

Avaliação de diferentes métodos de preservação de culturas fúngicas

Evaluation of different methods for preservation of fungal cultures

Ceci Sales-Campos¹
Kelly Magalhães Gonçalves²
Maria Aparecida de Jesus³
Meire Cristina Nogueira de Andrade^{4(*)}

Resumo

O contínuo isolamento de culturas e a necessidade de sua manutenção para estudos acerca do cultivo, produtividade, caracterização nutricional, biotecnológica, tanto para objetivos acadêmicos como para fins comerciais e industriais são de fundamental importância. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar diferentes métodos de preservação de culturas fúngicas, com o propósito de pesquisas acerca do cultivo de cogumelos e estudos afins. Para verificar a eficiência dos métodos, foi feita uma avaliação após seis meses de preservação. Para isso, foram utilizados dois tubos das culturas mantidas em diferentes métodos (água destilada, em óleo mineral, repicagens periódicas e sílica gel). Fragmentos dessas culturas foram novamente inoculadas em placas de Petri contendo meio malte agar (3%). Foram feitas quatro repetições (placas) por linhagem, das quais duas foram adicionadas de serragem de marupá, com o fim de testar a eficácia dos referidos métodos. *Lentinus strigosus* foi o fungo que apresentou crescimento mais rápido e, nos demais métodos, cresceu em cinco dias. O período de colonização das linhagens de *Pleurotus ostreatus*, provenientes dos métodos de preservação em água destilada, óleo mineral e repicagem periódica foi de seis dias, sem diferença do tempo de colonização entre os métodos. A linhagem de *Pleurotus sajor-caju* e as linhagens de *P. ostreatus* colonizaram o meio em sete dias de incubação em todos os métodos,

-
- 1 Dra.; Tecnóloga Florestal; Pesquisadora do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, INPA, Coordenação de Tecnologia e Inovação; Endereço: Avenida André Araújo, 2936, Caixa Postal: 478, CEP: 69011-970, Manaus, Amazonas, Brasil; E-mail: ceci@inpa.gov.br
 - 2 Ciências Naturais; Professora da Secretaria do Estado de Educação (SSE); Endereço: Rua Waldomiro Lustoza, 350, CEP: 69076-830, Manaus, Amazonas, Brasil; E-mail: kellymgstar@hotmail.com
 - 3 Dra.; Bióloga; Pesquisadora do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Coordenação de Pesquisas de Produtos Florestais, Laboratório de Patologia da Madeira; Endereço: Avenida André Araújo, 2936, Caixa Postal: 478, Petrópolis, CEP: 69060-001, Manaus, Amazonas, Brasil; E-mail: ranna@inpa.gov.br
 - 4 Dra.; Bióloga; Professora do Centro de Ciências Exatas e Sociais Aplicadas, Universidade do Sagrado Coração, USC; Endereço: Rua Irmã Arminda, 10-50, Bairro Jardim Brasil, CEP: 17011-160, Bauru, São Paulo, Brasil; E-mail: mcnandrade@hotmail.com (*) Autora para correspondência

Recebido para publicação em 19/02/2014 e aceito em 11/04/2015

Ambiência Guarapuava (PR) v.11 n.2 p. 337 - 343 Jan./Abr. 2015 ISSN 1808 - 0251
DOI:10.5935/ambiencia.2015.02.05

exceto em sílica gel. O tempo de colonização das linhagens de *Lentinula edodes* LED 25, LED 27, CHICO II, *Flamulina* sp. e de *Pleurotus ostreatus* POS 09/99 e POS 09/100 foi de nove dias de incubação. As linhagens de *L. edodes* LED 12, LED 20, LED 33, LED 35, LED 51, LED 55, LED 58, LED 75, LED 96/13, LED SALTO, LED JABL, LED SIII e a linhagem de *Coprinus comatus* CCO 01/01 obtiveram maior delonga no tempo de colonização (10 dias).

Palavras-chave: sílica gel; óleo mineral; baixa temperatura; viabilidade.

