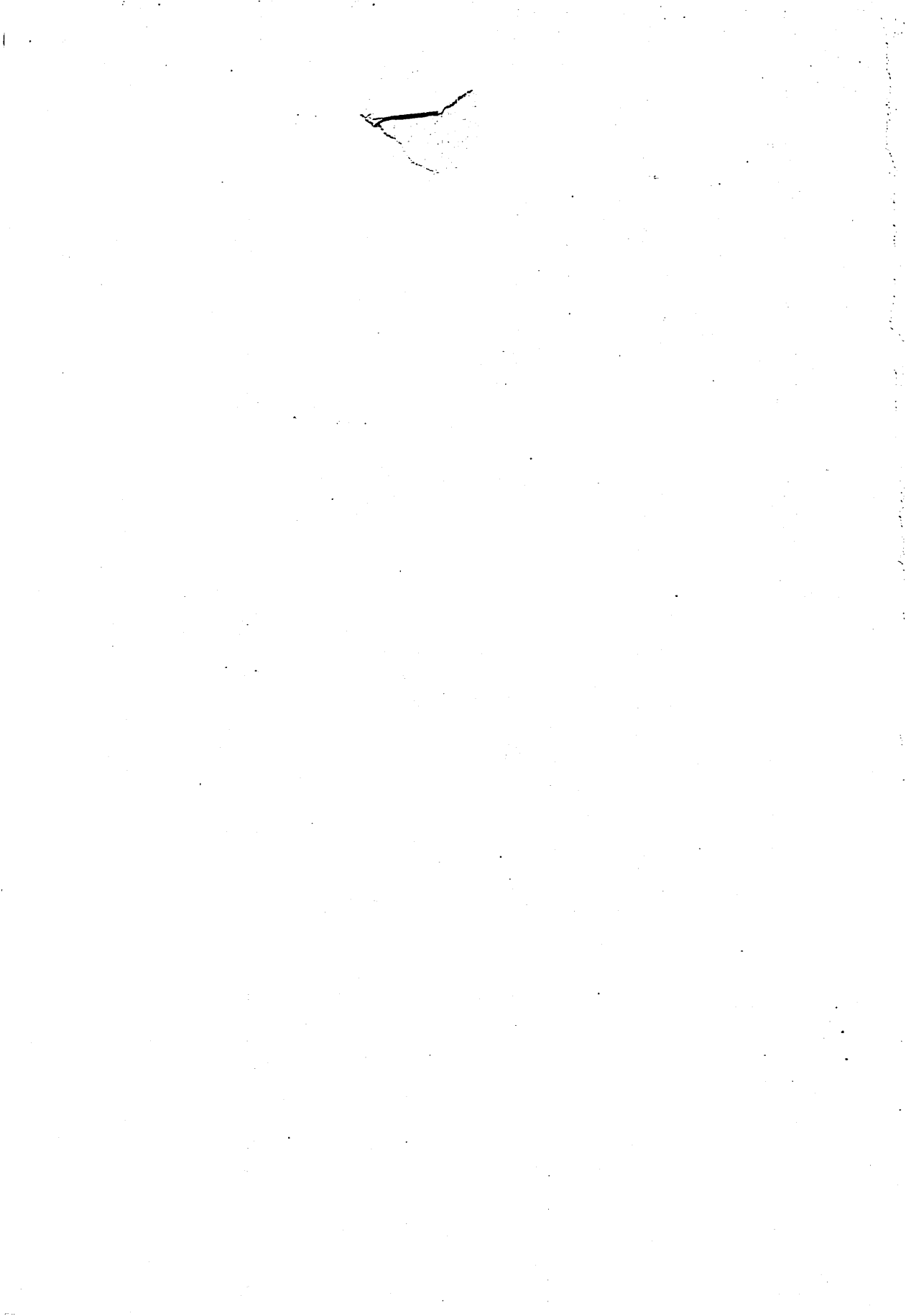


**EFEITOS DE SUBSTRATOS E  
TEMPERATURA NA PRESERVAÇÃO DE  
*Agaricus blazei***

**SCHEILA COSTA MAIA**

**2004**



58501  
049959

**SCHEILA COSTA MAIA**

**EFEITOS DE SUBSTRATOS E TEMPERATURA  
NA PRESERVAÇÃO DE *Agaricus blazei***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola para a obtenção do título de “Mestre”.

Orientador

Prof. Dr. Romildo da Silva

LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2004

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca Central da UFLA**

**Maia, Scheila Costa**

Efeitos de substratos e temperatura na preservação de *Agaricus blazei* /  
Scheila Costa Maia. -- Lavras : UFLA, 2004.

58 p. : il.

**Orientador: Romildo da Silva.**

**Dissertação (Mestrado) – UFLA.**

**Bibliografia.**

1. Cogumelo. 2. Cultivo. 3. Preservação. I. Universidade Federal de Lavras. II.  
Título.

CDD-589.222

-635.8

-664.8058

**SCHEILA COSTA MAIA**

**EFEITOS DE SUBSTRATOS E TEMPERATURA  
NA PRESERVAÇÃO DE *Agaricus blazei***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola para a obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 06 de setembro de 2004

Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Rosane Freitas Schwan

UFLA

Prof. Dr. José da Cruz Machado

UFLA

Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Cristina Ferreira Silva

UNICOR



Prof. Dr. Romildo da Silva  
UFLA  
(Orientador)

LAVRAS  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2004

## DEDICATÓRIA

*A Deus,  
pela bênção da reencarnação,  
pelas oportunidades concedidas  
e pela Sua providência em minha vida.*

## AGRADECIMENTO

Aos pais, irmãos e afetos – doces companhias – que Deus colocou em minha vida, ajudando-me a caminhar e a sentir-me mais feliz.

À Universidade Federal de Lavras pela oportunidade de aprimoramento intelectual.

Aos professores Dr. Romildo da Silva, pela disponibilidade em orientar-me durante o trabalho, Dr. Eustáquio Souza Dias, pela acolhida e estímulo e Dr<sup>a</sup>. Rosane de Freitas Schwan, pelas orientações.

Aos servidores Edson Luís Rezende (Dep. de Fitopatologia) e D'Artagnan Souza Godinho (Setor de Fisiologia Vegetal), pela colaboração.

Aos colegas Alexandre, Evânia, Valdirene, Aramália, Luana, Márcia e Ana Paula, pelas valiosas contribuições.

Ao casal Marisa e Néelson Delú, pela convivência e solidariedade.

Aos funcionários do Setor de Microbiologia Agrícola, Magda, Ivany, Fábio e Cidinha, pelo apoio.

Aos colegas de trabalho e alunos da Escola Estadual Azarias Ribeiro, pela compreensão por minha ausência.

A todos, meu reconhecimento e gratidão.

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
1 INTRODUÇÃO .....	01
2 REFERENCIAL TEÓRICO .....	03
2.1 Biologia da ordem <i>Agaricales</i> .....	03
2.2 Valor e consumo dos cogumelos .....	04
2.3 Tecnologia de cultivo do <i>Agaricus blazei</i> .....	11
2.4 Coleções de culturas puras .....	13
2.5 Fatores que afetam o crescimento dos fungos .....	18
2.5.1 Meio .....	19
2.5.2 Temperatura .....	21
2.5.3 Luz .....	22
2.5.4 Oxigenação .....	22
2.5.5 Atividade de água (a/w) .....	23
2.5.6 pH .....	23
2.6 Métodos de preservação .....	23
2.6.1 Subcultura .....	24
2.6.2 Manutenção em óleo mineral .....	25
2.6.3 Manutenção em água destilada .....	26
2.6.4 Secagem ou desidratação .....	27
2.6.5 Ultracongelamento ou criogenia .....	30
3 MATERIAL E MÉTODOS .....	34
3.1 Obtenção do isolado de <i>Agaricus blazei</i> .....	34



3.2 Condições de cultivo .....	34
3.2.1 Produção do inóculo inicial em meio sólido .....	34
3.2.2 Produção do inóculo inicial em grãos de cereais .....	35
3.3 Acondicionamento, tratamento e período de estocagem .....	36
3.3.1 Acondicionamento .....	36
3.3.2 Tratamentos de preservação .....	36
3.3.3 Período de estocagem .....	39
3.4 Avaliação da viabilidade da cultura.....	39
3.5 Delineamento experimental e análise estatística .....	39
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	40
4.1 Viabilidade de <i>A. blazei</i> preservado em diferentes condições .....	40
4.2 Viabilidade de <i>A. blazei</i> preservado em água destilada .....	42
4.3 Viabilidade de <i>A. blazei</i> preservado em óleo mineral .....	44
4.4 Viabilidade de <i>A. blazei</i> preservado em diferentes substratos e na ausência de líquido preservante .....	46
5 CONCLUSÕES .....	50
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	51
ANEXOS .....	58

## RESUMO

MAIA, Scheila Costa. **Efeitos de substratos e temperatura na preservação de *Agaricus blazei***. UFLA, 2004, 58 p. (Dissertação – Mestrado em Microbiologia Agrícola).

O cultivo do cogumelo *Agaricus blazei*, basidiomiceto natural do sudeste do Brasil, tem despertado grande interesse pelas suas propriedades nutricionais e medicinais. A manutenção das culturas puras e a produção de inoculantes de confiança são pontos críticos para o sucesso da produção dos cogumelos. Portanto, é necessário um método eficaz de preservação da linhagem escolhida para o cultivo. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito das diferentes condições de preservação (substratos e temperatura) do isolado de *A. blazei*, estabelecendo um método adequado de preservação para o fungo. O isolado utilizado era proveniente da coleção de fungos do Laboratório de Cogumelos Comestíveis, Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras, sendo cultivado em meio BDA e em grãos de cereais para a produção dos inóculos. Posteriormente, estes foram preservados em água destilada, óleo mineral ou glicerol (Experimento I) e cereais, solo ou composto (Experimento II), durante um período de 12 meses, sendo estocados sob diferentes condições de temperatura. Mensalmente, os inóculos armazenados e uma pequena porção de cereais, composto e solo foram transferidos para placas de Petri contendo meio BDA, numa série de 3 repetições. Para o experimento I, a viabilidade da cultura foi avaliada considerando-se o diâmetro do crescimento micelial, cujas médias foram comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Pela natureza do experimento II, a avaliação da viabilidade da cultura foi feita de forma visual. Pela análise dos resultados, verificou-se que, para a preservação do isolado de *A. blazei* por um período de 12 meses, o melhor sistema de tratamento foi cereais/água destilada/temperatura ambiente; para preservação por um período de, no máximo, 7 meses pode-se também utilizar o tratamento BDA/água destilada/temperatura ambiente. O armazenamento a -20°C e -86°C demonstrou ser ineficaz para a preservação do fungo. Entretanto, o armazenamento a 10°C utilizando-se como substrato o composto ou o solo, mostrou-se bastante eficiente num período de 10 meses, sugerindo maiores estudos para a avaliação da eficácia destes tratamentos.

