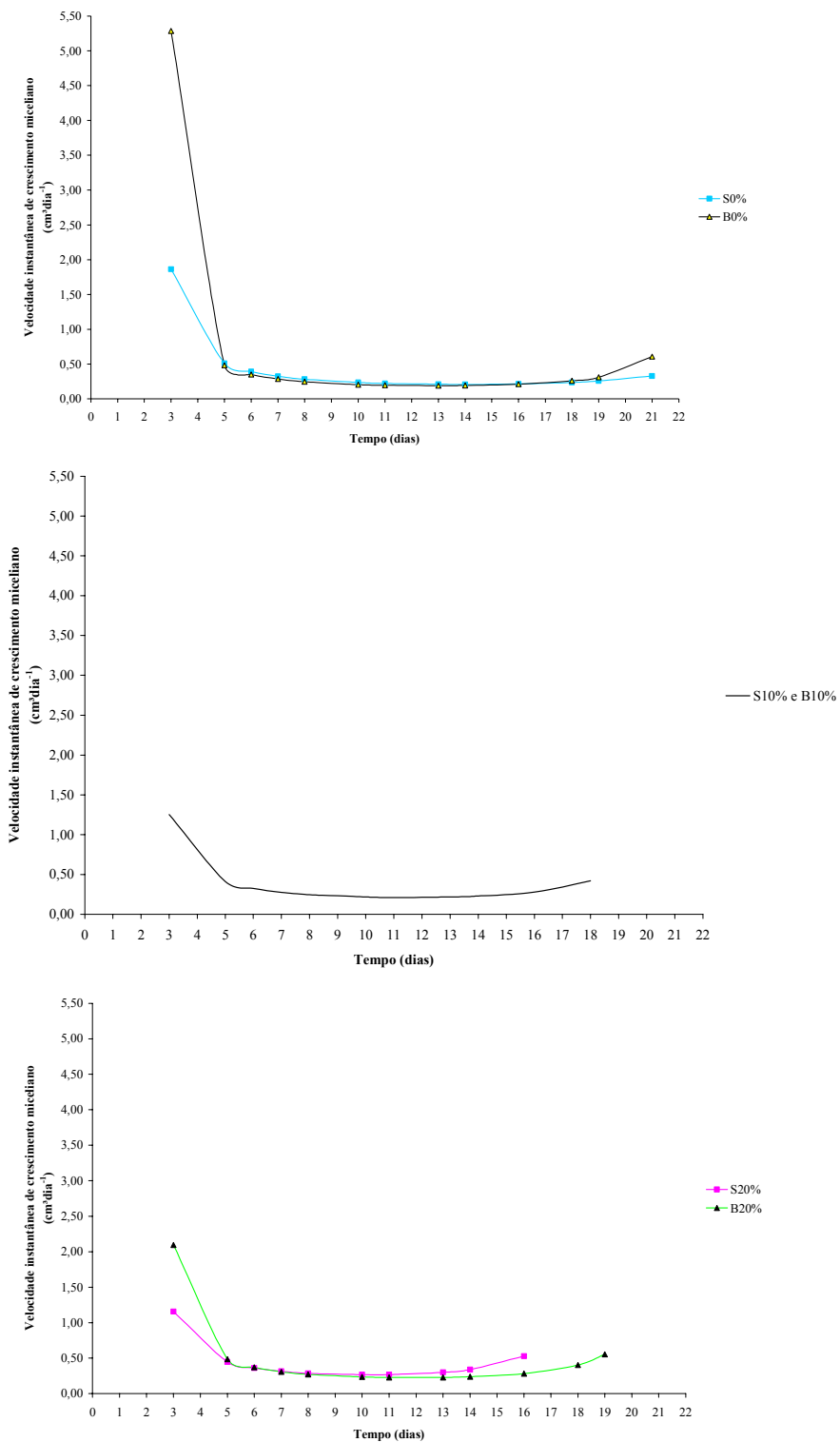


Figura 22. Curvas de velocidades instantâneas de crescimento miceliano de L17 nas diferentes porcentagens de farelo, em serragem e bagaço de cana-de-açúcar.

Em L55, as velocidades instantâneas de crescimento, nas várias porcentagens de farelos (Figura 23), mostrou que a serragem promoveu maiores velocidades instantâneas de crescimento de volume (Figuras 19, 20 e 21), exceto na quantidade de 20% em que o bagaço de cana-de-açúcar não diferiu estatisticamente da serragem (Quadros 49, 50 e 51, anexos). A curva da velocidade instantânea em 20% teve uma reação, ao baixo índice de oxigenação, mais suave do que nas demais porcentagens. Acredita-se que a suplementação elevada proporcionou reservas que amenizaram este efeito, podendo inclusive se restabelecer mais rapidamente e colonizar o tubo em menos tempo que nas demais porcentagens.

