

INSTITUTO FEDERAL

São Paulo

Câmpus São Roque

Edital nº 34/2023

**Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica e
Tecnológica do Instituto Federal de São Paulo**

RELATÓRIO FINAL

2º SEMESTRE DE 2024

PARTE 1 - DADOS DO PROJETO

1. Título:

Testagem de diferentes substratos para crescimento de *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) Kummer (Fungi, Basidiomycota, Pleurotaceae)

2. Nome do estudante bolsista:

Luca Nalini Bortolato Dalessandro

3. Nome do orientador:

Prof. Dr. Fernando Santiago dos Santos

4. Período de abrangência deste relatório:

Agosto a novembro de 2024

PARTE 2 - RELATÓRIO DE ATIVIDADES

1. INTRODUÇÃO

Os fungos, atualmente pertencentes ao Reino Fungi, constituem uma ampla gama de seres vivos, desde organismos microscópicos, como leveduras, até macroscópicos, como os cogumelos (Alexopoulos; Mims; Blackwell, 1996).

O registro mais antigo desse conjunto de organismos pertence à era Neoproterozoica, 300 milhões de anos antes da flora terrestre (Figura 1), sendo identificados por conta de se tratar de microfilitamentos revestidos de quitina (Bonneville *et al.*, 2020).

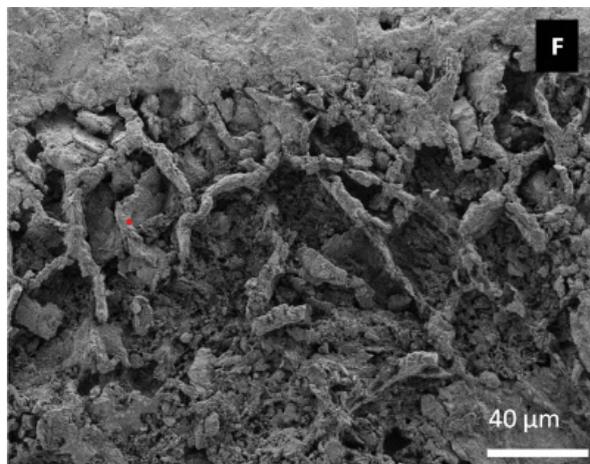


Figura 1. Filamentos de fungos fossilizados visíveis no xisto, encontrados na República Democrática do Congo (Bonneville *et al.*, 2020).

Os fungos desempenham papel fundamental e de extrema importância em todos os biomas terrestres, pois constituem fonte de alimento para mamíferos e insetos, e atuam na decomposição da matéria orgânica gerada (Raven; Evert; Eichhorn, 2001). Fungos são organismos heterotróficos, alimentando-se por absorção e quebrando substâncias complexas em componentes mais simples sendo, portanto, organismos-chave para a reciclagem de nutrientes nos ecossistemas (Kirk *et al.*, 2008). Além disso, muitos fungos formam associações simbióticas com plantas, como as micorrizas, beneficiando ambas as partes. Essas associações benéficas desempenham um papel vital ao auxiliar as plantas na absorção de nutrientes do solo, ao passo que os fungos recebem carboidratos em contrapartida. No entanto, alguns fungos também podem ser patogênicos, causando doenças em plantas, animais e seres humanos, tais como micoses em seres humanos e algumas infecções em animais (Hibbet; Binder; Bischoff, 2007).

O Reino Fungi é subdividido em vários grupos, entre os quais Ascomycota, Basidiomycota e Zygomycota, entre outros (Figura 2).



Figura 2. Cladograma atualizado com os diferentes grupos de fungos (Tolweb, 2023).

O grupo Basidiomycota (basidiomicetos), em que está inserido o shimeji, tem cerca de 40 mil espécies descritas (He, 2022). De acordo com Tolweb (2023), este grupo está dividido em três classes: a) Agaricomycetes, que inclui todos os fungos que produzem basidioma, como todos os cogumelos, os ninhos de pássaro (*Cyathus* spp), orelhas de judeu (*Auricularia* spp) e orelhas-de-pau (*Trametes* spp, *Ganoderma* spp etc.); b) Teliomycetes (vários gêneros de fungos fitopatogênicos); c) Ustilaginomycetes, que não formam basidioma mas sim, Soros que são esporos em aglomerados; tais fungos são, obrigatoriamente, parasitas de insetos e plantas. Nestes grupos estão as temidas ferrugens e os carvões das lavouras. Na Figura 3, as linhas tracejadas indicam que o grupo pode não ser monofilético, enquanto a interrogação indica uma posição taxonômica incerta.

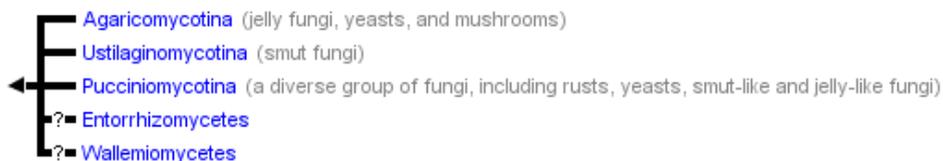


Figura 3. Cladograma atualizado com os diferentes grupos dos basidiomicetos (Tolweb, 2023).

O ciclo de vida típico do grupo começa com a germinação dos basidiósporos, formando um micélio primário haploide, composto por um conjunto de hifas de vida curta. Esses micélios se fundem através de fatores de compatibilidade, resultando na formação do micélio secundário dicariótico, que se dispersa pelo substrato. Em certo ponto, ocorre uma diferenciação desse micélio, originando o micélio terciário (momento em que se originam os basidiomas). Dentro do basídio, uma célula fértil presente no himênio sofre fusão dos núcleos seguida pela meiose, resultando em quatro núcleos haploides que se tornarão os basidiósporos, completando assim o ciclo.

Com o foco voltado para os afiloforoides (grupo em que se insere o shimeji) para discutir a pesquisa atual sobre esses fungos, temos um total de 47 famílias, 538 gêneros e 6.384 espécies documentadas globalmente. No contexto do Brasil,

dados de *checklists* registram 216 espécies na Amazônia, 95 no Cerrado, 733 na Mata Atlântica, 56 no Pantanal e 37 no Semi-Árido (Abrahão, 2010).