---

Comitê de Orientação: Prof. Dr. Romildo da Silva - UFLA (Orientador), Prof. Dr. Eustáquio Souza Dias - UFLA (Co-orientador)

## ABSTRACT

MAIA, Scheila Costa. **Evaluation of different substrates and temperature in the preservation of *Agaricus blazei***. UFLA, 2004, 58 p. (Dissertation – Master in Agricultural Microbiology).

The cultivation of *Agaricus blazei*, a native basidiomycetes mushroom of Southeast of Brazil, has raised great interest for its nourishing and medicine properties. The preservation of pure culture and the production of reliable spawns are critical points for the successful mushrooms production. Therefore, a good method for the preservation of genetic line is necessary for investigation in this field. The objective of this work was to evaluate the effect of different conditions (substrates and temperature) of fungal conservation on an isolate of *Agaricus blazei*, establishing an method for fungal preservation. The isolate used in the study was obtained from the Mycological Collection of the Edible Mushroom of the Biology Department of the Federal University of Lavras. The fungus was cultivated in PDA medium and on cereal grains for inoculum production. In the following step, inoculum of the fungus was preserved in sterile water, mineral oil or glycerol (trial I) and cereals, soil and compost (trial II), during a period of 12 months and stored in different temperatures conditions. Stored inoculum and a small portion of cereals, compost and soil were monthly transferred to Petri dishes containing PDA medium, three dishes as replicates. For the trial I the viability of the culture was evaluated considering the colony diameter, in wich means were compared by the Tukey test, at 5% probability. Evaluation in the trial II, was made by taking the visual shape of the fungal growth. Preservation of the isolate of *Agaricus blazei*, for the period of 12 months, was better obtained with the treatment system of cereals/distilled water/room temperature; for the preservation of a maximun of 7 months, PDA/distilled water/room temperature treatment can be used. Storage at -20°C and -86°C was inefficient for preservation of the fungus. However, storage at 10°C, using compost or soil as substrate, showed enough efficient for 10 months, suggesting further studies for the evaluation of the efficacy of these treatments.

---

Guindance Committee: Prof. Dr. Romildo da Silva - UFLA (Adviser), Prof. Dr. Eustáquio Souza Dias - UFLA (Co-adviser)

## INTRODUÇÃO

Os cogumelos são considerados importante complemento alimentar por serem alimentos ricos em fibras, proteínas, vitaminas e minerais. Além do excelente valor nutritivo, são também reconhecidos por apresentarem propriedades medicinais. Algumas espécies, como *Agaricus bisporus* (champignon), *Lentinula edodes* (shiitake) e *Pleurotus ostreatus*, são amplamente cultivadas e muito apreciadas na alimentação.

O cogumelo *Agaricus blazei*, nativo do sudeste do Brasil, tem despertado grande interesse pelas suas propriedades medicinais, devido à presença de polissacarídeos do tipo  $\beta$ -glucanas, cuja ação antitumoral é reconhecida em recentes estudos.

O cultivo do *Agaricus blazei* é baseado nas técnicas utilizadas para a produção do *A. bisporus*. Entretanto, ainda são necessárias pesquisas para que sua tecnologia de cultivo seja aperfeiçoada e melhor definida.

Dentre outros fatores, o sucesso da produção de cogumelos depende da manutenção das culturas puras e da produção de inoculantes de confiança. Neste sentido, torna-se necessário um método eficaz de preservação da linhagem escolhida para cultivo (Chang & Hayes, 1978).

Há muitos métodos disponíveis para preservação de culturas de microrganismos. No entanto, o fundamental de todos eles é a manutenção da viabilidade e estabilidade do organismo.

O desenvolvimento das técnicas de preservação permite a montagem das coleções que são de extrema importância para a micologia, pois possibilita ter à disposição determinado organismo a qualquer momento, além de serem referência para estudos sobre morfologia, fisiologia, taxonomia e variações genéticas das espécies.

Tratando-se do cultivo de cogumelos, as referidas coleções podem suprir a necessidade dos produtores de inoculantes, disponibilizando-lhes linhagens testadas para o seu valor comercial.

Assim, a proposta deste trabalho foi avaliar o efeito das diferentes condições de preservação do isolado de *Agaricus blazei*, estabelecendo um método adequado para a preservação do fungo.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Biologia da ordem *Agaricales*

Os fungos verdadeiros são classificados como ascomicetos, basidiomicetos, zigomicetos e quitridiomicetos (Berbee e Taylor, 1992).

Apesar de sua grande importância, pouco se sabe sobre as relações evolucionárias dentro dos fungos. Sua simples e freqüentemente convergente morfologia, a ausência de registros fósseis úteis e sua diversidade têm sido os principais impedimentos para o progresso nesse campo. Com o desenvolvimento de técnicas moleculares, novos caminhos são agora avaliáveis, permitindo contornar esses obstáculos (Bruns et al., 1991).

Dentre os basidiomicetos, a ordem *Agaricales* apresenta o maior número de espécies comestíveis, mais conhecidas e comuns, além de um grande número de espécies tóxicas e venenosas (Urban et al., 2001).

Dentre as espécies da ordem *Agaricales* cultivadas para fins alimentares, quatro são as mais conhecidas no mundo inteiro: *Agaricus bisporus*, *Lentinus edodes*, *Pleurotus ostreatus* e *Volvariella volvaceae* (Alexopoulos & Mins, 1996; Hayes & Wright, 1979; Rajarathnam & Bano, 1988, 1989).

Outras espécies são reconhecidos por sua ação antitumoral, como *Pleurotus*, *Flammulina velutipes*, *Agaricus bisporus* e *Agaricus blazei*, sendo este último comercializado a um elevado preço (Dornberg et al, 1986).

O basidiocarpo é o que se chama comumente de cogumelo, cujas partes mais proeminentes são o estipe (talo, haste) e o píleo (chapéu). O píleo pode apresentar forma, cor e superfícies variadas, além de apresentar restos do véu universal (membrana formada por hifas fortemente entrelaçadas, mais ou menos soltas, que protege as lamelas), conferindo-lhe aspectos taxonômicos de natureza peculiar (Pegler & Spooner, 1994).

Na parte inferior do píleo está localizado o himênio (parte fértil do cogumelo). O basídio, estrutura característica dos basidiomicetos, é formado na camada himenial, e está inserido nas bordas das lamelas, que são geralmente em forma de clava. Sobre ele se formam os esporos exógenos, os basidiósporos (Alexopoulos & Mins, 1996).

Outras microestruturas também estão presentes nos basidiomicetos, como os cistídeos (estruturas estéreis do himênio) e setas (hifas também estéreis semelhantes a espinhos, com paredes espessas e coloração negra) (Urban, 2001).

A reprodução pode ocorrer de forma assexuada e sexuada. O primeiro caso se dá na fase vegetativa, pela fragmentação do micélio (artosporos), produção de conídios, oídios e clamidosporos. A reprodução sexuada ocorre por somatogamia, ou seja, a união de hifas compatíveis, em que, ao final do ciclo, são produzidos basídios com basidiósporos haplóides (Alexopoulos & Mins, 1996).

## **2.2 Valor e consumo dos cogumelos**

A China é o país que possui a mais longa história de cultivo e utilização de fungos na alimentação. Há cerca de 1800 anos os fungos têm sido utilizados como tônico e fonte alimentar (Zhanxi & Zhanhua, 1997).

Muito antes do desenvolvimento da produção de cogumelos nos EUA e Europa, os chineses já haviam atingido grande desenvolvimento no cultivo e utilização de cogumelos de diferentes espécies. Segundo Chang & Miles (1987), *Auricularia auricula* foi o primeiro no ano 600 D.C., enquanto *Flammulina velutipes* foi cultivada por volta de 800-900 D.C. O cultivo de outros cogumelos, como *Lentinula edodes*, *Volvariella volvacea* e *Tremella fuciformis*, foi primeiramente registrado na China, nos anos 1000, 1700 e 1800, respectivamente (Quimio et al., 1990).

O consumo de cogumelos *Agaricus* é estimado em cerca de 60% da demanda mundial, seguido do cogumelo shiitake (*Lentinula edodes*). O consumo de *L. edodes* junto com *Agaricus* apresenta um volume estimado de 90% do total mundial de cogumelos consumidos (Royse & Schisler, 1980).

No passado, os cogumelos eram considerados um alimento luxuoso, especialmente entre os ricos, por causa do seu aroma singular e paladar exótico. Hoje, a popularidade dos cogumelos é deve-se não apenas ao seu valor culinário, mas também ao seu potencial como fonte de proteínas, podendo enriquecer a dieta humana, especialmente em alguns países onde o alimento é escasso e caro (Quimio et al., 1990).

Arora (1986) e Delú (2003) verificaram que uma alta proporção do peso dos cogumelos frescos é constituída de água, portanto, os cogumelos secos apresentam elevado conteúdo protéico, além de serem de fácil digestibilidade.

Os teores protéicos variam consideravelmente entre as espécies de cogumelos, podendo também ter variações dentro de amostras da mesma espécie, dependendo do estágio de desenvolvimento, substrato, condições de cultivo ou, então, pela inexatidão dos métodos de análise usados (Quimio et al., 1990).

A Tabela 1 apresenta a compilação de algumas análises protéicas relatadas por diversos autores.