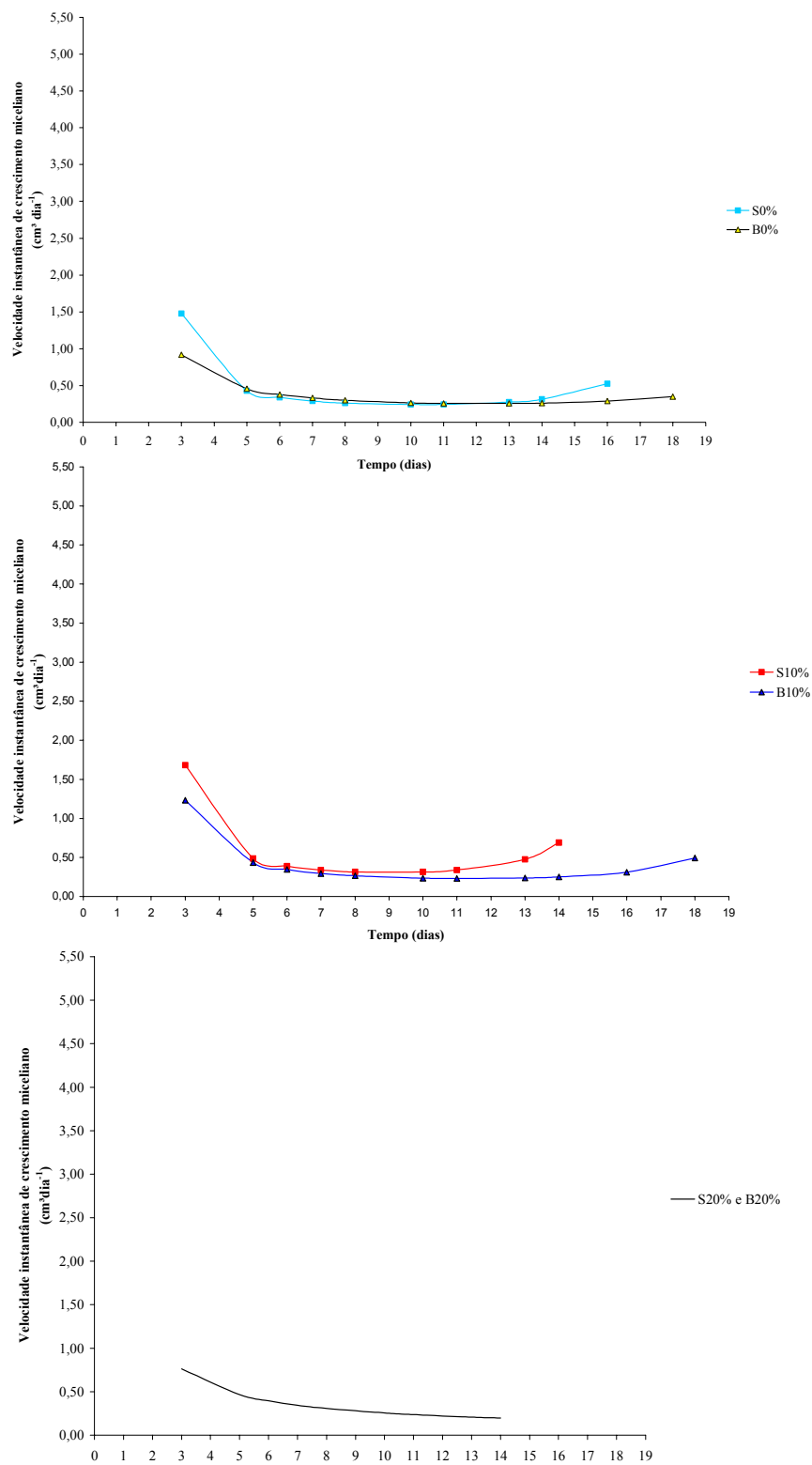


Figura 23. Curvas de velocidades instantâneas de crescimento miceliano de L55, nas diferentes quantidades de farelo, em serragem e bagaço de cana-de-açúcar.

Segundo Klein (1996), o material base utilizado tem influência uma vez que pode determinar um crescimento particular de crescimento micelial dependendo da sua estrutura granulométrica e de suas substâncias químicas.

Como o bagaço de cana-de-açúcar é estruturalmente composto por fibras laminares e sua densidade é inferior à da serragem foi necessário à aplicação de uma leve pressão para que todos os tubos tivessem a mesma altura de substrato. Este procedimento pode ter criado diferentes zonas de densidade, o que pode ter prejudicado a velocidade de crescimento do micélio em alguns dos tratamentos à base deste material.

A velocidade instantânea de crescimento em serragem se mostrou melhor, para L17, quando suplementado, e o bagaço de cana-de-açúcar quando não suplementado. Para L55, a serragem, de um modo geral, demonstrou ser o melhor material base. Porém o bagaço de cana-de-açúcar e a serragem não apresentaram diferenças quando suplementados com 20% de farelos.