Os basidiomicetos apresentam uma ampla diversidade de formas e tamanhos. Para além de sua função essencial na decomposição de matéria orgânica e na colaboração simbiótica com as plantas, alguns basidiomicetos são valorizados na culinária e reconhecidos por suas propriedades medicinais (Carlile; Watkinson, 2001).

Basidiomicetos possuem diversas ordens taxonômicas e entre elas está a Ordem Agaricales (Figura 4). Nesta Ordem encontram-se muitas espécies conhecidas de cogumelos, tanto comestíveis quanto venenosos (Guerra *et al.*, 2011).

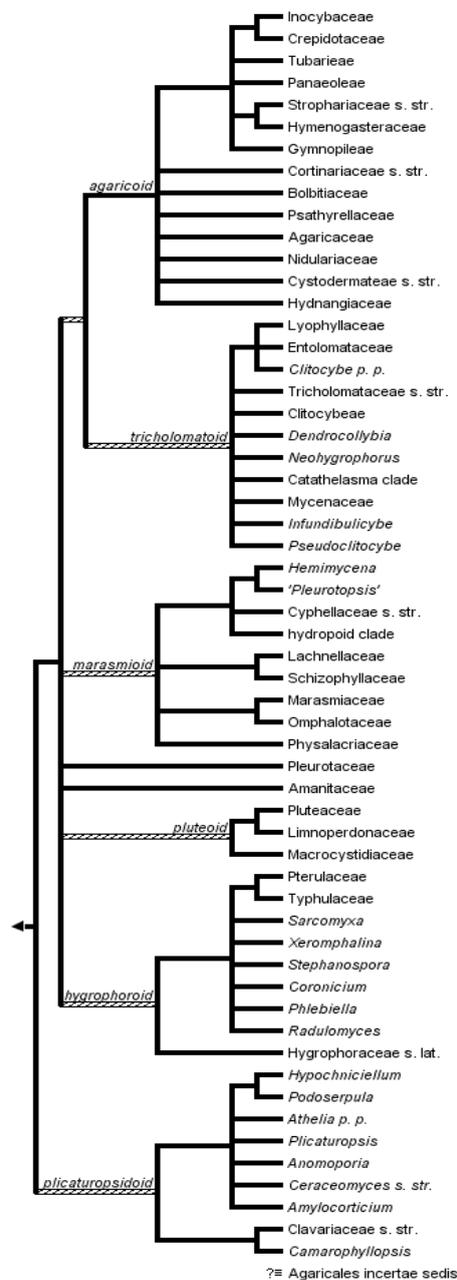


Figura 4. Cladograma atualizado com os diferentes grupos da ordem agaricales (Tolweb, 2023).

Estes fungos compartilham características morfológicas e reprodutivas, entre as quais: a) estruturas reprodutivas chamadas basidiocarpos, que geralmente têm uma estrutura lamelar sob o chapéu do cogumelo com lamelas que contêm basídios, os quais liberam esporos no ambiente, dando origem a novos indivíduos; b) O chapéu desses cogumelos é frequentemente em forma de guarda-chuva e pode variar em cor, textura e tamanho; c) A maioria dos fungos desta Ordem forma associações simbióticas com raízes de plantas (Song *et al.*, 2015). Esses fungos são capazes de decompor todos os polímeros vegetais conhecidos, utilizando seus mecanismos enzimáticos complexos, podendo crescer não apenas em madeira, mas madeira podre, fezes e serrapilheiras também (Ruiz-Dueñas *et al.*, 2021).

Entre os Agaricales há uma família, Pleurotaceae, em que se classifica o shimeji, *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) Kummer, foco desta pesquisa. Os *P. ostreatus* começaram a ser cultivados na Alemanha durante a Primeira Guerra Mundial, por serem cogumelos bastante adaptáveis a diferentes condições ambientais. Isso inclui uma ampla faixa de temperatura e umidade, tornando-os mais fáceis de cultivar em diferentes regiões e ambientes. *P. ostreatus* é conhecido por sua capacidade de crescer em uma variedade de substratos lignocelulósicos, como resíduos agrícolas, serragem, palha e até mesmo em jornais, sendo assim uma boa alternativa em uma época onde a comida era escassa. Seu primeiro registro sendo cultivado foi por Kaufert (Bononi; Trufem; Grandi, 1981; Sharma *et al.*, 2013; Kaufert *et al.*, 1936).

Tanto o nome científico quanto o nome comum se referem à forma do corpo de frutificação. O latim *Pleurotus* (de lado) refere-se ao crescimento lateral do caule em relação ao chapéu, enquanto o latim *ostreatus*, refere-se à forma do chapéu, que se assemelha à concha de mesmo nome. *P. ostreatus* tem um chapéu largo, em forma de leque ou de ostra, com uma envergadura de 5 a 25 cm. Espécimes naturais variam de branco a cinza ou marrom-claro a marrom-escuro (Hassen *et al.*, 2011).

Os representantes do gênero *Pleurotus* são conhecidos por incluir espécies comestíveis, de sabor suave e textura carnuda, sendo populares em muitas culinárias ao redor do mundo. Alguns estudos sugeriram que os cogumelos desse gênero podem ter propriedades medicinais, tais como antitumorais, antioxidantes e imunomoduladoras, por conta de bioativos tais como terpenos esteroides, fenóis, alcaloides e lecitinas (descobertos após serem isolados e identificados no corpo de frutificação, micélio e até mesmo no substrato após o cultivo). Adicionalmente, são alimentos nutritivos (Tabela 1), contendo quantidades significativas de proteínas, lipídios, carboidratos, vitaminas e minerais, porém com baixa quantidade de calorias e gorduras (Guerrero; Homrich, 1999; Lindequist *et al.*, 2005).

Tabela 1. Macronutrientes do *P. ostreatus* (traduzido de Khan, 2010).

Nutrientes	Quantidade (g/100g cogumelo seco)
Proteínas	17-42
Carboidratos	37-48
Lipídios	0.5-5
Fibras	24-31
Minerais	4-10

Esses cogumelos possuem uma ótima quantidade de proteínas tanto das essências (Tabela 2) assim como várias novas como lectinas, enzimas lignocelulolíticas, inibidores de proteases e hidrofobinas. Eles vêm sendo estudados como soluções para diversos problemas medicinais e biotecnológicos, como resistência a medicamentos microbianos, baixo rendimento de culturas e demanda por energia renovável. A produção em larga escala e a aplicação industrial de algumas proteínas fúngicas demonstram seu potencial biotecnológico e estabelecem os fungos como uma fonte valiosa, embora relativamente pouco explorada, de proteínas únicas (Jana Erjavec *et al.*, 2012).