**TABELA 1** Conteúdo protéico aproximado (peso seco) de alguns cogumelos comestíveis, segundo diferentes autores

Espécies	Conteúdo protéico %	Referência
<i>Volvariella volvacea</i>	21,32 – 30,51	Li & Chang, 1982
	33,33	Garcha, 1976
	29,57	Lee & Chang, 1975
	43,02	Chang, 1964
<i>Agaricus bisporus</i>	19,4 – 37,1	Weaver et al, 1977
	26,3	Bano & Rajarathnam, 1982
	27,8	FAO, 1972
<i>Pleurotus ostreatus</i>	10,5	Bano & Rajarathnam, 1982
	27,38	Khana & Garcha, 1984
	27,4	FAO, 1972
<i>Pleurotus florida</i>	18,9	Bano & Rajarathnam, 1982
	37,19	Khana & Garcha, 1984
<i>Pleurotus sajor-caju</i>	36,94	Khana & Garcha, 1984
<i>Lentinula edodes</i>	17,5	Bano & Bajarathnam, 1982
	13,1	Adriano & Cruz, 1933
	10,3	FAO, 1972
<i>Auricularia auricula-judae</i>	8,1	Adriano & Cruz, 1933
<i>Flammulina velutipes</i>	21,9	Sawada, 1965
<i>Agaricus blazei</i>	34	Delú, 2003

Fonte: Modificado de Quimio et al., 1990

Cogumelos são, ainda, excelentes fontes de muitas vitaminas, como tiamina (B1), riboflavina (B2) e ácido nicotínico, que não são alteradas durante a desidratação ou enlatamento dos cogumelos (Quimio et al., 1990).

Hayes & Hand (1981) demonstraram que somente 3 gramas de cogumelos frescos são suficientes para prover a dose diária recomendada de vitamina B12. Segundo Manning (1985), cogumelos podem conter também vitaminas C (ácido ascórbico) e K. De acordo com Anderson & Feller (1942), vitaminas A, D e E estão presentes apenas em quantidade mínimas. Na Tabela 2 encontra-se o conteúdo vitamínico de alguns cogumelos comestíveis, como relatado por Li & Chang (1982).

**TABELA 2** Conteúdo vitamínico de alguns cogumelos comestíveis

Espécie	Tiamina, riboflavina e niacina			Referência
	Conteúdo (mg/100g)			
<i>Agaricus bisporus</i>	1,1	5,0	55,7	Altamura et al, 1987
<i>Lentinula edodes</i>	7,8	4,9	54,9	FAO, 1972
<i>Volvariella volvacea</i>	0,35	2,97	64,88	FAO, 1972
<i>Volvariella volvacea</i>	0,32	1,63	47,55	Cheng, 1979
<i>Pleurotus spp.</i>	1,16 – 4,8	-	46,108	Bano&Rajarathnam,1982

Fonte: Quimio et al., 1990

Assim como muitos vegetais, cogumelos são boas fontes de minerais. *Volvariella volvacea* é reconhecido por ser rico em potássio, sódio e fósforo e, juntamente com cálcio e magnésio, estes constituem de 56% a 70% do total do seu peso seco (Li & Chang, 1982).

Segundo Bano & Rajarathnam (1982), potássio e fósforo são também importantes constituintes de *Pleurotus*.

Manning (1985) verificou que a concentração de cálcio não é tão significativa em *Lentinula edodes*. No entanto, *Agaricus bisporus* é reconhecido por conter considerável quantidade de potássio, fósforo, cobre e ferro, apesar de também não conter quantidades apreciáveis de cálcio.

Cogumelos enlatados e secos contêm alto conteúdo de minerais tanto quanto cogumelos frescos, embora o aumento da quantidade de sódio e potássio em cogumelos seja atribuída à composição mineral da salmoura usada no enlatamento (Crisan & Sands, 1978).

Os carboidratos também são considerados importantes componentes dos cogumelos. De acordo com Crisan & Sands (1978), a porcentagem de carboidratos varia de 3% a 28% (peso fresco) em diferentes espécies de cogumelos. Li & Chang (1982) afirmaram que o teor de carboidratos em *Volvariella volvacea* varia entre 40% e 50% do seu peso e Bano & Rajarathnam (1982) relataram uma extensão de 46,6% a 81,8% de carboidratos em diferentes espécies de *Pleurotus*.

O conhecimento acerca das propriedades medicinais dos cogumelos tem sua origem no Oriente, onde os fungos já eram amplamente consumidos. A afirmação do alívio ou cura de achaques pelo uso de *Lentinula edodes*, incluindo doenças cujas causas, sabe-se agora, eram viroses, pressão alta e cardiopatias, teve sua origem na medicina praticada durante a dinastia Ming (1368-1644). Substâncias como o polissacarídeo lentinana, uma  $\beta$ -1,3 glucana isolada de *Lentinula edodes* com atividade antitumoral, têm sido testadas em ratos

demonstrando resposta imune dos linfócitos T e a eritadenina (ácido 2(R), 3(R) – dihidroxi-4-(9 adenil) butírico), com atividade anticolesterol e também produzida pelo shiitake, tem atraído a atenção de médicos e cientistas (Hayes & Wright, 1979).

Alguns estudos identificaram a atividade antitumoral do *Agaricus blazei* em roedores e demonstraram que os complexos polissacarídeo-proteína nele presentes são responsáveis por estes efeitos. A fração de polissacarídeo extraída de *Agaricus blazei* que apresenta a atividade antitumoral é composta de um complexo  $\beta$  (1-6)-D-glucano e proteínas (Kawagishi et al., 1989).

Cogumelos comestíveis são fonte potencial de fibras dietéticas: as paredes das células fúngicas contêm quitina, hemicelulose, mananas e, dentre muitos componentes funcionais importantes, as beta-glucanas. Estes componentes homo e heteroglucanas com ligações glucosídicas  $\beta$ (1-3),  $\beta$ (1-4),  $\beta$ (1-6) são, supostamente, a chave para algumas propriedades medicinais dos cogumelos, como o aumento das funções dos macrófagos e a resistência do hospedeiro para muitas bactérias, vírus, fungos e infecções parasitárias; a ativação do estímulo imunológico não específico e a redução da taxa de colesterol e de glicose do sangue (Cheung, 1988; Rajarathnam, Shashirekha & Bano, 1998).

O corpo de frutificação do *A. blazei* contém 85% a 87% de água. Quando desidratado, este cogumelo é rico em proteínas (40% a 45%), carboidratos (38% a 45%), fibras (6% a 8%), total de resíduos (5% a 7%), lipídeos (3% a 4%) e vitaminas (em mg%) como a B1 (0,3mg), B2 (3,2mg) e niacina (49,2mg). Além disso, contém relativamente grande quantidade de ergosterol (0,1-0,2%), que é convertido em vitamina D2. Potássio (2,97%) é o principal componente mineral do *Agaricus blazei* (Mizuno, 1995).

O *Agaricus blazei*, basidiomiceto nativo do sudeste do Brasil, tem sido freqüentemente utilizado na medicina popular principalmente sob a forma de

chá, no combate de vários sintomas como stress, alto nível de colesterol, diabetes e no tratamento de câncer (Mizuno, 1995).



**FIGURA 1** *Agaricus blazei*

### 2.3 Tecnologia de cultivo do *Agaricus blazei*

O cogumelo *Agaricus blazei* é de ocorrência natural nas regiões serranas da Mata Atlântica do sul do estado de São Paulo, isolado na cidade de Piedade. Segundo relatos de produtores, a espécie nativa foi coletada inicialmente pelo agricultor e estudioso Sr. Takatoshi Furumoto, que a cultivou entre as décadas de 1960 e 70. Em 1965, algumas amostras foram enviadas ao Japão, onde é conhecido como “himematsutake”, para estudo de suas propriedades medicinais (Braga et al.,1998).

O *A. blazei* é um cogumelo de clima quente e úmido, portanto, para produzi-lo, deve-se manter as condições climáticas do local, as mais próximas possíveis daquelas consideradas ideais para o seu desenvolvimento, ou seja, temperatura média oscilando entre 25°C e 30°C e umidade relativa do ar elevada. Em canteiros desprotegidos, as condições mais favoráveis ocorrem durante as estações da primavera e do verão (Braga et al.,1998).

Segundo Mizuno (1997), não é fácil manter as condições do solo, temperatura e umidade do ar do local de origem do *A. blazei* para que haja eficiente produção. Porém, o interesse pelo seu cultivo tem crescido e a tecnologia também vem sendo aperfeiçoada.

O seu cultivo abrange as etapas de compostagem e pasteurização, inoculação, incubação, cobertura do substrato, produção do cogumelo, colheita e processamento.

Braga et al. (1998) definem a compostagem como sendo um processo de biodegradação de matérias-primas orgânicas, realizado a altas temperaturas. Há então, o desenvolvimento de populações microbianas que vão utilizar açúcares e nutrientes prontamente disponíveis. Ao final do processo, o composto terá sido transformado em um substrato apropriado para o desenvolvimento do *Agaricus*.

Um dos fatores para o êxito da produção comercial do cogumelo está no composto formado a partir de resíduos orgânicos. As pilhas de matéria-prima

são normalmente formadas de palha de cereal. Feno, trigo, milho, bagaço de cana-de-açúcar, algodão e resíduos de côco podem ser usados, de acordo com as possibilidades oferecidas pelo local de cultivo (Fermor et al, 1985).

Na fase I da compostagem, o material deve estar empilhado durante aproximadamente, 15 dias, mantendo-se a umidade da mesma. Nesta fase, a temperatura pode atingir 80°C no centro da pilha, tornando-se obrigatório o revolvimento do composto (Braga et al., 1998).

A fase II envolve a pasteurização e o condicionamento final. A pasteurização é realizada em instalações fechadas conhecidas como “túneis” ou câmaras de pasteurização. O limite da temperatura nas câmaras de pasteurização deve ser de 60°C, permanecendo assim por um período de 6 a 8 horas (Braga et al., 1998).