Os resultados revelaram necessidades nutricionais diferentes entre as linhagens, no entanto os produtores de semente e de cultivo axênico, na prática, não levam o fator nutricional particular de cada linhagem em conta, mas deveriam, uma vez que a suplementação pode interferir na produtividade.

A cinética de crescimento em tubo de ensaio pôde verificar o efeito da falta de oxigenação, ocorrido no meio do tubo, que se assemelha ao que acontece nos sacos plásticos para a produção de semente. Donoghue & Denison (1995), verificaram que o crescimento miceliano do *Lentinula edodes* é prejudicado em altas concentrações de CO<sub>2</sub>, alterando seu sistema enzimático e diminuindo a velocidade de miceliação. Os autores

puderam comprovar que o fungo inoculado em substratos, dentro de sacos plásticos com maiores aberturas para troca gasosa, teve um crescimento miceliano mais rápido.

## 7. Conclusões

Pelos resultados obtidos e em função da metodologia adotada chegou-se às seguintes conclusões abaixo.

- A cinética de crescimento miceliano em superfície (área), independente das linhagens e substratos, seguiu um modelo matemático representado pela equação:  $Y_{ij} = \alpha + \beta\gamma^x$  onde  $Y_{ij}$  - crescimento em área na repetição i e tratamento j;  $\alpha$  - parâmetro de locação;  $\beta$  e  $\gamma$  - parâmetros de forma do modelo, relacionados à velocidade instantânea e  $x$ , tempo de incubação.
- Os maiores valores dos parâmetros gama resultaram na maior velocidade instantânea de crescimento em superfície (área), tanto para linhagens quanto para teores de farelos e substratos base (serragem e bagaço de cana-de-açúcar).
- A cinética de crescimento miceliano em volume (recipiente cilíndrico), independente das linhagens e substratos, seguiu um modelo matemático representado pela equação:  $y_{ij} = \alpha + \beta \ln\left(\frac{x + y}{-\gamma + \delta + x}\right)$  onde:  $Y_{ij}$  - crescimento em volume na repetição i e tratamento j;  $\alpha$  - parâmetro de locação;  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$  - parâmetros de forma do modelo, relacionados à velocidade instantânea e  $x$  - tempo de incubação.

- Os parâmetros beta, gama e delta, não apresentaram relação com a velocidade de crescimento em volume.
  
- Ocorreram interações significativas entre linhagens, substratos base e quantidades de farelos, tanto na cinética de crescimento em superfície quanto em volume:
  - com a linhagem L17, as velocidades de crescimento aumentaram de forma diretamente proporcional à adição de farelos;
  - com a linhagem L55, a quantidade de 10% de farelo propiciou maiores velocidades de crescimento;
  - independente da linhagem e porcentagem de farelos, a serragem propiciou maiores velocidades de crescimento.
  
- A L55, comercialmente usada em cultivos axênicos, foi a que se apresentou mais adaptada à metodologia adotada neste trabalho, em relação à L17, comercialmente usada na produção do shiitake em toras.

## 8. Referência Bibliográfica

- BOOMINATHAN, K., REDDY, C.A.. Fungal degradation of lignin: biotechnological applications. In: ARORA, D.K., BHARAT, R., MUKERJI, K.G., KNUDSEN, G.. *Handbook of applied mycology*. volume 4: Fungal biotechnology. New York: Marcel Dekker Inc., 1992. p.763-822.
- BOYLE, C. D.. Nutritional factors limiting the growth of *Lentinula edodes* and other white-rot fungi in wood. *Soil Biology and Biochemistry*, v.30, n.6, p.817-823, 1998
- BOYLE, C.D.; KROPP, B. R.. Development and comparison of methods for measuring growth of filamentous fungi on wood. *Canadian Journal of Microbiology*, v.38, p.1053-1060, 1992.
- BURGI, R. *Produção de cana de açúcar auto-hidrolisado e avaliação do seu teor nutritivo para ruminantes*. Piracicaba, 1985. Dissertação (Mestrado em Nutrição Animal e Pastagem) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- BUSWELL, J. A.; ODIER, E.. Lignin biodegradation. *C.R.C Critical Reviews in Biotechnology*, v.6, p.1-60, 1987.
- BUSWELL, J.A.. Fungal degradation of lignin. In: ARORA, D.K., BHARAT, R., MUKERJI, K.G., KNUDSEN, G.. *Handbook of applied mycology*. volume 1: Soil and plants. New York: Marcel Dekker Inc., 1991. p.425-480
- CAMPBELL, A. C.; SLEE, R. W.. Commercial cultivation of shiitake in Taiwan and Japan. *Mushroom Journal Tropical*, n. 7, p. 127-134, 1987.
- CAPELARI, M.. Atividade biodegradadora e cultivo de três espécies comestíveis de basidiomicetos: *Pleurotus* spp e *Agrocybe perfecta* (Rick) Sing. São Paulo, 1996. Tese (Doutorado em Botânica) - Instituto de Biociências - Universidade de São Paulo.
- CARLILE, M. J.. The succes of the hypha and mycelium. In: GOW, N.A.R., GADD, G.M.. *The growing fungus*. London: Chapman & Hall, 1994. p.3-19.
- CHANG, S. T.; KWAN, H. S.; KANG, Y. N.. Collection, characterization, and utilization of germ plasm of *Lentinula edodes*. *Canadian Journal Botanical*, v.73, n.1, p.955-965, 1996.
- COCHARAN, K. W.. Medicinal effects. In: CHANG, S.T., HAYES, W.A.. *The biology and cultivation of edible mushrooms*. New York: Academic Press, 1978. p.169-87.
- DERIKX, P. J. L.; CAMP, H. J. M. O.; WAGNER, A. M.; STRAATSMA, G.; VANGRIENSVEN L. J. L. D.; VOGELS, G. D.. Respiratory pathways in *Agaricus*