Abstract

The continual isolation of cultures and the need for their maintenance for studies on the cultivation, yield, nutritional and biotechnological characterization, both for academic and for commercial and industrial purposes are of fundamental importance. Thus, the objective of this study was to evaluate different methods of preserving fungal cultures for the purpose of research on the cultivation of mushrooms and correlated studies. To verify the efficiency of the methods, an evaluation was carried out after six months of preservation. Two test tubes were used from cultures maintained at different methods (distilled water, mineral oil and periodical transplanting and silica gel). Fragments of these cultures were once again inoculated in Petri plates containing malt agar (3%). Four replications were performed (plaques) per strain, two of which were added *marupá* sawdust in order to test the effectiveness of those methods. *Lentinus strigosus* was the fungus that experienced the fastest growth, and in other methods, it has grown in five days. The colonization period of *Pleurotus ostreatus* strains, using the methods of preservation in distilled water, mineral oil and periodical transference was six days, without difference in the colonization time between the methods. The *P. sajor-caju* strain and the *P. ostreatus* strains colonized the medium in seven days of incubation in all the methods, except on silica gel. The colonization time of *Lentinula edodes* LED 25, LED 27, CHICO II, *Flamulina* sp. and *Pleurotus ostreatus* POS 09/99 e POS 09/100 strains was nine days of incubation. However, the *L. edodes* LED 12, LED 20, LED 33, LED 35, LED 51, LED 55, LED 58, LED 75, LED 96/13, LED SALTO, LED JABL, LED SIII strains and *Coprinus comatus* CCO 01/01 strain had greater delay in the colonization of time (10 days).

Key words: silica gel; mineral oil; low temperature; viability.

Introdução

Os cogumelos são alimentos muito apreciados desde a idade antiga devido aos seus elevados valores nutritivos e potencial

medicinal, além de serem classificados como uma especiaria nobre em pratos culinários. São conhecidas aproximadamente 2.000 espécies comestíveis e cerca de 25 delas são cultivadas comercialmente. Dentre elas, três

são mais comumente cultivadas e consumidas no Brasil: *Agaricus bisporus* (Lange) Imbach, conhecido como champignon de Paris; *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler como Shiitake; e *Pleurotus ostreatus* (Jacq. ex Fr) Kummer, como shimeji ou hiratake (URBEN et al., 2001). Em especial, o cultivo de espécies do gênero *Pleurotus* cresce a cada ano, devido, principalmente, a sua habilidade de produção em diferentes resíduos (GUZMÁN et al., 1993; EIRA et al., 1997; CHANG; MILES, 1984), dentre os quais, serragens e resíduos agroindustriais (SALES-CAMPOS et al., 2008).

O consumo de cogumelos está aumentando na cultura ocidental, envolvendo um grande número de espécies além do popular “champignon” (MATTILA et al., 2001). Um grande crescimento pode ser atestado pelos seguintes números: em 1995, a produção anual mundial foi de 2,0 milhões de toneladas e, em 2005, aumentou para 3,3 milhões de toneladas, ou seja, mais de 60% em 10 anos (FAO, 2007). A produção do Brasil não se encontra nessa estatística mundial e o país não possui estatísticas oficiais sobre a produção de cogumelos, mas sabe-se que a maior região produtora está localizada na região de Mogi das Cruzes - SP.

Nota-se que, no Brasil, está havendo um crescimento no consumo dos cogumelos e, conseqüentemente, na produção e comercialização de tal produto (VILELA, 2009). No entanto, pouco se sabe a respeito da qualidade dos cogumelos comestíveis cultivados no Brasil, especialmente com respeito ao valor nutricional (FURLANI, 2004). Mesmo na literatura internacional, os dados encontrados são escassos e se referem a cogumelos cultivados em condições distintas das encontradas no Brasil.

O contínuo isolamento de culturas e a necessidade de sua manutenção para estudos acerca do cultivo, produtividade, caracterização nutricional, biotecnológica, tanto para objetivos acadêmicos como para fins comerciais e industriais, contribuirão com futuras pesquisas abordadas nesse contexto. Dessa forma, a manutenção das culturas auxiliará no processo de consolidação do Laboratório de Cultivo de Fungos Comestíveis, da Coordenação de Tecnologia e Inovação (CTI), do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA).

Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar diferentes métodos para a preservação de diferentes culturas fúngicas.