Após a pasteurização, com o auxílio de um sistema de ventilação, a temperatura do composto deve ser gradativamente reduzida para 50°C e assim mantida durante 6 a 8 horas, com suprimento de oxigênio. Esta etapa, também chamada de condicionamento, é importante para o desenvolvimento de organismos termofílicos que tornarão o composto mais apropriado para o desenvolvimento do *Agaricus* e menos suscetível ao ataque de contaminantes (Dias et al., 1999).

Para o cultivo de cogumelos, o pH do substrato deve ser mantido entre 7,0 e 7,5, pois o micélio se propaga com maior intensidade no pH neutro ou também ligeiramente alcalino (Molena, 1986).

Finalizadas as etapas I e II da compostagem, o composto acondicionado em sacos plásticos é submetido à inoculação, que é feita manualmente, desagregando-se o inoculante e misturando-o homogeneamente ao composto pasteurizado, seguida da incubação, que deve ocorrer em câmaras com prateleiras numa temperatura em torno de 25°C (Braga et al., 1998).

Após totalmente colonizado, o composto deve ser transferido para o campo ou estufa. Em qualquer um dos sistemas (prateleira ou cama), o composto deve receber uma camada de terra de cobertura. Esta camada é responsável pela variação ambiental necessária para a mudança fisiológica no comportamento do micélio, que passa do estágio vegetativo para o estágio reprodutivo, ou seja, para o desenvolvimento de corpos de frutificação, no caso o cogumelo (Vedder, 1991).

Durante toda a fase de cultivo, deve-se manter a umidade do ar e da terra de cobertura, utilizando-se um sistema de nebulização ou fazendo a rega diária com jato delicado de água, além do controle da temperatura local (Dias et al., 1999).

A colheita, normalmente, se dá 20 a 30 dias após o “plantio” do cogumelo. Após colhidos, os cogumelos são lavados e desidratados, estando então, prontos para a sua comercialização (Dias et al., 1999).

O sucesso da produção de cogumelos depende da manutenção das culturas puras, da capacidade de produção de corpos de frutificação de alta produtividade, excelente sabor, textura e cor, além da resistência a pragas e doenças (Chang & Hayes, 1978).

#### **2.4 Coleções de culturas puras**

O estudo dos fungos em laboratório envolve o uso de culturas vivas que precisam ser mantidas viáveis durante todo o experimento e, quando comprovada a sua importância, devem ser transferidas para as coleções de microrganismos (Smith et al., 1983).

Os métodos de preservação têm como objetivo manter a completa viabilidade e estabilidade das características morfo-fisiológica dos organismos e outras propriedades, como a patogenicidade, em caso de agentes patogênicos. Entretanto, existem aspectos que podem inviabilizar a manutenção de tais



características, como a contaminação por outros organismos, o dessecamento do meio por alterações de temperatura e o esgotamento do meio em função da taxa metabólica de cada espécie (Putzke & Putzke, 1988).

A escolha dos métodos de preservação depende das exigências da coleção e varia de acordo com o número e o grupo de fungos que serão preservados e das disponibilidades. É necessário considerar o custo dos materiais, o trabalho envolvido e o nível desejado de estabilidade e longevidade (Smith et al.,1994).

A Coleção de Recursos Genéticos do Instituto Internacional de Micologia (IMI), localizado em Londres, UK, utiliza a criopreservação e a liofilização como principais métodos de estocagem de fungos. A estocagem em solo e as transferências periódicas são também aplicadas, apesar de apresentarem limitações. Desde 1950, tem sido utilizada a estocagem em óleo mineral, embora estas culturas exijam sempre transferências regulares. Outros métodos ainda utilizados pelo IMI são a estocagem em sílica gel e água destilada (Smith et al.,1994).

Hawksworth et al. (1990) afirmam em seu Guia para Estabelecimento e Operação de Coleções de Microrganismos, que os princípios, objetivos, procedimentos e razões para se montar uma coleção devem ser bem claros e planejados, como, por exemplo, para prover as coleções de referência para serviços de identificação, para apoiar projetos de pesquisa ou para finalidade de ensino em universidades ou colégios.

As coleções fornecem informações valiosas a respeito da diversidade dos microrganismos. Este acervo, além de preservar o material genético das espécies, contribui para as pesquisas de interesse industrial e ambiental (Minter. 1995).

Uma coleção não é capaz de conter representantes de todas as espécies. De acordo com Sugawara et al. (1993), com relação aos fungos, somente 72.000

espécies foram descritas. Todavia, apenas 10 % delas são atualmente pertencentes às coleções de microrganismos.

O contínuo isolamento de novas culturas e a necessidade de sua manutenção para fins industriais, de pesquisa e de ensino têm levado à formação de vastas coleções. Dentre as coleções mundialmente importantes estão: International Mycological Institute (IMI), Inglaterra; American Type Culture Collection (ATCC), EUA; Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS), Holanda; Institute For Fermentation (IFO), Osaska, Japão; Japan Collection of Microorganism (JCM), Wako, Saltama, Japão; Mycotheque De L'Universite Catholique de Luvain (MUCL), Luvain-le-Neuve, Bélgica (Figueiredo 2001).

No Brasil, segundo Figueiredo (2001), as coleções são mantidas em Institutos de Pesquisa, como a coleção do prof. Lacaz, no Hospital de Medicina Tropical de São Paulo, na Fundação Fiocruz no Estado do Rio de Janeiro, na Universidade Federal do Recife, no Instituto Biológico de São Paulo (IBI) e na Fundação André Tozello em Campinas, SP.

O Centro de Pesquisas de Cogumelos Comestíveis (CEPECC) do Instituto de Botânica em São Paulo, mantém em sua micoteca um acervo de 62 exemplares de cogumelos comestíveis, dentre eles amostras de *Agaricus campestris*, *Agaricus sp*, *Agaricus bisporus*, *Agaricus silvaticus* e *Agaricus bitorquis* (site: [www/bdt.org.br](http://www/bdt.org.br)).

De acordo com Smith et al. (1994), não há uma técnica que seja aplicada a todas as espécies de fungos. Os basidiomicetos, com exceção de leveduras, geralmente crescem somente como micélio em culturas e, portanto, apresentam problemas na preservação. Normalmente, tais fungos podem ser preservados apenas por transferências periódicas sobre ágar com ou sem óleo mineral ou em nitrogênio líquido. Produzindo hifas com paredes densas, os fungos podem ser liofilizados, porém, a viabilidade é baixa. Entretanto, basidiósporos provenientes de fungos crescidos em seu meio natural podem usualmente ser liofilizados e

sobrevivem melhor do que a preservação do micélio. Micélios de basidiomicetos que habitam madeiras podem ser mantidos sobre toras de madeira. No entanto, a melhor técnica para preservação de todos os basidiomicetos é a criopreservação abaixo de  $-130^{\circ}$  C. A Tabela 3 relaciona algumas técnicas de preservação mais apropriadas a diversos grupos de fungos.

**TABELA 3** Técnicas de preservação para grupos de fungos

Grupos de fungos	Transferências sobre ágar					Solo	Sílica- gel	Liofilização	Nitrogênio líquido
	Temperatura ambiente	Refrigerador	Óleo mineral	Água	Deep Freezer				
Chytridiomycota	Satisf.	Satisf.	Satisf.	Insat.	Insat.	Satisf.	Falho	Falho	Falho
Zygomycota (exceto Entomophthorales)	Bom	Satisf.	Satisf.	Bom	Satisf.	Bom	Bom	Muito bom	Muito bom
Ascomycota (exceto Laboubeniales)	Bom	Bom	Satisf.	Bom	Bom	Bom	Muito bom	Muito bom	Muito bom
Basidiomycota (a) Micélio	Satisf.	Bom	Bom	Bom	Bom	Bom	Falho	Falho	Bom
(b) Esporos	Satisf.	Satisf.	Bom	Bom	Bom	Bom	Bom	Bom	Muito bom

Satisf. (Satisfatório) – Insat. (Insatisfatório)

Fonte: Modificado de Smith et al. (1994)

51Após a preservação, algumas propriedades das coleções devem ser avaliadas. A pureza do microrganismo deve ser verificada por meio de um exame microscópico cuidadoso. Para assegurar a estabilidade do microrganismo, devem ser feitas comparações antes e após a preservação com relação à morfologia, propriedades bioquímicas e patogenicidade. Todas as observações devem ser registradas e arquivadas para futuras referências. Pode-se também enviar o organismo para o seu doador, para confirmação das propriedades (Smith et al., 1994).

Com relação ao cultivo de cogumelos, a produção do inoculante nem sempre é de responsabilidade dos cultivadores. A maior parte dos produtores adquire inóculos provenientes do mercado comercial deste tipo de produto, sendo o maior interesse do produtor de inoculantes a escolha da amostra a ser utilizada (Quimio et al., 1990).

Segundo Chang & Hayes (1978), por um rápido exame não é possível aferir a qualidade dos inóculos, sendo importante a utilização de um método eficaz de preservação da linhagem escolhida, testado e comprovado.

Independente do método de preservação, é recomendável utilizar sempre culturas novas e vigorosas, atentando para os requerimentos físicos e químicos ideais para o crescimento da espécie (Smith et al., 1994).

## **2.5 Fatores que afetam o crescimento dos fungos**

A tendência natural dos organismos de crescerem em tamanho é intuitivamente reconhecida como crescimento. No entanto, na prática, nem todo aumento é considerado crescimento, e sim atribuído a outros processos, como acúmulos de substâncias, engrossamento de paredes ou alargamentos provenientes da síntese de materiais vindos do exterior (Griffin, 1994).

Em organismos multicelulares, o aumento em número de células e em tamanho de células é considerado crescimento. Organismos unicelulares, como

as leveduras, crescem em tamanho mas, depois, elas se dividem, o que constitui um processo reprodutivo para a célula. Fungos filamentosos cenocíticos aumentam em volume, número de núcleos e quantidade de citoplasma, mas sendo não celulares, eles não crescem em número de células (Griffin, 1994).

Segundo Caldwell (1995), o crescimento microbiano implica no acréscimo da quantidade de citoplasma, formação de novas estruturas e, eventualmente, formação de novas células.