- bisporus* and *Scytalidium thermophilum*. *FEMS Microbiology Letters*, v.66, p.307-312, 1990
- DICKINSON, C.H., BOTTOMLEY, D.. Germination and growth of *Alternaria* and *Cladosporium* in relation to their activity in the phylloplane. *Transactions of the British Mycological Society*, v.74, p. 309-319, 1980.
- DIX, J.N., WEBSTER, J.. The mycelium and substrates for growth. In: *Fungal Ecology*. London: Chapman & Hall, 1995. p. 12-26.
- DONOGHUE, J.D., DENISON, W.C.. Shiitake cultivation: gas phase during incubation influences productivity. *Mycologia*, v.87, n.2, p.239-44, 1995
- EDWARDS, C.. The significance of *in situ* activity on the efficiency of monitoring methods. In: EDWARDS, C.. *Monitoring genetically microorganisms in the environment*. Chichester: Wiley, 1993. p.1-25.
- EIRA, A.F., MARINO, R.H., ICHIDA, M.S.. Produção de inoculantes. In: EIRA, A.F., MINHONI, M.T.A.. *Manual teórico prático do cultivo de cogumelos comestíveis*. 2.ed. Botucatu: Fundação de Pesquisa Agro-pecuária e Florestais, 1997. p.20-33.
- EIRA, A.F., MINHONI, M.T.A.. *Cultivo de cogumelos comestíveis*. Botucatu: Curso Elo, Instituto de Economia Associativa, 1996. 68p.
- FASIDI, I.O., KADIRI, M.. Use of agricultural wastes for the cultivation of *Lentinus submundus* (Polyporales: Polyporaceae) in Nigeria. *Revista de Biologia Tropical*, v.41, n.3, p.411-5, 1993.
- FREER, S.N., DETROY, R.W.. Biological delignification of <sup>14</sup>C-labelled lignocelluloses by basidiomycetes: degradation and solubilization of the lignin and cellulose components. *Mycologia*, v.74, p.943-951, 1982.
- GRIFFIN, D.H.. Growth. In: *Fungal Physiology*. 2<sup>a</sup> edição. New York: Wiley-Liss, 1994, 458p
- HAN, Y.H., YENG, W.T., CHEN, L.C., CHANG, S.. Physiology and ecology of *Lentinus edodes* (Berk) *Mushroom Science*, v.11, p.623-658, 1981.
- JEFFRIES, T.W., CHOI, S., KIRK, T.K.. Nutritional regulation of lignin degradation by *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology*, v.42, p.290-296, 1981.
- KAMRA, D.N., ZADRAZIL, F.. Microbiological improvement of lignocellulosics in animal feed production. A review. In: ZADRAZIL, F. & REINIGER, P.. *Treatment of lignocellulosics with white-rot fungi*. London: Elsevier Applied Science, 1988. p.56-63.