Tabela 2. Composição de aminoácidos do *P. ostreatus* (traduzido de Wang *et al.*, 2001).

Aminoácidos	Quantidade (g/100g cogumelo seco)
Ácido aspártico	31.4
Treonina*	17.1
Serina	18.1
Ácido Glutâmico	53.3
Glicina	17.1
Alanina	28.6
Valina*	21.0
Cisteína	3.8
Metionina*	3.8
Isoleucina*	16.2
Leucina	25.7
Tirosina	13.3
Fenilalanina*	15.2
Lisina*	22.9
Histidina	12.4
Arginina	27.6
Triptofano*	4.8
Prolina	15.2
Total de aminoácidos essenciais	126.7
Total de aminoácidos	347.5

*Aminoácidos essenciais

P. ostreatus é o segundo cogumelo mais cultivado do mundo, ficando atrás apenas de *Agaricus bisporus*, conhecido como champignon (Sánchez, 2010).

O shimeji (Figura 5) tem como domínio fitogeográfico no Brasil a Floresta Amazônica e a Mata Atlântica (Capelari *et al.*, 2015).



Figura 5. Vista de alguns corpos de frutificação de shimeji. Fonte da imagem: <<https://www.papillesetpupilles.fr/2016/05/shimeji.html/>> . Acesso em: 08 dez. 2023.

Dentre as inúmeras variedades de *P. ostreatus*, foi escolhida a variedade “pérola” para esta pesquisa por conta de seu acesso simples e sua cor facilmente observável em meio ao substrato (Zanetti; Ranal, 1996).

O cultivo de cogumelos comestíveis é um processo biotecnológico de reciclagem de resíduos orgânicos lignocelulósicos. Pode ser o único processo atual que combina a produção de alimentos ricos em proteínas com a redução da poluição ambiental (Beetz et al., 2004).

O sucesso no cultivo de cogumelos do tipo shimeji depende de alguns fatores, que exigem o domínio da técnica e a escolha das instalações adequadas para o cultivo. Estes fatores podem ser divididos em nutricionais e ambientais, e interferem diretamente na qualidade e intensidade das frutificações. Os fatores nutricionais estão relacionados à composição do substrato, que será utilizado como fonte de crescimento e desenvolvimento dos cogumelos. Este é um fator fundamental, pois os substratos devem fornecer os nutrientes em quantidades adequadas, já que o excesso ou a escassez de nutrientes geram frutificações sem padrão comercial.

A composição do substrato pode representar uma das partes mais dispendiosas no processo produtivo, dependendo das escolhas feitas pelo produtor. Por sua vez, o equilíbrio nutricional é essencial, pois o substrato ideal deve fornecer adequadamente os nutrientes necessários, evitando tanto o excesso quanto a deficiência (ambos podem comprometer a produção de cogumelos). Substratos excessivamente ricos em nutrientes favorecem a proliferação de microrganismos contaminantes, competindo com os fungos comestíveis e tornando os cogumelos inadequados para consumo. Por outro lado, substratos demasiadamente pobres podem atrasar ou impedir o crescimento das espécies de shimeji inoculadas, resultando em prejuízos à produção (Shah; Ashraf; Ishtiaq, 2004).

O substrato, após o cultivo dos cogumelos do tipo *Pleurotus*, pode ser usado como fertilizante e condicionador de solos, viabilizando a nutrição de plantas. E, também, os resíduos fermentados após o plantio podem ser usados como alimento para alguns animais (Brenneman *et al.*, 1994; Soto-Cruz *et al.*, 1994).

Foi criado em 1980 na China a técnica chamada Jung-cao, que significa respectivamente cogumelo e gramínea, onde revolucionou a forma que eram cultivados os cogumelos. Anteriormente, eram usadas árvores e seus resíduos para o cultivo, atrapalhando o balanço ecológico das florestas, assim os chineses foram atrás de diferentes substratos como palha de arroz, folha de bananeira, semente de algodão, entre outros vegetais. Inicialmente Prof. Lin, criador da técnica, se preocupou apenas em tirar metade da serragem e trocá-la por outros resíduos vegetais. Porém ao misturar gramíneas secas com outros resíduos vegetais, foi obtido resultados ainda melhores do que o cultivo a base de serragem e madeira. Por isso a técnica Jung-cao foi escolhida para complementar as testagens durante a pesquisa (Urban, 2004).

Este projeto deve fornecer subsídios para aumentar as chances de sucesso no cultivo de pequenos produtores.

O objetivo geral desta pesquisa foi comparar o desenvolvimento de shimeji em diferentes substratos orgânicos.

Os objetivos específicos foram:

- a. Cultivar shimeji em diferentes substratos orgânicos no interior de sacos de polietileno e em tubos de ensaio;
- b. Identificar em qual substrato o micélio de shimeji desenvolve-se mais rapidamente;
- c. Identificar em qual substrato os corpos de frutificação de shimeji formam-se mais rapidamente;
- d. Identificar em qual substrato as colônias de shimeji permanecem saudáveis por mais tempo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

A maneira mais eficiente atualmente para o plantio do shimeji inicia-se com a obtenção do micélio, que pode ser feita a partir de um pedaço do interior do píleo colocado em uma placa de petri ou algum outro meio de cultura para formação de uma colônia. Em seguida, será realizada a escolha e a mistura do substrato que será utilizado. Esse substrato deverá ser ensacado (de preferência em sacos de polietileno) e pasteurizado ou esterilizado em autoclave (recomenda-se esterilizar o substrato de cultivo a 121°C durante o período mínimo de 1 hora) para evitar o crescimento de outros organismos além do shimeji, obtendo maior produtividade. Após o resfriamento do substrato, será inoculado o micélio do shimeji (por meio do micélio já cultivado em placa de petri). Durante o processo de incubação, o substrato inoculado deve ficar em um lugar escuro, com temperatura em torno de 25°C a 30°C, umidade relativa por volta de 70% e sistema para remoção do ar viciado. Nessas condições, a miceliação completa do substrato leva de 20 a 45 dias. Após o substrato ser totalmente colonizado, será feita a etapa de frutificação onde

serão efetuados cortes nos recipientes para estimular a frutificação por meio do contato com o ar fresco. Nessa fase, o ambiente deve ser mantido com umidade relativa de 80% a 85%, luminosidade suficiente e temperatura a 5°C inferior à da sala de incubação. O ciclo total de cultivo é de aproximadamente 70 dias (Barbosa *et al.*, 2016).