Em vista da complexidade deste processo, não se pode fazer uma definição precisa de crescimento que seja universalmente aceita e aplicada. Reconhecendo este fato, crescimento pode ser definido operacionalmente de acordo com a necessidade do investigador em responder às suas questões (Griffin, 1994).

De acordo com Smith (1994), os fatores que afetam diretamente o crescimento dos fungos são meio ou substrato, temperatura, luz, oxigenação, atividade de água e pH.

Embora os requerimentos para crescimento variem de isolado para isolado, culturas de mesma espécie e gênero tendem a um ótimo crescimento em meios similares. Além disso, a origem dos isolados também pode trazer indicações das condições ideais de crescimento (Smith, 1994).

### **2.5.1 Meio**

Meio de cultura é o material nutriente preparado para o crescimento do microrganismo. Ele deverá conter os nutrientes requeridos pelo microrganismo, bem como quantidade de água necessária, pH ajustado, quantidade específica de oxigênio ou mesmo sua ausência (Tortora et al., 2002).

Os meios de cultura podem ser líquidos ou semi-sólidos do tipo gel. Meios gelatinosos são considerados mais naturais, visto que os substratos naturais de muitos fungos são materiais sólidos ou semi-sólidos como, por

exemplo, madeira, tecidos vegetais ou animais e solo. Gelatina, ágar e sílica gel são usados em meios gelatinosos como agentes solidificantes (Griffim, 1994).

De acordo com Smith (1994), culturas crescem mais satisfatoriamente sobre meios frescos preparados em laboratório, especialmente meio natural com vegetais cozidos. Estes são, geralmente, fáceis e relativamente econômicos de preparar e podem ser transportados com facilidade. Pequenas quantidades podem ser esterilizadas até mesmo usando uma panela de pressão doméstica, na impossibilidade do uso de autoclave. Se necessário, o pH pode ser ajustado acrescentando-se gotas de ácido clorídrico ou hidróxido de potássio.

Uma ampla classe de meios para crescimento de fungos é usada por diferentes pesquisadores. A maioria dos fungos cresce satisfatoriamente em batata-dextrose-ágar (BDA). Espécies de *Fusarium* têm um bom crescimento em batata-sacarose-ágar (PSA). Fungos degradadores de celulose e fungos decompositores, como *Trichoderma*, *Chaetomium* e *Stachybotrys*, mantêm a capacidade para produzir celulase quando crescem em meios pobres como batata-cenoura-ágar (PCA) com um pedaço de papel filtro estéril ou palha de trigo colocado sobre a superfície de ágar (Smith et al., 1983).

Muitos fungos deterioram quando conservados sobre um mesmo meio por período prolongado. Para se evitar esta deterioração, é aconselhável alternar o substrato periodicamente (Smith et al., 1994).

Segundo Chang et al. (1978), um meio nutritivo adequado para manutenção das linhagens é o composto. Ele pode ser congelado e moído com água em um triturador ou pode ser seco e cortado em pedaços de 0,5 cm, moídos e peneirados. O composto seco pode ser guardado indefinidamente e, quando requerido, é umedecido (400 g de composto seco para 1250 mL de água). O composto umedecido é adicionado aos tubos testes e esterilizados por 2 horas em autoclave a 121°C, por dois dias subseqüentes (esterilização fracionada).

Compostos são nutricionalmente complexos e um meio natural para

*Agaricus bisporus*. Se o ágar é usado, é necessário, para a subcultura, um período de 6 a 12 meses (se os tubos são estocados até 3°C), caso contrário, o meio desidrata e aumenta o perigo de contaminações. Por meio do composto, é possível prolongar o intervalo das repicagens em até dois anos (Chang et al., 1978).

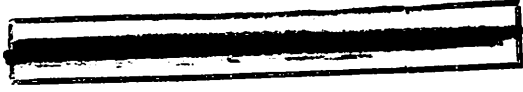
### 2.5.2 Temperatura

Os microrganismos são classificados, de acordo com as variações de temperatura de crescimento, em psicrófilos (crescem em baixas temperaturas), mesófilos (crescem em temperaturas moderadas) e termófilos (crescem em altas temperaturas). Estas definições são flexíveis quando se considera a temperatura máxima e suas variações (Tortora et al., 2002).

Muitos fungos são mesófilos, crescendo entre 10°C a 35°C, embora com diferentes tolerâncias dentro do limite desta faixa e com temperatura ótima entre 20°C a 30°C (Deacon, 1997). O *Agaricus blazei* é um cogumelo que se desenvolve em temperaturas de 24°C a 28°C (Bononi, 1995).

Algumas espécies, como *Aspergillus fumigatus* e *Talaromyces avellaneus*, são termotolerantes, crescendo a altas temperaturas, embora sejam capazes de crescer moderadamente entre 20°C a 25°C. Um número pequeno de espécies (*Chaetomium thermophilum*, *Penicillium dupontii*, *Thermoascus aurantiacus*) cresce e esporula a 45°C e decresce por volta de 20°C, sendo nomeados de termofílicos (Cooney & Emerson, 1964). Poucos fungos (*Hypocrea psychrophila*) são psicrófilos e incapazes de crescer acima de 20°C, enquanto vários outros (um grande número de espécies de *Fusarium* e *Penicillium*) são psicrotolerantes e aptos para crescer, tanto a baixas temperaturas quanto nos limites mesófilos (Smith et al., 1983).





### 2.5.3 Luz

Muitas espécies de fungos crescem bem no escuro, outras porém preferem a luz do dia. Muitos fungos são sensíveis à claridade mas requerem estímulo de luz para esporulação e alguns esporulam melhor debaixo da luz negra (Smith et al., 1994).

Fungos que requerem luz próximo do ultravioleta para esporulação devem crescer em placas de Petri de plástico ou garrafas de plásticos por 3 a 4 dias antes da irradiação. Vidros não são apropriados porque, geralmente, eles são opacos para a luz ultravioleta. Deve-se evitar o crescimento em meio rico porque eles podem causar o crescimento excessivo do micélio; os meios nutricionalmente pobres com batata-cenoura-ágar (PCA) são muito apropriados para a indução de esporulação (Smith et al., 1994).

### 2.5.4 Oxigenação

Quase todos os fungos são aeróbicos e, enquanto crescem em tubos ou frascos, obtêm suficiente oxigênio se vedados com algodão ou tampa frouxa. Poucos fungos aquáticos *Hyphomycetes* requerem oxigenação adicional, por meio de ar borbulhante sem interrupção no meio da cultura líquida para capacitar o crescimento normal e ocorrer a esporulação (Smith et al., 1983).

Segundo Deacon (1997), muitos fungos são aeróbicos obrigatórios pois seu crescimento é marcadamente reduzido se o oxigênio é diminuído. Muitas leveduras e alguns fungos filamentosos (*Fusarium oxysporum*, *Aspergillus fumigatus*) são aeróbicos facultativos, crescendo em condições aeróbicas, mas também em ausência de oxigênio por meio da fermentação de açúcares. Um pequeno grupo de quitridiomictos, os quais crescem em rúmen de mamíferos, são obrigatoriamente anaeróbicos. Um pequeno grupo de fungos aquáticos é obrigatoriamente fermentativo porque não possui mitocôndrias ou citocromos,

21 crescendo em presença ou ausência de oxigênio, mas sempre por meio de fermentação.

### 2.5.5 Atividade de água (a/w)

Todos os microrganismos requerem água para desenvolver mas a quantidade requerida varia largamente de espécie para espécie. Embora a maioria dos fungos filamentosos requeira alto nível de água disponível, uma minoria é capaz de crescer em baixa atividade de água, como *Eurotium sp* e *Xeromyces bisporus*. Alguns destes que ocorrem em conservas ou peixes salgados apenas crescem bem em meios contendo alta concentração de açúcar ou sal. Estes fungos são referidos como xerófilos e halófilos, respectivamente (Smith et al., 1983).

### 2.5.6 pH

De acordo com Deacon (1997), em meios de cultura tamponados, muitos fungos crescem num limite de pH de 4,0 a 8,5 ou algumas vezes, de 3,0 a 9,0. Entretanto, há variações dentro deste limite. Alguns fungos são ácido-tolerantes, incluindo algumas leveduras que crescem no estômago de animais e alguns fungos filamentosos (*Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium spp.*), os quais crescem em pH 2,0. Porém, o pH ótimo das culturas é usualmente 5,5 a 6,0.

De acordo com Gaspar Júnior (2003), ao avaliar o crescimento micelial do isolado de *Agaricus blazei*, os melhores resultados de crescimento foram observados na faixa de pH entre 5 e 6.

## 2.6 Métodos de preservação

Os métodos disponíveis para preservação e estocagem de fungos podem ser divididos em 3 grupos, quais sejam, o método de crescimento contínuo, o de secagem e o de suspensão do metabolismo por congelamento.

A técnica de crescimento contínuo envolve a transferência freqüente do microrganismo de um meio pobre em nutrientes para um meio novo, suprido de ótimas condições de crescimento e também métodos que retardam a necessidade da subcultura, utilizando-se óleo mineral ou água. A estocagem pode ser feita em refrigerador ou freezer (-10°C a -20°C).

A secagem pode ser realizada sobre sílica gel, em solo e por meio de liofilização.

A suspensão do metabolismo para preservação normalmente envolve redução da disponibilidade de água nas células; dessa forma não há condições para que ocorra o processo vital. Para alcançar a suspensão do metabolismo, a temperatura do material congelado deve ser reduzida para abaixo de -70°C, entretanto, para assegurar estas condições em que não ocorram reações físicas ou químicas, a estocagem requer armazenagem abaixo de -139 °C (Morris, 1981). O congelamento pode ser realizado em congeladores mecânicos, os quais são capazes de alcançar a temperatura de -150°C ou até acima da temperatura do nitrogênio líquido (Smith et al., 1994).

### **2.6.1 Subcultura**

Este método consiste na inoculação do microrganismo no meio adequado, incubação para a obtenção do crescimento e estocagem, sob determinadas condições, com repetidas transferências para o meio fresco em intervalos de tempo variáveis de acordo com o microrganismo. Deve-se dar preferência ao meio mínimo porque isto proporciona baixo metabolismo e, assim, prolonga-se o intervalo entre as transferências (Putzke & Putzke, 1988).