- KIRK, T.K., CONNORS, W.J., ZEIKUS, J.G.. Requirement of a growth substrate during lignin degradation by two wood rotting fungi. *Applied and Environmental Microbiology*, v.32, p.192-196, 1976.
- KIRK, T.K., FARRELL, R.L. Enzymatic "combustion": The microbial degradation of lignin. *Annual Review of Microbiology*, v.41, p.465-505, 1987.
- KLEIN, K. K.. Pattern formation and development of the fungal mycelium. In: CHIU, S.; MOORE, D. *Patterns ins fungal development*. Cambridge: Cambridge University Press, 1996. p.70-86.
- KOCH, A. L.. The kinetics of mycelial growth. *Journal of General Microbiology*, v.89, p.209-216, 1975.
- KURTZMAN, J.R., ZADRAZIL, F.. Physiological and taxonomic considerations for cultivation of *Pleurotus* mushrooms. In: CHANG, S.T., QUIMIO, T.H.. *Tropical mushrooms - biological nature and cultivation methods*. Hong Kong: The Chinese University Press, 1982. 493p.
- LACAZ, C. S.; MINAMI, P. S. & PURCHIO, A. *O grande mundo dos fungos*. São Paulo, USP/ Polígono. 1970.
- LEATHAM, G. F., STAHMANN, M. A.. Effect of lighth and aeration on fruiting of *Lentinula edodes*. *Transactions British Mycological Society*, v.88, n.1, p.9-20, 1987.
- LEATHAM, G.F., KIRK, T.K. Regulation of ligninolytic activity by nutrient nitrogen in white-rot basidiomycetes. *FEMS Microbiology Letters*, v.16, p.65-67, 1983.
- LEATHAN, G. F.. Cultivation of shiitake, the japanese forest mushroom, on logs: a potencial industry for the United States. *Forest Products Journal*, Madison, v. 32, n.8, p. 29-35, 1982.
- MATA, G., SAVOIE, J.M.. Extracellular enzyme activities in six *Lentinula edodes* strains during cultivation in wheat straw. *Wourld Journal of Microbiology & Biotecnology*, v.14, p.513-519, 1998.
- MAZIERO, R.. *Substratos alternativos para o cultivo de Pleurotus spp.* São Paulo, 1990. 136p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas na Área de Botânica) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo.
- MOYSON, E., VERACHTERT, H.. Growth of higher fungi on wheat straw and their impact on the digestibility of the substrate. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.36, p.421-4, 1991.

- OKEKE, B.C. et al.. The relationship between phenol oxidase activity, soluble protein and ergosterol with growth of *Lentinus* species in oak sawdust logs. *Applied Microbiology Biotechnology*, v.41, p.28-31, 1994.
- PROSSER, J. I.. Kinetics of filamentous growth and branching. In: GOW, A. R., GADD, G.M.. *The growing fungus*. London: Chapman & Hall, 1994. p.301-335.
- PRZYBYLOWICZ, P.; DONOGHUE, J.. *Shiitake growers handbook: the art and science of mushroom cultivation*. Iowa: Kendall/Hunt, 1988. 217p.
- RAJARATHNAM, S.; BANO, Z. Pleurotus mushrooms, part1 A. Morphology, life cycle, taxonomy, breeding and cultivation. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. Boca Raton, v 26, n. 2, 157-223, 1987.
- REID, I. D.. Effects of nitrogen supplements on degradation of aspen wood lignin and carbohydrate components by *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology*, v.45, p830-837, 1983.
- REID, I. D.. Solid state fermentations for biological delignification. *Enzyme and Microbial Technology*, v.11, p.786-803, 1989.
- ROSSI, I.R.. *Suplementação de bagaço de cana-de-açúcar para cultivo axênico do cogumelo shiitake [*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler]*. Jaboticabal, 1999. 129p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Microbiologia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista.
- ROYSE, D. J.. Effect of sawdust run time and substrate nutrition on yield and size of the shiitake mushroom. *Mycologia*, v.77, p.756-762, 1985.
- SINGH, T.G., VERMA, R.N.. Studies on carbon and nitrogen of *Lentinula lateritia* (Berk.) Pegler strains from northeastern India. In: INTERNATIONAL CONFERENCE MUSHROOM BIOLOGY AND MUSHROOM PRODUCTS, 1996, Pennsylvania. *Proceedings...* Pennsylvania, 1996. p.345-54.
- SONG, C.H., CHO, K.Y., NAIR, N.J.. A synthetic medium for the production of submerged cultures of *Lentinus edodes*. *Mycologia*, v.79, n.6, p.866-76, 1987.
- SONG, C.H.. Growth stimulation and lipid synthesis in *Lentinus edodes*. *Mycologia*, v.81, n.4, p.514-22, 1989.
- STANIER, R.Y., DOUDOROFF, M., ADELBERG, E. A.. *O mundo dos micróbios*. 2<sup>a</sup> ed. São Paulo: Editora Edgard Blücher; 1969. 741p.
- STRAATSMA, G. et al. Growth kinetics of *Agaricus bisporus* mycelium on solid substrate (mushroom compost). *Journal of General Microbiology*, v.137, p.1471-1477, 1991.