2.1 Material coletado

Os seguintes cogumelos foram coletados e identificados dentro do campus (Figuras 6 e 7).



Figura 6. Visão superior do píleo de um indivíduo de *Macrolepiota procera* (Scop.) Singer da família Agaricaceae, crescendo na serrapilheira.



Figura 7. Visão superior do píleo de *Oudemansiella platensis* (Speg.) Speg. da família Physalacriaceae, crescendo em tronco morto.

2.2 Prints de esporos (esporadas)

Coletados os cogumelos, tanto dentro do campus IFSP-SRQ quanto em outros lugares ao redor da Mata de Transurb - Itapevi-SP (Figura 8), e desses cogumelos foram feitos *prints* de esporos em folha sulfite.



Figura 8. Vista de satélite da Mata de Transurb (coordenadas geográficas 23°35'39"S 46°59'46"W).
Fonte: GoogleEarth®, 2004.

Essa técnica consiste em remover o estirpe do cogumelo, e deixar apenas o píleo com himênio apontado para baixo. Em 24 horas, os esporos caem por ação da gravidade e são impressos na superfície da folha (Figuras 9 a 12).



Figura 9. Print de esporos de *Chlorophyllum molybdites* (G. Mey) Masee da família Agaricaceae, apresentando esporos verdes.



Figura 10. Print de esporos de um *Macrolepiota procera* (Scop.) Singer da família Agaricaceae, apresentando esporos de cor bege.



Figura 11. *Print* de esporos de *Oudemansiella platensis* (Speg.) Speg. da família Physalacriaceae, apresentando esporos brancos.



Figura 12. *Print* de esporos de um *Agaricus sylvaticus* Schaeff. da família Agaricaceae, apresentando esporos marrons escuros.

2.3 Material observado em microscopia

Foram feitas lâminas com os materiais coletados utilizando lâminas de vidro, lamínulas, água e azul de metileno (1%). Em seguida, o material foi visualizado em

MOC (microscópio óptico comum) e lupa estereomicroscópica (20x e 40x). As figuras 13 a 16 ilustram essas observações.



Figura 13. Vista microscópica de esporos brancos de *Oudemansiella platensis* (Speg.) Speg.

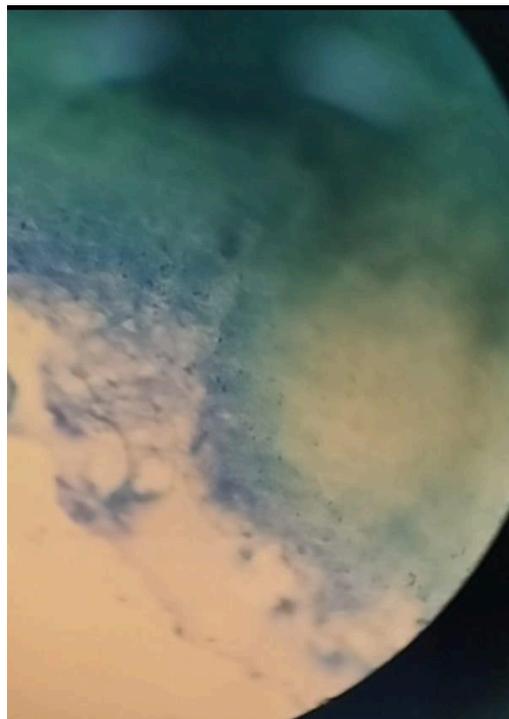


Figura 14. Vista microscópica de um micélio de *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) Kummer, tingido com azul de metileno.



Figura 15. Vista de *print* de esporos de *Chlorophyllum molybdites* (G. Mey) Masee, em lupa estereomicroscópica (40x).



Figura 16. Visão do himênio de *Oudemansiella platensis* (Speg.) Speg. em lupa estereomicroscópica (20x).

Além das lâminas já prontas do laminário referentes a fungos basidiomicetos e ascomicetos, também foi fotografada uma lâmina de *Puccinia graminis* Pers. em folha de trigo (Figura 17).



Figura 17. Visão microscópica de lâmina pronta.

Foi feito um levantamento bibliográfico a respeito dos fungos com enfoque em *Pleurotus ostreatus*. Parte das referências já aparecem neste relatório, e novas fontes de consulta poderão fazer parte do relatório final.

Foi utilizado o programa Reflora para coletar dados biogeográficos dos fungos estudados (acessível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/consulta/>>).

2.4 Preparo das placas de petri

Nesta seção, serão discutidas as práticas de preparo do material-matriz.

2.4.1 Cálculo do Volume de Água e Quantidade de Ágar

Foi calculado o volume de água necessário para a preparação do meio de cultura, utilizando 11,9 g de ágar para 425 mL de água, conforme indicado na embalagem do produto (Figura 18).

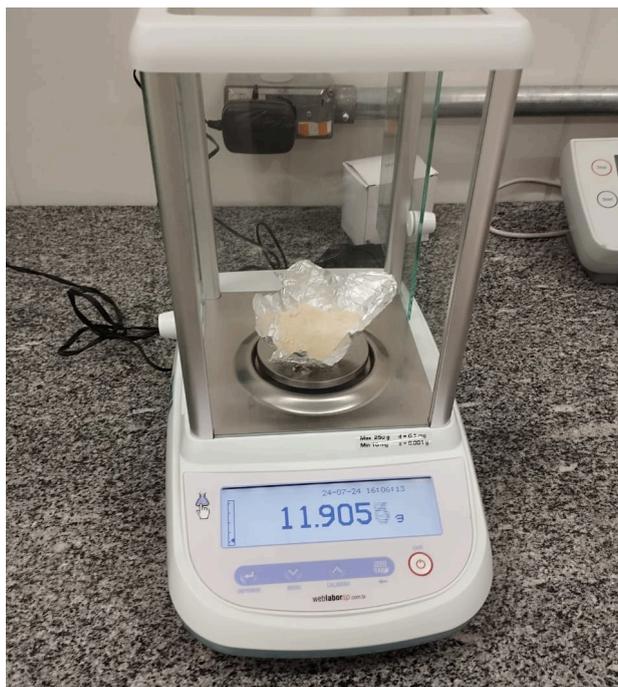


Figura 18. Pesagem da quantidade de ágar em pó em balança de precisão.