Lambert (1959), citado por Chang et al. (1978), demonstrou que inóculos podem ser mantidos por muitos anos com boa manutenção do vigor simplesmente por meio de repicagens sobre meio apropriado. A partir disso, foram conduzidas experiências de manutenção de coleções de culturas no

projeto de pesquisa de cogumelos da Universidade do Estado da Pensilvânia, tendo apenas uma amostra desta coleção se deteriorado após repetidas subculturas.

Para Smith et al. (1994), o sucesso desta manutenção depende da transferência ser feita de partes bem desenvolvidas da cultura, tomando cuidado para assegurar-se de que contaminantes ou variações não foram substituídos na amostra original.

As principais desvantagens deste método são o risco de variações com relação à patogenicidade e às características morfo-fisiológicas ou o perigo de contaminação por esporos levados pelo ar. No entanto, o método de frequentes transferências apresenta também vantagens, pois é econômico, não requer equipamento especializado e, para coleções de pequeno porte, o tempo envolvido não é grande; as coleções podem ser conservadas viáveis por muitos anos se supervisionadas por um especialista, além da recuperação ser muito fácil (Smith et al., 1994).

O intervalo de tempo das transferências varia de acordo com a espécie. A estocagem em baixas temperaturas pode estender o intervalo das repicagens, embora no ultra-congelamento possam ocorrer danificações (Smith et al, 1983).

Putzke & Putzke (1988) recomendam o monitoramento do crescimento, caso seja usada a temperatura ambiente para evitar a desidratação do meio.

### **2.6.2 Manutenção em óleo mineral**

A cobertura de culturas em ágar com óleo mineral previne a desidratação e diminui a atividade metabólica. As culturas desenvolvidas são cobertas com 10 mm de óleo mineral esterilizado em autoclave a 121°C, por 15 minutos (Smith et al., 1983).

Segundo Putzke & Putzke (1988), as culturas submersas em óleo mineral têm consumo de oxigênio reduzido em cerca de 80% e,

conseqüentemente, a taxa metabólica também é reduzida. Recomenda-se, então, que toda a superfície seja coberta o suficiente para que o fungo receba oxigenação e não morra, como também o necessário para que não ocorra a desidratação da cultura.

Este método apresenta vantagens, pois não há necessidade de equipamentos especiais para a sua operacionalização, além de algumas espécies apresentarem longa viabilidade. Espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* permaneceram viáveis durante 40 anos no Instituto Internacional de Micologia na Inglaterra. Organismos que são sensíveis a outras técnicas podem ser estocados com sucesso em óleo, como por exemplo, *Cercospora*, *Arthrobotrys*, *Colletotrichum*, *Conidiobolus*, *Corticium*, *Nodulisporium* e micélio de *basidiomicetos*, todos transferidos num intervalo de 2 anos (Smith et al., 1994).

De acordo com Quimio et al. (1990), culturas estocadas em óleo mineral podem ser mantidas em temperatura ambiente ou refrigerador. Culturas de cogumelos podem ser conservadas por 1 a 3 anos. A viabilidade das características originais pode ser avaliada depois de dois anos de estocagem. Culturas de *Volvariella* não sobrevivem em óleo ou a temperaturas abaixo de 10°C. Por esta razão, elas são conservadas em temperatura ambiente ou em 15°C a 20°C. O único método de longa estocagem recomendado para este cogumelo é a preservação em nitrogênio líquido. Caso isso não seja possível, as culturas de *Volvariella* são estocadas à temperatura ambiente e simplesmente transferidas para novo meio ágar a cada 3 a 5 meses, quando o ágar estiver começando a desidratar.

### **2.6.3 Manutenção em água destilada**

O método de manutenção em água destilada foi originalmente descrito por Castellani (1939, 1967) que estocou fungos patogênicos da espécie humana. Esta técnica consiste em transferir uma porção da cultura para tubo de ensaio ou

vidro próprio com tampa rosqueada contendo água destilada esterilizada em quantidade suficiente para cobrir toda a cultura. Os recipientes são mantidos em temperatura ambiente, por períodos de um a vários anos sem perda da viabilidade (Putzke & Putzke, 1988).

Figueiredo & Pimentel (1975) mantiveram satisfatoriamente a viabilidade e patogenicidade de fungos de plantas utilizando o referido método. Boeswinkel (1976) armazenou 650 patógenos de plantas, incluindo representantes de *Oomycota*, *Ascomycota* e *Basidiomycota*, em água destilada. Todos eles permaneceram viáveis e patogênicos por 7 anos.

Capriles et al. (1989) utilizaram 594 amostras da coleção de fungos do Instituto de Medicina Tropical da Universidade Central de Venezuela, preservadas pelo método de Castellani por um período de 1 a 20 anos. Verificaram que 62% das amostras apresentaram boa recuperação da cultura e mantiveram seu aspecto morfológico original e 90% das amostras de espécies diferentes, preservadas há 20 anos, demonstraram boa viabilidade. Os autores concluíram que este método é satisfatório para muitas espécies de fungos.

A estocagem em água destilada apresenta boa viabilidade, além de ser um método comprovadamente eficiente e econômico, pois não requer equipamento especial e dispendioso (Smith et al., 1994).

#### **2.6.4 Secagem ou desidratação**

A remoção de água reduz o metabolismo da célula podendo ser efetuada por meio de diferentes técnicas. A secagem é realizada pela passagem de ar sobre a cultura ou, então, acelerando a secagem dos esporos por evaporação. Também pode ser realizada colocando-se as células sobre um absorvente como solo, sílica gel ou outro dessecante, ou por liofilização. Muitos esporos de fungos sobrevivem bem em condições secas e apenas revivem quando condições úmidas são restauradas. Muitos fungos possuem forte e grossa parede nos

esporos, desenvolvida provavelmente para sobreviverem à dessecação. Dessa forma, o sucesso da preservação dentro destas condições não é surpreendente. A dormência pode também ser induzida por baixa temperatura e o congelamento pode reduzir a atividade metabólica (Smith et al., 1994).

As matrizes mais comuns utilizadas são areia, solo ou sílica-gel. Faz-se a suspensão do microrganismo em água estéril, quando a matriz for solo ou areia e em leite desnatado gelado a 5%, quando for sílica. Inocula-se na matriz e deixa-se secar à temperatura ambiente por alguns dias. Quando secos (grãos soltos), veda-se o frasco firmemente e estoca-se. Para reativação, alguns grânulos ou os pedaços de papel são inoculados diretamente sobre o meio indicado (Putzke & Putzke, 1988).

A estocagem em sílica-gel tem sido utilizada com sucesso pelo Instituto Internacional de Micologia (IMI) para estocagem de fungos esporulados (Smith & Onions, 1983).

Apesar de resultar em culturas estáveis e ser um método simples sem necessidade de aparatos dispendiosos, Smith et al. (1994) afirmam que esta técnica limita-se a fungos que esporulam, sendo ineficiente para fungos filamentosos ou fungos com delicados e complexos esporos.

Lastra et al. (2002) compararam diversos métodos de preservação, utilizando 9 espécies de fungos patogênicos. As espécies testadas foram armazenadas por um período de 1 ano e meio e avaliadas aos 3, 6, 12 e 18 meses. Foi verificado que, para todos os fungos testados, a estocagem em sílica-gel demonstrou resultados inferiores aos demais.

Na estocagem em solo, a suspensão de esporos em água estéril é adicionada ao solo contido em vidros, permitindo o crescimento em poucos dias. Após cessado o crescimento, são estocados em refrigerador, permanecendo viáveis por longo período e também notadamente estáveis. Este método tem sido usado satisfatoriamente com *Fusarium spp.* e também utilizado pela IMI para

estocagem deste gênero. A sobrevivência é satisfatória e o método é econômico, sem necessidade de equipamentos nem trabalho intenso; no entanto, muitos fungos demonstram variação após a estocagem.(Smith et al., 1994).

A liofilização é uma técnica usada para a preservação de materiais biológicos, pois conserva a forma, a estrutura e a atividade dos produtos. Muitas outras técnicas de secagem causam danos estruturais, resultando em aparecimento de variações. A liofilização, se conduzida corretamente, previne o retraimento da membrana e as mudanças estruturais, além de manter a viabilidade e a atividade de muitos microrganismos resistentes. Apesar de muitos isolados demonstrarem longa viabilidade, esta técnica é mais dispendiosa, pois o processo é complexo e requer, no mínimo, um sistema de vácuo para a sua execução (Smith et al., 1994).

O processo de liofilização consiste na desidratação a vácuo de células previamente congeladas em meio de suspensão, que pode ser leite desnatado, soro sanguíneo, glicose, sacarose ou lactose a 1%. O meio de suspensão deve ser esterilizado previamente. A desidratação sob alto vácuo e o pré-congelamento (com gelo seco) não permitem que as proteínas se desnaturem e previnem contrações celulares (Putzke & Putzke, 1988).

A estocagem deve ser feita a baixas temperaturas e sempre na ausência de luz para evitar a quebra da estabilidade do liofilizado. O teor nutricional, a osmolaridade e a temperatura do fluido de reconstituição são decisivos na recuperação da injúria celular (Putzke & Putzke, 1988).

Em geral, a liofilização é indicada apenas para esporos; hifas jovens de fungos são frágeis e delicadas, não sobrevivendo ao processo (Smith et al., 1994). Infelizmente, por não ser adequada para a manutenção de culturas de fungos, a liofilização não é uma recomendável para culturas de inoculantes de cogumelos, as quais não sobrevivem vigorosas a esta técnica (Jong, 1978).



A liofilização presentemente empregada em muitas coleções de culturas é desenvolvida geralmente para células de leveduras e para esporos de fungos. A Coleção de Culturas de Espécies Americanas (ATCC) desde 1945 utiliza esta técnica de preservação (Jong, 1978).