Material e Métodos

Inicialmente foram selecionadas as linhagens que já se encontravam no Laboratório de Cultivo de Fungos Comestíveis. Tais linhagens se encontravam preservadas nos métodos de água destilada e óleo mineral, totalizando 37 culturas fúngicas (cepas). Com o fim de promover maior vigor micelial dessas culturas, as mesmas foram repicadas em placa de Petri nos meios: malte ágar e BDA e incubadas a 25 °C em BOD, até que o crescimento micelial alcançasse aproximadamente 2/3 da placa. A partir da repicagem dessas culturas, procedeu-se ao seu armazenamento das mesmas nos diferentes métodos: preservação em água destilada, em óleo mineral, repicagens periódicas e sílica gel.

Para preservação em água destilada, discos de inóculos das culturas foram transferidos para 4 tubos de ensaio contendo 4 ml de água destilada estéril (dois para cada meio de cultura: malte ágar e BDA). Os tubos de ensaio foram lacrados com tampa de baquelite e armazenados em geladeira

a 4 °C. A preservação em óleo mineral seguiu o mesmo princípio utilizado para a preservação em água destilada.

Para o método de repicagens periódicas, as culturas foram repicadas em 4 tubos de ensaio contendo os meios malte ágar (3%) e BDA (sendo dois tubos por cada meio) e mantidos em estufa a 25 °C ± 2 °C até que o fungo preenchesse quase toda superfície do meio (nas proximidades das bordas das placas). Em seguida, os tubos foram mantidos em refrigerador (4 °C).

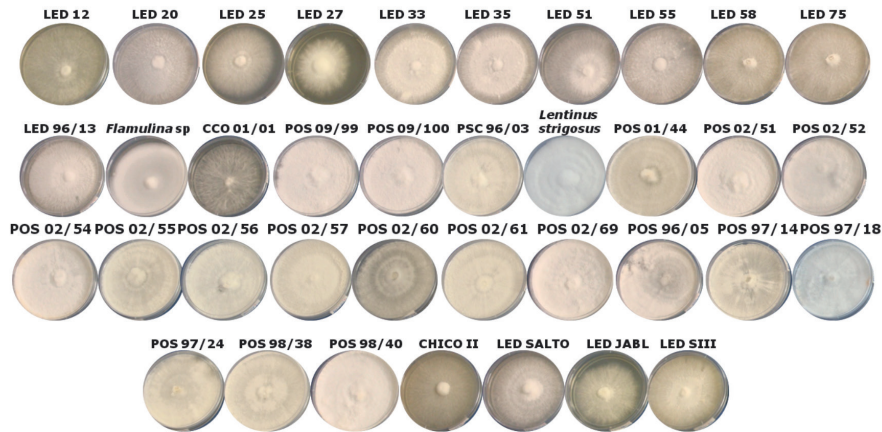
A preservação em sílica gel seguiu a metodologia descrita por Dhingra e Sinclair (1995), com algumas modificações. Inicialmente, as culturas foram repicadas em placas de Petri contendo dois tipos de meio: malte ágar (3%) e BDA, e mantidas em estufas a 25 °C ± 2 °C até completarem $\frac{3}{4}$ de crescimento micelial da linhagem fúngica. Em seguida, foi adicionada serragem de *Simarouba amara* (marupá) dentro das placas de Petri, as quais foram novamente mantidas em estufa (25 °C ± 2 °C) por sete dias. Após o período de incubação foi vertido leite desnatado (10%) estéril, visando preparar uma suspensão de inóculo, que foi transferida para novas placas, as quais permaneceram dois a três dias a 25 °C ± 2 °C. Paralelamente foram preparados frascos de vidro escuros (com capacidade para 10 ml) nos quais foi depositada a serragem embebida no leite. Estes, foram preenchidos até $\frac{3}{4}$ da sua capacidade com sílica gel, de granulometria de 4 a 8 mm de diâmetro. Na superfície da sílica gel, foi colocado um disco de papel filtro de diâmetro igual ao do frasco, para receber o inóculo do fungo crescido na serragem, embebida no leite. Foram utilizados também dois frascos por cada linhagem, provenientes dos meios malte ágar e BDA, os quais também foram armazenados a 4 °C.

Para verificar a eficiência dos métodos, foi feita uma avaliação após seis meses de preservação. Para isso, foram utilizadas duas amostras das culturas mantidas nos diferentes métodos. Fragmentos dessas culturas foram novamente inoculadas em placas de Petri contendo meio malte ágar (3%). Foram feitas quatro repetições (placas) por linhagem, das quais duas foram adicionadas de serragem de marupá, com o fim de testar a eficácia dos referidos métodos.