2.4.2 Preparação da Solução de Ágar

A quantidade de ágar foi transferida para um erlenmeyer contendo a água medida. A solução foi, então, aquecida até que o ágar estivesse completamente dissolvido (Figura 19).



Figura 19. Erlenmeyer sendo aquecido no bico de bunsen acima de uma placa de amianto.

2.4.3 Transferência e Medição

Após a dissolução, a solução foi transferida do erlenmeyer para um béquer, onde foi realizada a medição dos volumes de 45 mL e 2 L para as etapas subsequentes.

2.4.4 Distribuição em Tubos de Ensaio

A solução medida foi transferida para tubos de ensaio, os quais foram selados com papel kraft para evitar contaminação. Esses tubos foram colocados dentro de um béquer maior, também vedado com papel kraft (Figura 20).



Figura 20. Recipientes fechados prontos para a autoclavagem.

2.4.5 Esterilização

As placas de petri foram envolvidas em papel kraft e colocadas na autoclave juntamente com os tubos de ensaio. O papel kraft foi mantido até a transferência dentro da cabine de fluxo laminar (CFL), para garantir a esterilidade durante o transporte (Figura 21).



Figura 21. tubos de ensaio com ágar e o restante do ágar no Erlenmeyer dentro da autoclave.

2.4.6 Processo de Autoclavagem

A autoclave foi preparada e, após a saída de pressão constante, a válvula foi fechada. Quando o manômetro atingiu a marca de 1 atm, a chave de controle foi ajustada de “máximo” para “médio”, e o processo foi mantido por 15 minutos.

Após o término dos 15 minutos, a autoclave foi desligada e esperou-se que o manômetro retornasse a 0 antes de abrir o equipamento.

2.4.7 Preparo Final e Transferência

A cabine de fluxo laminar foi acionada e mantida sob luz ultravioleta por 15 a 30 minutos para garantir a esterilidade do ambiente.

Posteriormente, a solução de ágar foi transferida dos tubos de ensaio para as placas de petri, que já haviam sido esterilizadas. Esse procedimento foi realizado dentro da cabine de fluxo laminar para evitar contaminações (Figura 22).

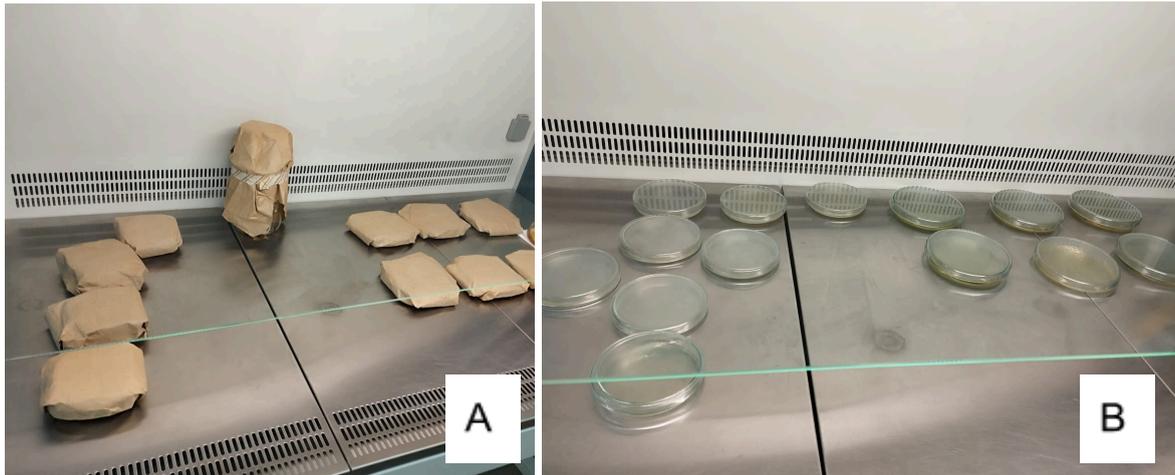


Figura 22. A) Recipientes selados e autoclavados, já dentro da CFL. B) placas de petri com o meio já solidificado.

2.5 Inoculação da placa de petri

A inoculação de shimeji em placas de petri com ágar foi realizada na CFL (Figura 23). Foram utilizados cogumelos frescos como fonte de tecido micelial, obtendo-se fragmentos retirados do interior do píleo, por serem mais ricos em micélio ativo.



Figura 23. Inoculação sendo feita dentro da CFL.

As placas de petri previamente preparadas com ágar nutriente esterilizada foram dispostas dentro da CFL. Os fragmentos do cogumelo foram cuidadosamente transferidos para as superfícies dos ágares com o auxílio de pinças esterilizadas e lâminas de bisturi.

Após a inoculação, as placas foram seladas com plástico filme para evitar contaminações secundárias, e incubadas em temperatura controlada de 25°C em ambiente escuro. O crescimento do micélio (Figura 24) começou a ser observado dentro de três a cinco dias.



Figura 24. Micélio de shimeji colonizando placa de ágar.

2.6 Preparo das sacas de substrato

O preparo das sacas foi realizado utilizando sacos de polipropileno autoclaváveis. Foram preparadas seis sacas com os seguintes substratos: feno puro, serragem pura, serragem com feno, serragem com palha de arroz, serragem com borra de café e serragem com fibra de coco. Cada saca continha 1 L do substrato, misturado previamente em um recipiente. Todos os substratos foram hidratados com aproximadamente $\frac{1}{3}$ do seu volume em água destilada, e depois amarrados para não ter contato com o ar (Figura 25).



Figura 25. Sacas contendo os substratos já hidratados.

Em seguida, todas as sacas foram esterilizadas na autoclave, diminuindo o risco de contaminação.