- STURION, G. L.. *Utilização da folha de bananeira como substrato para o cultivo de cogumelos comestíveis (Pleurotus spp)*. Piracicaba, 1994, 147p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Microbiologia), Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo.
- TEIXEIRA, E. M.. *Efeito da suplementação de serragem de Eucaliptus grandis (Hill ex Maiden), na velocidade e intensidade de colonização do substrato para produção de "Semente" de Lentinula edodes (Berk.) Pegler e sua eficiência na produtividade*. Jaboticabal, 1996. 37p. Dissertação (Mestrado em Produção e Tecnologia de Sementes) Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista.
- TOKIMOTO, K. KAWAI, A.. Nutritional aspects on fruit-body development in replacement culture of *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. *Reports Tottori Mycological Institute*, v.12, p.25-30, 1975.
- TRINCI, A.P.J.. A study of the kinetics of hyphal extension and branch initiation of fungal mycelia. *Journal of General Microbiology*, v.81, p.225-226, 1974.
- WORRAL, J. J.; YANG, C. S.. Shiitake and oyster mushroom production on apple pomace and sawdust. *HortScience*, v.27, n.10, p.1131-3, 1992.
- ZADRAZIL, F., BRUNNERT, H.. The influence of ammonium nitrate supplementation on degradation and *in vitro* digestibility of straw colonized by higher fungi. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, v.9, p.37-44, 1980.

## APÊNDICE

Quadro 28 - Velocidades instantâneas de L17, nos vários meios de cultura ( $\text{cm}^2\text{dia}^{-1}$ ).

DIA	S0%,S10%,B10% e B20%*	S20%	B0%
3	3,43	1,89	2,00
5	3,59	3,12	2,38
6	3,67	4,02	2,60
7	3,75	5,17	2,84
8	3,84	6,65	3,10
10	4,01	11,01	3,69
11	4,11		4,03
13	4,30		4,80
14	4,39		

\*Tratamentos que não apresentaram diferença estatística, ao nível de 5% de significância, pelo teste de Student-Newman-Kills (SNK) e de Mann-Whitney

Quadro 29 - Velocidades instantâneas de L55, nos vários meios de cultura ( $\text{cm}^2\text{dia}^{-1}$ ).

Dias	S0%	S10%	S20%	B0%	B10%	B20%
3	2,14	1,88	2,60	1,92	3,52	3,95
5	2,69	3,09	3,76	2,91	4,43	4,74
6	3,02	3,96	4,51	3,58	4,98	5,19
7	3,38	5,08	5,42	4,41	5,59	5,69
8	3,79	6,51	6,51	5,42	6,27	6,23
10	4,77	10,70	9,40	8,21	7,90	7,48
11	5,35					
13	6,73					

Quadro 30 - Velocidades instantâneas de L17 em meio de cultura a base de serragem, com vários níveis de nitrogênio ( $\text{cm}^2\text{dia}^{-1}$ ).

Dias	S0%	S10%	S20%
3	1,32	2,06	1,89
5	1,84	3,18	3,12
6	2,17	3,94	4,02
7	2,55	4,89	5,17
8	3,01	6,07	6,65
10	4,17	9,35	11,01
11	4,91		
13	6,82		
14	8,03		

Quadro 31 - Velocidades instantâneas de L17, em meio de cultura a base de bagaço de cana-de-açúcar, com vários níveis de farelos ( $\text{cm}^2\text{dia}^{-1}$ ).

Dias	B0%	B10% e B20%*
3	2,00	2,13
5	2,38	3,23
6	2,60	3,98
7	2,84	4,89
8	3,10	6,02
10	3,69	9,12
11	4,03	
13	4,80	

\*Tratamentos que não apresentaram diferença estatística, ao nível de 5% de significância pelo teste de Student-Newman-Kills (SNK) e de Mann-Whitney.

Quadro 32 - Velocidades instantâneas de L55 em meio de cultura a base de serragem, com vários níveis de farelo ( $\text{cm}^2\text{dia}^{-1}$ ).

Dias	S0%	S10%	S20%
3	2,14	1,88	2,60
5	2,69	3,09	3,76
6	3,02	3,96	4,51
7	3,38	5,08	5,42
8	3,79	6,51	6,51
10	4,77	10,70	9,40
11	5,35		
13	6,73		

Quadro 33 - Velocidades instantâneas de L17, em meio de cultura a base de bagaço de cana-de-açúcar, com vários níveis de farelo ( $\text{cm}^2\text{dia}^{-1}$ ).

DIA	B0%	B10% e B20%*
3	1,92	3,73
5	2,91	4,59
6	3,58	5,09
7	4,41	5,64
8	5,42	6,25
10	8,21	7,68

\*Tratamentos que não apresentaram diferença estatística, ao nível de 5% de significância pelo teste de Student-Newman-Kills (SNK) e de Mann-Whitney.

Quadro 34 - Velocidades instantâneas de L17, no nível 0% de adição de farelo, em meio de serragem e bagaço de cana-de-açúcar ( $\text{cm}^2\text{dia}^{-1}$ ).

Dias	S0%	B0%
3	1,32	2,00
5	1,84	2,38
6	2,17	2,60
7	2,55	2,84
8	3,01	3,10
10	4,17	3,69
11	4,91	4,03
13	6,82	4,80
14	8,03	

Quadro 35 - Velocidades instantâneas de L17, no nível 10% de adição de farelo, em meio de serragem e bagaço de cana-de-açúcar ( $\text{cm}^2\text{dia}^{-1}$ ).