Resultados e Discussão

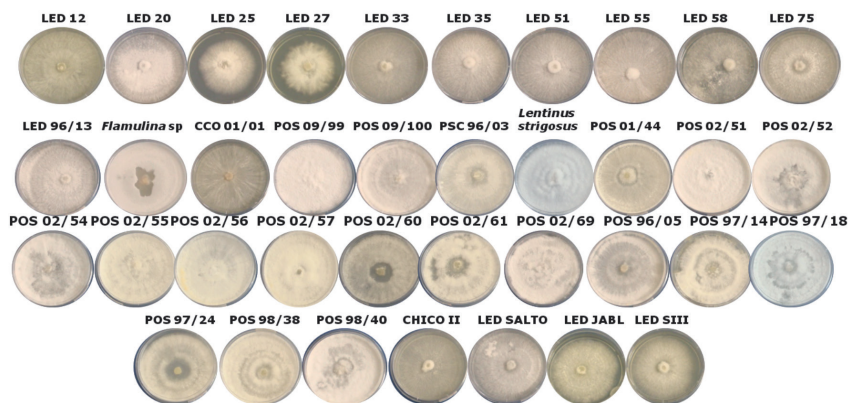
Todos os fungos cresceram e apresentaram vigor micelial intenso (Figuras 1, 2, 3, 4) em todos os métodos de conservação, exceto em sílica gel, onde somente *Lentinus strigosus* cresceu (Figura 5), tornando esse método ineficaz para os demais fungos. *Lentinus strigosus* foi o fungo que apresentou o crescimento mais rápido e, nos demais métodos, cresceu em cinco dias. O período de colonização das linhagens de *Pleurotus ostreatus* POS 98/40, POS 98/38, POS 02/61, POS 02/57 e POS 02/56, provenientes dos métodos de preservação em água destilada, óleo mineral e repicagem periódica foi seis dias, sem diferença do tempo de colonização entre os métodos. A linhagem de *Pleurotus sajor-caju* PSC 96/03 e as linhagens de *Pleurotus ostreatus* POS 01/44, POS 02/51, POS 02/52, POS 02/54, POS 02/55, POS 02/60, POS 02/69, POS 96/05, POS 97/14, POS 97/18 e POS 97/24 colonizaram o meio em sete dias de incubação em todos os métodos, exceto em sílica gel. O tempo de colonização das linhagens de *Lentinula edodes* LED 25, LED 27, CHICO II, *Flamulina* sp. e de *P. ostreatus* POS 09/99 e POS 09/100 foi de nove dias de incubação. As linhagens de *Lentinula edodes* LED 12, LED 20, LED

Figura 1– Linhagens fúngicas crescidas no método de preservação de água destilada ao final do período de incubação a 25 °C ± 2 °C



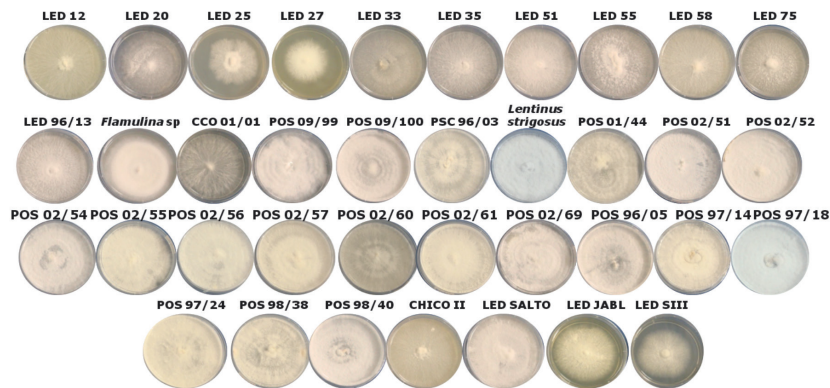
Fonte: Autores (2014).

Figura 2– Linhagens fúngicas crescidas no método de preservação de óleo mineral ao final do período de incubação a 25 °C ± 2 °C



Fonte: Autores (2014).