2.7 Inoculação dos substratos

Antes da inoculação ser realizada, as sacas e materiais como pinças e tubos de ensaio foram colocadas dentro da CFL e ficaram sob luz UV por 15 minutos. Em seguida, as placas de petri contendo a biomassa do fungo foram desinfetadas com álcool 70% e adicionadas à câmara. Os tubos de ensaio foram utilizados para destacar uma quantidade mais exata do ágar colonizado, formando pequenas placas discóides (Figura 26), facilitando, também, seu processo de adição ao substrato.



Figura 26. Placas de petri com discos recortados por tubos de ensaio, e sacas de substrato inoculadas dentro da CFL.

2.8 Incubação

As sacas de substrato inoculadas passaram 20 dias dentro de uma estufa sem iluminação e com temperatura de 25°C, para ocorrer a colonização do substrato (Figura 27).



Figura 27. Substratos inoculados dispostos dentro de uma estufa.

2.9 Frutificação

Foram efetuados cortes em “x” nas sacas, possibilitando a entrada de ar fresco e saída dos corpos de frutificação. Após cortadas, por conta da falta de estufa disponível, as sacas foram deixadas em uma sala com pouca luz e umedecidas regularmente com um borrifador. Durante a frutificação, a temperatura variou entre 15°C a 27°C.

3. RESULTADOS

Quando o experimento foi realizado pela primeira vez, a partir da etapa de incubação, ocorreram problemas que, até o momento deste relatório, podem ser relacionados com a presença de lignina na serragem. Todos os substratos com a serragem acabaram não tendo miceliação (Figura 28). Posteriormente, as sacas sem crescimento fúngico foram abertas e inoculadas com bolores diferentes (provenientes de placas de petri contaminadas) e poucos foram capazes de colonizar o substrato.



Figura 28. Substrato com serragem apresentando falta de crescimento e morte do fungo inoculado.

Após alguns testes, um bolor do gênero *Aspergillus* conseguiu colonizar o substrato de serragem (Figura 29). De acordo com Baptista (2012), fungos como *Aspergillus* produzem enzimas capazes de quebrar parcialmente a lignina, como lacase e lignina-peroxidase, para acessar o potencial energético da celulose e hemicelulose presente nas células vegetais. A lignina é uma macromolécula dificilmente quebrada, que forma ligação com a celulose principalmente no xilema dos troncos de árvores, como *Pinus* spp (fonte da serragem utilizada). Levantamos a hipótese de que o shimeji não tem enzimas para digerir a celulose caso ela esteja ligada em macromoléculas resistentes como a lignina, e, por isso, a testagem foi feita novamente utilizando serragem retirada do floema de *Pinus*.



Figura 29. *Aspergillus* sp colonizando serragem rica em lignina.

Na segunda testagem, além de utilizar serragem do floema de *Pinus*, foram feitas duplicatas de cada substrato e foi adicionado um novo substrato composto por feno e palha de arroz, rendendo um total de 14 sacas (Figura 30).



Figura 30. Sacas de substrato inoculadas com *P. ostreatus*.

Como ainda não havia estufas disponíveis, as sacas ficaram em uma sala com baixa luminosidade e temperatura variando entre 15°C a 27°C. Porém, dessa vez, a miceliação teve êxito em todos os substratos, apresentando expansão do micélio em uma semana; entretanto, ocorreram variações na velocidade e qualidade do micélio (Figura 31 e Quadro 1).



Figura 31. Miceliação dos substratos em 25 dias de incubação. A) Serragem com palha de arroz com micélio fraco, porém bem distribuído pelo substrato. B) Serragem pura parcialmente colonizada apresentando pontos de acúmulo do micélio. C) Feno puro completamente colonizado e bem distribuído pelo substrato. D) Serragem com pó de café apresentando miceliação apenas ao redor do disco de ágar que continha o inóculo de shimeji. E) Serragem com feno completamente colonizada, apresentando pontos de acúmulo do micélio. F) Feno com palha de arroz completamente colonizado e bem distribuído pelo substrato. G) Serragem com fibra de coco com miceliação fraca, porém bem distribuída pelo substrato.

Quadro 1. Análise do desenvolvimento micelial até a frutificação.

Substrato	Miceliação rápida	Colonização completa	Micélios saudáveis	Aglomerção de micélio	Formação de pontos de frutificação	Frutificação completa
feno puro	■	■	■	■	■	■
serragem pura	■	■	■	■	■	■
feno com serragem	■	■	■	■	■	■
feno com palha de arroz	■	■	■	■	■	■
serragem com palha de arroz	■	■	■	■	■	■
serragem com fibra de coco	■	■	■	■	■	■
serragem com café	■	■	■	■	■	■

Os substratos que menos tiveram avanço levantaram as seguintes hipóteses:

a) O substrato de serragem com café foi o que teve menos miceliação; possivelmente, isso ocorreu por conta de seu pH ácido (partindo-se da premissa de que o pó de café puro é um meio ácido). Desta maneira, caso seja usado, é preferível que seja misturado com gesso para o controle do pH.

b) O substrato de serragem com fibra de coco apresentou micélio com filamentos muito finos e muito dispersos entre si por conta da concentração de lignina da fibra de coco, deixando a mistura imprópria para o cultivo do shimeji por ter baixa quantidade de recurso energético acessível.

A maioria dos outros substratos em questão tiveram problemas na frutificação, possivelmente ocasionada pela falta de uma estufa, que manteria controlada a temperatura de frutificação e evitaria o ressecamento.

Independentemente da temperatura (que variou de 15°C a 21°C), após três dias que as sacas tinham sido abertas, o substrato composto por feno e palha de arroz (e a duplicata) apresentou diversos pontos de frutificação (Figura 32).



Figura 32. Sacas de feno com palha de arroz, três dias após o início do período de frutificação.

Nos dias subsequentes, as sacas com feno ou serragem e a de feno puro também formaram pontos de frutificação, porém não chegaram a formar cogumelos. Cinco dias após a abertura, as sacas de feno com casca de arroz frutificaram formando cogumelos saudáveis (Figura 33).



Figura 33. Corpos de frutificação de *P. ostreatus* em substrato de feno com palha de arroz.