Dias	S10%-B10%
3	2,01
5	3,06
6	3,78
7	4,67
8	5,76
10	8,77

\*Tratamentos que não apresentaram diferença estatística, ao nível de 5% de significância pelo teste de Student-Newman-Kills (SNK) e de Mann-Whitney.

Quadro 36 - Velocidades instantâneas de L17, no nível 20% de adição de farelo, em meio de serragem e bagaço de cana-de-açúcar ( $\text{cm}^2\text{dia}^{-1}$ ).

Dias	S20%	B20%
3	1,89	2,31
5	3,12	3,51
6	4,02	4,33
7	5,17	5,34
8	6,65	6,59
10	11,01	10,03

Quadro 37 - Velocidades instantâneas de L55, no nível 0% de adição de farelo, em meio de serragem e bagaço de cana-de-açúcar ( $\text{cm}^2\text{dia}^{-1}$ ).

Dias	S0%	B0%
3	2,14	1,92
5	2,69	2,91
6	3,02	3,58
7	3,38	4,41
8	3,79	5,42
10	4,77	8,21
11	5,35	
13	6,73	

Quadro 38 - Velocidades instantâneas de L55, no nível 10% de adição de farelo, em meio de serragem e bagaço de cana-de-açúcar ( $\text{cm}^2\text{dia}^{-1}$ ).

Dias	S10%	B10%
3	1,88	3,52
5	3,09	4,43
6	3,96	4,98
7	5,08	5,59
8	6,51	6,27
10	10,70	7,90

Quadro 39 - Velocidades instantâneas de L55, no nível 20% de adição de farelo, em meio de serragem e bagaço de cana-de-açúcar ( $\text{cm}^2\text{dia}^{-1}$ ).

Dias	S20%	B20%
3	2,60	3,95
5	3,76	4,74
6	4,51	5,19
7	5,42	5,69
8	6,51	6,23
10	9,40	7,48

Quadro 40 – Velocidades instantâneas de L17, nos vários substratos ( $\text{cm}^3\text{dia}^{-1}$ ).

Dias	S0%	S20%	S10% e B10%*	B0% e B20%*
3	1,86	1,16	1,25	2,72
5	0,51	0,45	0,41	0,52
6	0,39	0,36	0,32	0,38
7	0,32	0,31	0,27	0,32
8	0,28	0,29	0,25	0,27
10	0,24	0,27	0,22	0,23
11	0,22	0,27	0,21	0,22
13	0,21	0,30	0,22	0,21
14	0,21	0,34	0,23	0,21
16	0,21	0,53	0,28	0,23
18	0,24		0,42	0,27
19	0,26			0,30
21	0,33			

\*Tratamentos que não apresentaram diferença estatística, ao nível de 5% de significância pelo teste de Student-Newman-Kills (SNK) e de Mann-Whitney.

Quadro 41 – Velocidades instantâneas de L55, nos vários substratos ( $\text{cm}^3\text{dia}^{-1}$ ).

	S20% e B0%*	B20%	B10%	S10%	S0%
3	0,73	1,02	1,23	1,68	1,48
5	0,50	0,39	0,43	0,49	0,43
6	0,43	0,31	0,35	0,39	0,34
7	0,38	0,27	0,30	0,34	0,29
8	0,34	0,24	0,26	0,32	0,26
10	0,28	0,21	0,24	0,32	0,24
11	0,26	0,21	0,23	0,34	0,24
13	0,22	0,22	0,24	0,48	0,28
14	0,21	0,23	0,25	0,69	0,31
16	0,19	0,28	0,31		0,52
18	0,17	0,43	0,49		

\*Tratamentos que não apresentaram diferença estatística, ao nível de 5% de significância pelo teste de Student-Newman-Kills (SNK) e de Mann-Whitney.

Quadro 42 - Velocidades instantâneas de L17 em substrato a base de serragem, com vários níveis de farelo ( $\text{cm}^3\text{dia}^{-1}$ ).

Dias	S0%	S10%	S20%
3	1,86	1,23	1,16
5	0,51	0,37	0,45
6	0,39	0,29	0,36
7	0,32	0,25	0,31
8	0,28	0,22	0,29
10	0,24	0,20	0,27
11	0,22	0,19	0,27
13	0,21	0,20	0,30
14	0,21	0,21	0,34
16	0,21	0,26	0,53
18	0,24	0,41	
19	0,26		
21	0,33		

Quadro 43 - Velocidades instantâneas de L55 em substrato a base de serragem, com vários níveis de farelo ( $\text{cm}^3\text{dia}^{-1}$ ).