### **2.6.5 Ultracongelamento ou criogenia**

Abaixando a temperatura do material biológico reduz-se a taxa de metabolismo até que, quando toda a água interna é congelada não mais ocorrem as reações químicas e, conseqüentemente, o metabolismo é suspenso. A estocagem de microrganismos a ultrabaixas temperaturas de  $-190^{\circ}\text{C}$  a  $-196^{\circ}\text{C}$  em nitrogênio líquido é um eficiente método de preservação. Não foram observadas alterações morfológicas ou fisiológicas em 7.354 isolados estocados no Instituto Internacional de Micologia (Smith et al., 1994).

Segundo Jong (1978), o sucesso da preservação de materiais biológicos como bactérias, fungos, células vegetais e animais, sêmen, sangue, tecidos, nematóides, protozoários e algas, tem sido alcançado aplicando-se a criogenia. A temperatura de estocagem comumente usada para o nitrogênio líquido é de  $-196^{\circ}\text{C}$  e para o nitrogênio a vapor é  $-150^{\circ}\text{C}$ . Com a disponibilidade comercial de materiais e equipamentos criogênicos, este processo tem sido vastamente utilizado em todo mundo por vários laboratórios.

As injúrias dos sistemas biológicos por congelamento são complicadas e podem ser tanto físicas quanto químicas, dependendo da velocidade do congelamento e dos agentes crioprotetores. Estas modificações incluem formação de cristais de gelo, pressão, concentração de soluto, disponibilidade de água, temperatura e pH, entre outros. Culturas fúngicas podem ser congeladas mergulhando-se os materiais diretamente no nitrogênio líquido ou pelo procedimento do congelamento controlado. Melhores resultados de

sobrevivência e recuperação dos fungos têm sido obtidos pelo congelamento lento (Jong, 1978).

O descongelamento lento pode causar danos devido à recristalização do gelo durante o aquecimento; por esta razão é recomendável o descongelamento rápido. O congelamento lento e o descongelamento rápido geralmente concedem alta viabilidade (Heckly 1978).

Para a recuperação de culturas fúngicas congeladas em nitrogênio líquido, as ampolas são removidas do refrigerador e descongeladas rapidamente em água a 37°C (banho-maria) até o último vestígio do gelo ser dissipado. Imediatamente após o descongelamento, as ampolas são abertas e as amostras de culturas são assepticamente transferidas para o meio próprio de crescimento (Jong, 1978).

Trabalhando com *Aspergillus flavus*, Mazur (1956) identificou que o aquecimento rápido permitiu grande recuperação da viabilidade dos esporos ultracongelados. Goos et al. (1967) afirmaram que a boa recuperação da viabilidade de esporos congelados em nitrogênio líquido pode ser obtida quando o material for aquecido rapidamente, independente do resfriamento ter sido rápido ou lento.

De acordo com Jong (1978), embora muitos fungos possam sobreviver ao congelamento e descongelamento por curto tempo de estocagem destituídos de crioprotetores, a recuperação é superior após um longo tempo de estocagem quando é usado o agente. Os crioprotetores podem atuar como agentes penetrantes, atravessando a membrana celular e exercendo efeito protetor também dentro do meio intracelular, como, por exemplo, o glicerol e DMSO (dimetilsulfóxido); ou como agentes não penetrantes, ou seja, não atravessando a membrana celular, como sacarose, lactose, glucose, manitol e sorbitol, dentre outros. Meryman (1971) verificou que estes agentes crioprotetores previnem a

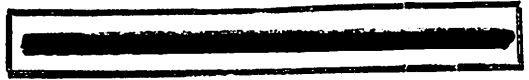
formação de cristais de gelo intracelulares e reduzem a concentração eletrolítica e a desidratação celular durante o resfriamento.

Muitas substâncias químicas têm sido utilizadas como crioprotetores, entretanto, o exato mecanismo de proteção não é totalmente compreendido. A adição de glicerol a uma determinada solução permite uma redução da temperatura de congelamento da solução e, como ele é uma substância capaz de penetrar na célula, tem sido utilizado como crioprotetor celular em diversos organismos, inclusive na criopreservação de fungos (Smith et al., 1994).

Para congelamento de fungos, a Coleção de Culturas de Espécies Americanas (ATCC) usa rotineiramente glicerol (10%) e dimetilsulfóxido (5%) diluídos em água destilada. A solução de glicerol é esterilizada por autoclave e DMSO por filtração (Jong, 1978).

Foram avaliados, por San Antonio e Hwang (1970), os efeitos do ultracongelamento e estocagem das culturas de *Agaricus bisporus* sobre a qualidade e a quantidade dos cogumelos produzidos. Analisou-se a eficácia dos inoculantes de duas amostras de cada cogumelo de cor branca, intermediária e marrom, após 2, 20 e 180 dias de estocagem em nitrogênio líquido. Os resultados demonstraram que não houve diferença significativa na qualidade e quantidade dos corpos de frutificação produzidos pelos inoculantes testados.

O uso do ultracongelamento para estocagem de culturas fúngicas tem sido a técnica mais aceitável para micélio de cogumelos. Tal procedimento de armazenagem apresenta-se com muitas vantagens sobre a prática de, periodicamente, restabelecer o estoque de inoculantes durante o cultivo de cogumelos. Com a criogenia, a variabilidade do inóculo é reduzida, os repetidos testes de produção são eliminados, os danos provenientes da contaminação são evitados e a confiabilidade do inóculo para o cultivo do cogumelo é aumentada. Entretanto, o alto custo do ultracongelamento usando nitrogênio líquido pode ser limitante para coleções de pequeno porte. Mesmo para grandes organizações,



nas quais o custo do equipamento não é problema, o ultracongelamento pode ainda tornar-se desvantajoso, pois o equipamento envolvido requer constante supervisão e cuidadosa manutenção (Quimio et al., 1990).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Obtenção do isolado de *Agaricus blazei*

O isolado de *Agaricus blazei* (CS1) utilizado era proveniente da Coleção de Fungos do Laboratório de Cogumelos Comestíveis, Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras, em Lavras, MG.

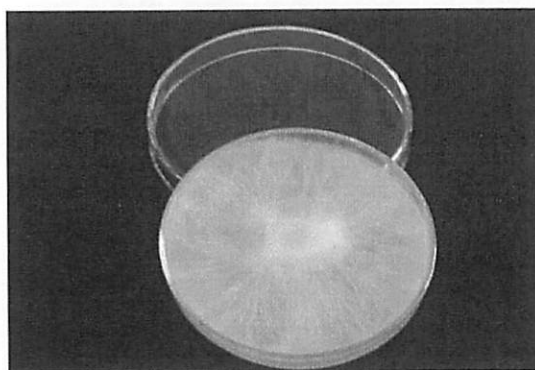
#### 3.2 Condições de cultivo

##### 3.2.1 Produção do inóculo inicial em meio sólido

O isolado foi cultivado em meio BDA com a seguinte composição em g/L de água destilada: extrato de 200 g de batatas sem casca picadas, 15 g de dextrose e 15 g de ágar.

O isolado foi transferido para meio sólido fresco a cada 15 dias, visando à obtenção constante de micélio novo.

O material repicado foi incubado em câmara de incubação (B.O.D.), sob temperatura de 24°C.



**FIGURA 2:** Inóculo produzido em BDA

### 3.2.2 Produção do inóculo inicial em grãos de cereais

Para uma mistura de 1000g, foram fervidos 800 gramas de arroz em casca por 30 minutos, deixando-o escorrer por 15 minutos após a fervura. À parte, foram umedecidos 200 gramas de farelo de trigo com 130 mL de água. Após a mistura homogeneizada, esta foi acondicionada em sacos de polipropileno e submetida à esterilização em autoclave a 121°C, por 30 minutos.

Em seguida, foi acrescentado ao arroz, previamente fervido, o farelo de trigo autoclavado. Esta mistura foi acondicionada em frascos de boca larga, limpos e resistentes à esterilização, ocupando cerca de 75% de seu volume, devidamente vedados com tampa furada e protegida com algodão. Estes foram submetidos à autoclavagem a 121°C por 30 minutos.

Após 24 horas, a mistura foi novamente submetida à esterilização em autoclave a 121°C por 1 hora. Em seguida ao resfriamento da mistura, procedeu-se a inoculação do *A. blazei*. Esta operação envolveu a transferência de fragmentos do micélio das placas com meio BDA para os grãos de cereais, realizada em câmara de fluxo laminar.

Os frascos inoculados e fechados foram mantidos em prateleira, em ambiente asséptico, com temperatura em torno de 25°C a 30°C, para que ocorresse a colonização do fungo.



**FIGURA 3:** Inóculo produzido em grãos de cereais

### **3.3 Acondicionamento, tratamento e estocagem**

#### **3.3.1 Acondicionamento**

No presente trabalho foram realizados dois experimentos distintos.

Inicialmente, para o Experimento I, foram tomados frascos de vidros de 10 mL de volume, de fundo chato e tampa rosqueada, contendo 6 mL de uma das seguintes soluções preservantes: água destilada, óleo mineral ou glicerol (20%). Devido ao fato de os frascos de vidro, anteriormente citados, não resistirem à temperaturas próximas de  $-86^{\circ}\text{C}$ , foram utilizados frascos de plástico apropriados para este tipo de armazenamento.

Após a esterilização destes frascos em autoclave a  $121^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos e posterior resfriamento até à temperatura ambiente, eles receberam os inóculos produzidos em BDA (3.2.1) ou em grãos de cereais (3.2.2). Este procedimento foi realizado em câmara de fluxo laminar.

No experimento II foram utilizados tubos de cultura vedados com algodão, contendo em 1/3 de seu volume, a preparação de solo ou composto. Os processos de esterilização e inoculação foram realizados da forma descrita anteriormente. Após inoculados, os tubos foram conservados em temperatura ambiente por, aproximadamente, 20 dias, até estarem totalmente colonizados. A partir daí, foram armazenados em câmara de incubação a  $10^{\circ}\text{C}$ .

Em alguns tubos de cultura estéreis, grãos de cereais colonizados com *Agaricus blazei* foram ali depositados e utilizados como controle deste experimento, uma vez que esse é o processo empregado na produção de inoculantes para cultivo comercial.

#### **3.3.2 Tratamentos de preservação**

Nas Tabelas 4 e 5 encontra-se a descrição dos tratamentos relativos aos experimentos I e II, respectivamente.