Podemos inferir que o feno pode ser uma base para substrato de shimeji eficiente, levando vantagem sobre os substratos à base de serragem em ambientes secos; portanto, pode ser uma alternativa ecológica e rentável para pequenos produtores, assim como a palha de arroz que foi o complemento dos substratos compostos que se mostrou mais eficiente. A palha de arroz auxilia o micélio e a frutificação por ser rica em nutrientes, sua composição fibrosa auxilia a não compactar demais o substrato (facilitando a umidade e oxigenação), além de ser uma opção sustentável por ser um resíduo agrícola que seria descartado (Obodai, 2003).

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Além da preocupação nutricional, os substratos também precisam ser capazes de reter umidade em níveis adequados para o desenvolvimento do micélio, facilitar o acondicionamento nas embalagens de produção e apresentar alta disponibilidade, juntamente com baixo custo para o produtor (Muswati, 2021). Desta forma, os dados desta pesquisa fornecem subsídios para aumentar as chances de sucesso no cultivo de pequenos produtores.

O projeto foi um sucesso, porém não da forma esperada: ao tentar realizar a parte experimental, houve problemas que dificultaram o processo esperado, como, por exemplo, na primeira testagem, na qual a serragem não era própria para o cultivo do shimeji, fazendo com que fosse necessário refazer a testagem. No início, refazer o procedimento foi assustador, por conta de eu ter uma visão de que experimentos devem “dar certo” para o projeto prosseguir, sendo que o que mais me fez avançar com o projeto e ganhar experiência foram os ‘erros’.

A cada ‘erro’ surgiam mais perguntas e, conseqüentemente, mais pesquisa para saber como prosseguir, como, por exemplo, a pesquisa sobre as enzimas necessárias para digerir a lignina. Vale ressaltar que, em vários pontos, a pesquisa teria demorado muito mais tempo por conta de ‘erros’ simples como não adicionar água ao substrato, ou não compreender como a serragem de *Pinus* não apresentou miceliação (sendo que é comumente usada para cultivo de shimeji). Esses deslizos foram evitados por instrução e discussão de hipóteses junto aos técnicos de laboratório, que auxiliaram desde o início da parte prática, e o orientador, que acompanhou de perto a pesquisa.

Apesar do acompanhamento e instrução, houve problemas que iam além do esperado, como a falha da estufa (que teve infiltração de água, levando à queima de aparelhos de regulação, *coolers*, entre outros, tornando-se obsoleta para a função esperada, fazendo com que fosse necessário fazer a incubação e frutificação sem regulação de temperatura). Esse problema foi interessante para levantar a hipótese de que, em épocas secas e com variação de temperatura, os substratos à base de feno levam vantagem sobre os substratos utilizados pela indústria, que são à base de serragem.

Acredito que, ao ser colocado em uma situação em que foi necessário adaptar-me às circunstâncias, perguntar e tentar responder minhas próprias perguntas trouxe-me apreço pela pesquisa em laboratório, e maior confiança para me inovar e impor sobre adversidades, não apenas em laboratório e vida profissional, mas, também, como apresentar o projeto em dois diferentes momentos:

a) Em apresentações de seminários durante o ano letivo, nos componentes curriculares de Botânica 1 e Infraestrutura da Educação do curso de Licenciatura em Ciências Biológicas do IFSP campus São Roque; b) Durante a XII Jornada de Produção Científica e Tecnológica, XV Ciclo de Palestras Tecnológicas e IX Semana da Biologia (https://www.even3.com.br/jpct_cipatec_2024/), em que foi publicado o resumo expandido (Figura 34) e apresentação do mesmo trabalho de forma oral (D'Alessandro; Tome; Moraes; Santos, 2024).



TESTAGEM DE DIFERENTES SUBSTRATOS PARA CRESCIMENTO DE *PLEUROTUS OSTREATUS* (JACQ.) KUMMER (FUNGI, BASIDIOMYCOTA, PLEUROTACEAE)

Luca Nalini Bortolato D'alessandro
Thaís Melega Tome
Ramiéri Moraes
Fernando Santiago dos Santos, fernandoss@ifsp.edu.br

Resumo

O cogumelo *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) Kummer, conhecido como shimeji no Brasil e em outras nações, é uma espécie de fungo basidiomiceto reconhecido por ser fonte significativa de proteínas, fibras, vitaminas e minerais, sendo comercializado em muitos países. Além disso, esse fungo contém compostos bioativos com propriedades antioxidantes e potencialmente benéficas à saúde humana. O cultivo de shimeji ocorre em substratos orgânicos, como serragem, palha e resíduos agrícolas, tornando-os uma opção sustentável na produção de alimentos. Devido à sua capacidade de crescer em uma variedade de condições e à relativa facilidade de cultivo, os cogumelos *P. ostreatus* são populares entre os produtores domésticos e comerciais. Com este projeto, estão sendo testados diferentes substratos orgânicos para estudar a resposta fisiológica dessa espécie e, com isso, fornecer dados para incentivar e auxiliar pequenos produtores.

Palavras-chave: micologia; shimeji; crescimento fúngico; cultivo; micélio.

Modalidade: Resumo expandido

Apresentação

Os representantes do gênero *Pleurotus* são conhecidos por incluir espécies comestíveis de sabor suave e textura carnuda, tornando-os populares em muitas culinárias ao redor do

Figura 34. Página inicial do resumo expandido publicado nos Anais e Resumos do evento científico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço: a) à bolsa de Iniciação Científica Institucional do IFSP por meio do edital (34/2023; b) aos técnicos de laboratório Thais M. Tome e Ramiéri Moraes por todo o auxílio e aprendizado das etapas de testagem; c) Cristiane Aparecida Borges Wasinski que doou a matriz de shimeji para os experimentos.

REFERÊNCIAS

ABRAHÃO; M. C. Fungos Basidiomicetos. **Revista Paidéi@**, UNIMES VIRTUAL, v. 2, n. 4, 2010.

ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. **Introductory Mycology**. 4.ed. Nova Iorque: John Wiley & Sons, 1996.

BAPTISTA, N. M. Q.; SANTOS, A. C.; ARRUDA, F. V. F.; GUSMÃO, N. B. Produção das enzimas lignina peroxidase e lacase por fungos filamentosos. **Scientia Plena**, v. 8, n. 1, p. 019904-1, 2012.