Figura 3– Linhagens fúngicas crescidas no método de preservação de repicagem periódica ao final do período de incubação a 25 °C ± 2 °C



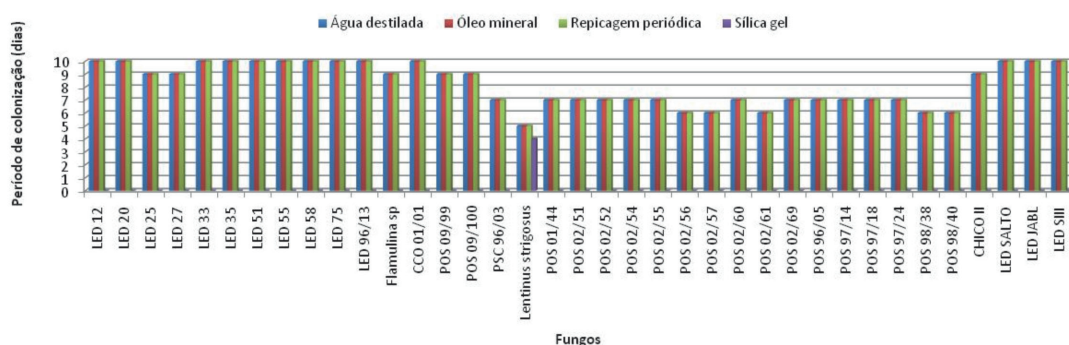
Fonte: Autores (2014).

Figura 4 – Linhagem fúngica crescida no método de preservação de sílica gel ao final do período de incubação a 25 °C ± 2 °C



Fonte: Autores (2014).

Figura 5– Eficiência dos métodos de preservação para culturas fúngicas incubadas a 25 °C ± 2 °C



Fonte: Autores (2014).

33, LED 35, LED 51, LED 55, LED 58, LED 75, LED 96/13, LED SALTO, LED JABL, LED SIII e a linhagem de Coprinus comatus CCO 01/01 obtiveram maior delonga no tempo de colonização (10 dias).

Conclusão

Os métodos de preservação óleo mineral, água destilada e repicagem periódica são eficientes na conservação dos basidiomicetos do presente estudo. Apenas o método de preservação em sílica gel não foi eficiente para a preservação desses basídios, exceto a linhagem de *L. strigosus*.

Referências

CHANG, S. T.; MILES, P. G. A new look at cultivated mushroom. **Bioscience**, v. 3, p. 358-362, 1984.

DHINGRA, O. D.; SINCLAIR, J. B. **Basic plant pathology methods**. 4. ed. Boca Raton: CRC Lewiis Publishers, 1995. 434p.

EIRA, A. F.; MINHONI, M. T. A. **Manual do cultivo do “Hiratake” e “Shimeji” (*Pleurotus spp.*)**. Botucatu: Fundação de Estudos e Pesquisas Agrícolas e Florestais-UNESP, 1997. 63p.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **FAOSTAT, 2007**. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567>>. Acesso em: 24 jan. 2007.

GUZMÁN, G.; MATA, G.; SALMONES, D.; SOTO-VELASCO, C.; GUZMÁN-DÁVALOS, L. **El cultivo de los hongos comestibles**. México: Instituto Politécnico Nacional, 1993. 245p.

FURLANI, R. P. Z. **Valor nutricional de cogumelos cultivados no Brasil**. 2004. 88 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, FEA, Universidade Estadual de Campinas, Unicamp, São Paulo, 2004.

MATTILA, P.; KONKO, K.; EUROLA, M.; PIHLAVA, J. M.; ASTOLA, J.; VAHTERISMO, L.; HIETANIEMI, V.; KUMPULAINEN, J.; VALTONEN, M.; PIIRONEN, V. Contents of vitamins, mineral elements, and phenolic compounds in cultivated mushrooms. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, p.2343-2348, 2001.

SALES-CAMPOS, C.; EIRA, A. F.; JESUS, M. A.; CAMPAPGNOLLI, F.; ANDRADE, M. C. N. Crescimento micelial de *Pleurotus ostreatus* em resíduo de *Simarouba amara*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.43, p.1633-1635, 2008.

URBEN, A. F.; OLIVEIRA, H. C. B.; VIEIRA, W.; CORREIA, M. J.; URIARTT, A. H. **Produção de cogumelos por meio de tecnologia chinesa modificada**. Brasília, DF: Embrapa, 2001. 151p.

VILELA, P. S. **Cogumelos - mercado comercialização**. 2009. Disponível em: <<http://www.faemg.org.br/content.aspx?code=353&parentpath=none;13>>. Acesso em: 24 abr. 2009.