Dias	S0%	S10%	S20%
3	1,48	1,68	1,17
5	0,43	0,49	0,45
6	0,34	0,39	0,37
7	0,29	0,34	0,33
8	0,26	0,32	0,31
10	0,24	0,32	0,31
11	0,24	0,34	0,33
13	0,28	0,48	0,44
14	0,31	0,69	0,59
16	0,52		

Quadro 44 - Velocidades instantâneas de L17 em substrato a base de bagaço de cana-de-açúcar, com vários níveis de farelo ( $\text{cm}^3\text{dia}^{-1}$ ).

Dias	B0%	B10% e B20%*
3	5,29	1,60
5	0,48	0,47
6	0,35	0,37
7	0,28	0,31
8	0,24	0,27
10	0,20	0,24
11	0,19	0,23
13	0,19	0,23
14	0,19	0,24
16	0,21	0,28
18	0,26	0,39
19	0,31	
21	0,61	

\*Tratamentos que não apresentaram diferença estatística, ao nível de 5% de significância pelo teste de Student-Newman-Kills (SNK) e de Mann-Whitney.

Quadro 45 - Velocidades instantâneas de L55 em substrato a base de bagaço de cana-de-açúcar, com vários níveis de farelo ( $\text{cm}^3\text{dia}^{-1}$ ).

Dias	B10%	B0% e B20%*
3	1,23	0,96
5	0,43	0,42
6	0,35	0,34
7	0,30	0,30
8	0,26	0,27
10	0,24	0,24
11	0,23	0,23
13	0,24	0,24
14	0,25	0,25
16	0,31	0,28
18	0,49	0,38

\*Tratamentos que não apresentaram diferença estatística, ao nível de 5% de significância pelo teste de Student-Newman-Kills (SNK) e de Mann-Whitney.

Quadro 46 - Velocidades instantâneas de L17, no nível 0% de adição de farelo, em substratos de serragem e bagaço de cana-de-açúcar ( $\text{cm}^3 \text{dia}^{-1}$ ).

Dias	S0%	B0%
3	1,86	5,29
5	0,51	0,48
6	0,39	0,35
7	0,32	0,28
8	0,28	0,24
10	0,24	0,20
11	0,22	0,19
13	0,21	0,19
14	0,21	0,19
16	0,21	0,21
18	0,24	0,26
19	0,26	0,31
21	0,33	0,61

Quadro 47 - Velocidades instantâneas de L17, no nível 10% de adição de farelo, em substratos de serragem e bagaço de cana-de-açúcar ( $\text{cm}^3 \text{dia}^{-1}$ ).

Dias	S10% e B10%*
3	1,25
5	0,41
6	0,32
7	0,27
8	0,25
10	0,22
11	0,21
13	0,22
14	0,23
16	0,28
18	0,42
19	
21	

\*Tratamentos que não apresentaram diferença estatística, ao nível de 5% de significância pelo teste de Student-Newman-Kills (SNK) e de Mann-Whitney.

Quadro 48 - Velocidades instantâneas de L17, no nível 20% de adição de farelo, em substratos de serragem e bagaço de cana-de-açúcar ( $\text{cm}^3 \text{dia}^{-1}$ ).

Dias	S20%	B20%
3	1,16	2,10
5	0,45	0,48
6	0,36	0,37
7	0,31	0,31
8	0,29	0,27
10	0,27	0,24
11	0,27	0,23
13	0,30	0,23
14	0,34	0,24
16	0,53	0,28
18		0,40
19		0,55
21		

Quadro 49 - Velocidades instantâneas de L55, no nível 0% de adição de farelo, em substratos de serragem e bagaço de cana-de-açúcar ( $\text{cm}^3 \text{dia}^{-1}$ ).

Dias	S0%	B0%
3	1,48	0,92
5	0,43	0,46
6	0,34	0,38
7	0,29	0,33
8	0,26	0,30
10	0,24	0,27
11	0,24	0,26
13	0,28	0,26
14	0,31	0,26
16	0,52	0,29
18		0,35

Quadro 50 - Velocidades instantâneas de L55, no nível 10% de adição de farelo, em substratos de serragem e bagaço de cana-de-açúcar ( $\text{cm}^3 \text{dia}^{-1}$ ).

Dias	S10%	B10%
3	1,68	1,23
5	0,49	0,43
6	0,39	0,35
7	0,34	0,30
8	0,32	0,26
10	0,32	0,24
11	0,34	0,23
13	0,48	0,24
14	0,69	0,25
16		0,31
18		0,49

Quadro 51 - Velocidades instantâneas de L55, no nível 20% de adição de farelo, em substratos de serragem e bagaço de cana-de-açúcar ( $\text{cm}^3 \text{dia}^{-1}$ ).

Dias	S20% e B20%*
3	0,76
5	0,47
6	0,40
7	0,34
8	0,31
10	0,26
11	0,24
13	0,21
14	0,20

\*Tratamentos que não apresentaram diferença estatística, ao nível de 5% de significância pelo teste de Student-Newman-Kills (SNK) e de Mann-Whitney.