BARBOSA, J ; OLIVEIRA, M. E. C.; MORAIS, K.; SIQUEIRA, F.; MENDONÇA, S. **Cultivo de shimeji (*Pleurotus ostreatus*) em resíduos agroindustriais do processamento de palma de óleo (*Elaeis guineensis*, Jacq)**, 2016. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/157177/1/CBQ56-7.pdf>>. Acesso em: 27 jun. 2024.

BEETZ, A. E ; GREER, L. Mushroom Cultivation and Marketing. **Appropriate Technology Transfer for Rural Areas**, p.1-14, 1999.

BONNEVILLE, S. *et al.* Molecular identification of fungi microfossils in a Neoproterozoic shale rock. **Science Advances**, v. 6, n. 4, p. 11, 2020,

BONONI, V. L. R.; TRUFEM, S. F. B.; GRANDI, R. A. P. Fungos macroscópicos do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, São Paulo, Brasil, depositados no Herbário do Instituto de Botânica. **Rickia**, v. 9, p. 37-53, 1981.

BRENNEMAN, J. A; GUTTMAN, M. C. The Edibility & Cultivation of the Oyster Mushroom. **The American Biology Teacher**, v. 56, n. 5, p. 291-293, 1994.

CAPELARI, M. *et al.* Agaricales. In: CAPELARI, M. (Org.). **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2015.

CARLILE, M. J.; WATKINSON, S. C. **The Fungi**. 2.ed. Londres: Academic Press, 2001.

D'ALESSANDRO, L. N. B.; TOME, T. M.; MORAES, R.; SANTOS, F. S. dos. Testagem de diferentes substratos para crescimento de *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) Kummer (Fungi, Basidiomycota, Pleurotaceae). In: PEREIRA, M. (Org.). XII Jornada de produção científica e tecnológica, XV Ciclo de palestras tecnológicas e IX Semana da biologia: ciências básicas para o desenvolvimento sustentável. **Anais e Resumos**. São Roque: Instituto Federal de São Paulo, 2024, p. 110 a 115.

ERJAVEC, J. *et al.* Proteins of higher fungi: from forest to application. **Trends in Biotechnology**, v. 30, n. 5, 2012.

GUERRA, T. *et al.* **Biologia e sistemática de fungos, algas e briófitas**. João Pessoa: Ed. Universitária, 2011.

GUERRERO, R. T.; HOMRICH, M. H. **Fungos macroscópicos comuns no Rio Grande do Sul**: Guia para identificação. 2.ed. Porto Alegre: Ed. Universidade/UFRGS, 1999.

HASSEN, S.; MOHAMMAD, A. Y.; KIRAMAT, K. Cultivation of the oyster mushroom *Pleurotus ostreatus* (Jacq) Kummer in two different agro-ecological Zones of Pakistan. **Afr JBiotechnol**, v. 10, p. 183-188, 2011.

HE, M. Q. et al. Species diversity of Basidiomycota. **Fungal Diversity**, v. 114, on-line, 2022. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/357865218_Species_diversity_of_Basidiomycota>. Acesso em: 08 dez. 2009.

HIBBETT, D. S.; BINDER, M.; BISCHOFF, J. F. **A higher-level phylogenetic classification of the Fungi**. Londres: The British Mycological Society Elsevier Ltd., 2007.

KAUFERT, F. H. **The Biology of Pleurotus Corticatus' Fries**. Saint Paul: University Farm, 1936.

KHAN, M. A. **Nutritional composition and Hypocholesterolemic effect of mushroom: *Pleurotus sajor-caju* and *Pleurotus florida***. Saarbrücken, Alemanha: LAP Lambert Academic publishing GmbH &co, 2010.

KIRK, P. M.; CANNON P. F.; MINTER, D. W.; STALPERS J. A. **Dictionary of the Fungi**. 10.ed. Wallingford, UK: CAB International, 2008.

MUSWATI, C. et al. The Effects of Different Substrate Combinations on Growth and Yield of Oyster Mushroom (*Pleurotus ostreatus*). **International Journal of Agronomy**, 2021.

RUIZ-DUEÑAS, C. et al. Genomic Analysis Enlightens Agaricales Lifestyle. **Evolution and Increasing Peroxidase Diversity**, v. 38, n. 4, p. 1428–1446, 2021.

OBODAI, M.; CLELAND-OKINE, J.; VOWOTOR, K. A. Comparative study on the growth and yield of *Pleurotus ostreatus* mushroom on different lignocellulosic by-products. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 3, p. 146-149, 2003.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia vegetal**. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

SÁNCHEZ, T. Cultivation of *Pleurotus ostreatus* and other edible mushrooms. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 85, p. 1321–1337, 2010.

SHAH, Z. A.; ASHRAF, M.; ISHTIAQ, M. Comparative Study on Cultivation and Yield Performance of Oyster Mushroom (*Pleurotus ostreatus*) on Different Substrates (Wheat Straw, Leaves, Saw Dust). **Pakistan Journal of Nutrition**, v. 3, n. 3, p. 158-160, 2004.

SHARMA, S. et al. Growth and Yield of Oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) on different substrates. **Journal on New Biological Reports**, v. 2, n. 1, p. 03-08, 2013.

SONG, Y. Y. et al. Defoliation of interior Douglas-fir elicits carbon transfer and stress signalling to ponderosa pine neighbors through ectomycorrhizal networks. **Scientific Reports online**, v. 5, n. 8495, 2015.

SOTO-CRUZ, O.; CHÁVEZ-RIVERA, R.; SAUCEDO-CASTAÑEDA, G. Stimulation of the *Megasphaera elsdenii*'s Butyrate Production in Continuous Culture by a Yeast Additive. **Brazilian archives of biology and technology**, v. 44, n. 2, p. 179–184, 2001.

TOLWEB. **The Tree of Life Web Project / Fungi**, 2023. Disponível em: <<http://tolweb.org/Fungi/2377>>. Acesso em: 07 dez. 2023.

URBEN, A. F. Produção de cogumelos por meio de tecnologia chinesa modificada: biotecnologia e aplicações na agricultura e na saúde. **Embrapa**, v. 3, n. 5, p. 113–125, 2017.

ZANETTI, A. L.; RANAL, M. A. Efeito de diferentes resíduos agroindustriais na miceliação de *Pleurotus* sp “florida” em Uberlândia, MG. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 31, n. 3, p. 215–220, 1996.