**TABELA 4** Tratamentos de preservação aplicados ao isolado de *Agaricus blazei* (Experimento I)

Tratamento	Substrato	Solução preservante	Temperatura
01	Cereais	Água Destilada	Ambiente
02	BDA	Água Destilada	Ambiente
03	Cereais	Óleo Mineral	Ambiente
04	BDA	Óleo Mineral	Ambiente
05	Cereais	Água Destilada	4°C
06	BDA	Água Destilada	4°C
07	Cereais	Óleo Mineral	4°C
08	BDA	Óleo Mineral	4°C
09	Cereais	Glicerol	-20°C
10	BDA	Glicerol	-20°C
11	Cereais	Glicerol	-86°C
12	BDA	Glicerol	-86°C

**TABELA 5** Tratamentos de preservação aplicados ao isolado de *Agaricus blazei* (Experimento II)

Tratamento	Substrato	Temperatura
13	Cereais	Ambiente
14	Cereais	4°C
15	Composto *	Ambiente
16	Composto **	Ambiente
17	Composto *	10°C
18	Composto **	10°C
19	Solo *	10°C
20	Solo **	10°C

\* Inoculado com discos de micélio em BDA (3.2.1)

\*\* Inoculado com micélio em grãos de cereais (3.2.2)



A mistura de cereais teve em sua formulação 80% de arroz e 20% de farelo de trigo tendo sido preparada da forma descrita no item 3.2.2.

O composto utilizado foi obtido no Laboratório de Cogumelos Comestíveis do Departamento de Biologia da UFLA, tendo em sua formulação bagaço de cana-de-açúcar (50%), capim coast-cross (50%), farelo de trigo (10%), calcáreo (2%), gesso (2%), superfosfato simples (1%), cloreto de potássio (1%), sulfato de amônio (2%) e uréia (1%).

Após terem ocorrido os processos de compostagem e de pasteurização, uma parcela deste material foi retirada, cortada em fragmentos de 5 a 10 mm e, em seguida, acondicionada nos tubos de cultura, conforme descrito no item 3.3.1.

Seguindo metodologia adotada em laboratórios para preservação em solo, utilizando-se de uma medida padrão (recipiente de 300 mL), o solo foi preparado contendo em sua composição terra de barranco (1 parte), areia (2 partes), composto orgânico (2 partes) e água destilada ( $\frac{1}{2}$  parte). O composto orgânico foi constituído de palha de feijão, palha de café, cama de frango (serragem e fezes) e restos de vegetais.

Foram peneirados separadamente a terra, a areia e o composto. Após serem misturados, foi adicionada água em pequenas quantidades até se obter uma mistura homogênea de consistência pouco úmida. O pH foi mantido em 6,0 e a mistura foi deixada à sombra por 24 horas. Após a secagem, foi acondicionada em tubos de cultura acrescida de 1,5 mL de água esterilizada. Procedeu-se a esterilização e inoculação, conforme descrito no item 3.3.1 (Manual de Técnicas de Preservação de Fungos/Laboratório de Fitopatologia-UFLA).

### **3.3.3 Período de estocagem**

O isolado de *A. blazei* foi estocado por um período de 12 meses (Experimento I) e 10 meses (Experimento II) obedecendo às condições de cada tratamento.

### **3.4 Avaliação da viabilidade da cultura**

Mensalmente, os inóculos armazenados e uma pequena porção de cereais, composto e solo foram transferidos para placas de Petri com meio BDA. Esta operação foi realizada em câmara de fluxo laminar.

A eficiência dos tratamentos de preservação estudados foi avaliada pela recuperação da cultura de forma visual ou pela medida do diâmetro do crescimento micelial.

### **3.5 Delineamento experimental e análise estatística**

O experimento foi conduzido em laboratório com delineamento inteiramente casualizado (DIC) em três repetições.

A análise dos resultados foi realizada pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Viabilidade de *A. blazei* preservado em diferentes condições

Uma visão geral da eficácia dos diversos tratamentos de preservação do isolado de *Agaricus blazei* durante 12 (doze) meses de estocagem pode ser obtida na Tabela 6.

**TABELA 6** Avaliação dos métodos de preservação aplicados ao *A. blazei* (\* valores médios do diâmetro de crescimento micelial em mm/dia)

Tratamentos	Médias *
01. Cereais/água/ambiente	4,8 a
02. BDA/água/ambiente	3,69 b
04. BDA/óleo mineral/ambiente	1,84 c
08. BDA/óleo mineral/ 4°C	1,77 c
03. Cereais/óleo mineral/ambiente	1,12 d
06. BDA/água/ 4°C	1,09 d
05. Cereais/água/ 4°C	0,97 d
07. Cereais/óleo mineral/ 4°C	0,53 e
09. Cereais/glicerol/ - 20°C	0 f
10. BDA/glicerol/ - 20°C	0 f
11. Cereais/glicerol/ - 86°C	0 f
12. BDA/glicerol/ - 86 °C	0 f

\* As médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade (DMS = 0,59)

De forma geral, o método de preservação em água destilada sob temperatura ambiente (Tabela 6), consagrado pelo bacteriologista italiano Aldo Castellani apresentou resultados superiores em relação aos demais tratamentos.

A preservação em óleo mineral (Trat. 04 e 08 - Tabela 6) apresentou bons resultados, independentemente da temperatura de armazenamento, quando se tratava do micélio em BDA, não ocorrendo o mesmo com relação ao cultivo em cereais.

Observou-se ainda, que, ao se retirar os grãos de cereais, após o período de armazenamento de cada tratamento, estes apresentavam um aspecto como se nenhum ou pouco micélio estivesse aderido à sua superfície, inferindo-se daí que a aderência do óleo pode ter removido o micélio ou, uma outra possível justificativa é de que a colonização do fungo em grãos de cereais acontece de forma superficial. Isto pode justificar os resultados referentes aos cereais em comparação ao BDA. Nesse caso, o presente estudo sugere que o meio BDA parece ser o mais indicado em relação aos cereais (Smith et al., 1983).

No entanto, contrariamente ao exposto, isso não foi observado quando utilizou-se a água destilada como preservante, sendo obtidos, neste caso, os melhores resultados com relação à recuperação da cultura.

De acordo com Smith et al. (1994), não se sabe se o metabolismo é totalmente suspenso ou se o mesmo é somente reduzido nas preservações a baixas temperaturas. Pelos resultados obtidos neste trabalho pode-se inferir que a redução da temperatura de preservação a  $-20^{\circ}\text{C}$  e/ou  $-86^{\circ}\text{C}$  alterou a viabilidade celular do isolado preservado, demonstrando ser totalmente ineficiente.

Segundo o autor citado, a estocagem em baixas temperaturas pode estender o intervalo das repicagens, entretanto, pode ocasionar danos celulares irreversíveis.

No presente estudo, o congelamento com glicerol não demonstrou ser eficiente, uma vez que nenhum crescimento micelial foi obtido na recuperação da cultura, nas preparações em que se empregou este crioprotetor.

Entretanto, não se pode descartar que, no processo de resfriamento/congelamento, danos irreversíveis às células possam ter ocorrido, o que impediu a retomada do crescimento micelial (Tabela 6). Isto também tem sido verificado quando a cultura em placa é mantida em geladeira.

Outra possível justificativa pode ser atribuída ao fato de o glicerol, por ser um agente crioprotetor penetrante, necessitar de tempo para penetrar no organismo. Segundo Hwang et al. (1976), apesar do glicerol oferecer bons resultados, esta demora pode ocasionar danificações nos organismos.

#### **4.2 Viabilidade de *A. blazei* preservado em água destilada**

A Tabela 7 apresenta os resultados dos tratamentos de preservação em água destilada sob diferentes condições de temperatura, em cada mês de estocagem.

**TABELA 7** Avaliação da preservação de *A. blazei* em água destilada em relação ao tempo de estocagem (\* valores médios do diâmetro de crescimento micelial em mm/dia)

Tempo de Estocagem (meses)	Tratamento 01		Tratamento 02		Tratamento 05		Tratamento 06	
	Cereais/ Ambiente	A	BDA/ Ambiente	A	Cereais/ 4°C	A	BDA/ 4°C	A
01	5,8 a	A	6,0 a	A	6,0 a	A	5,8 a	A
02	6,0 a	A	6,0 a	A	5,6 a	A	5,6 a	A
03	6,0 a	A	6,0 a	A	0 b	C	1,7 b	B
04	4,5 b	B	6,0 a	A	0 b	C	0 c	C
05	2,3 c	B	6,0 a	A	0 b	C	0 c	C
06	6,0 a	A	6,0 a	A	0 b	B	0 c	B
07	4,5 b	B	5,5 a	A	0 b	C	0 c	C
08	6,0 a	A	2,4 b	B	0 b	C	0 c	C
09	4,3 b	A	0,4 c	B	0 b	C	0 c	C
10	6,0 a	A	0 c	B	0 b	B	0 c	B
11	6,0 a	A	0 c	B	0 b	B	0 c	B
12	6,0 a	A	0 c	B	0 b	B	0 c	B

\* As médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey, a 5% de probabilidade (DMS = 0,59). Letras minúsculas e maiúsculas comparam respectivamente, médias nas colunas e nas linhas.

A partir do 8º mês ocorreu decréscimo significativo na recuperação do crescimento micelial (Trat.02), enquanto o Trat.01 manteve, até a última avaliação, os mesmos valores estatísticos em relação à primeira avaliação.

A preservação de micélio de *A. blazei* em água à temperatura de 4°C (Trat. 05 e 06) demonstrou ser ineficiente a partir do 3º mês de estocagem,

mesmo quando se comparam os valores obtidos para um mesmo tratamento ao longo do tempo ou entre diferentes tratamentos para um mesmo mês.

Portanto, sugere-se o tratamento 01 (cereais/água destilada/ambiente) para a conservação do isolado de *Agaricus blazei* por um período de 12 meses. Para períodos inferiores a 8 meses pode-se também utilizar o tratamento 02 (BDA/água destilada/ambiente) por apresentar valores estatisticamente iguais ou até superiores ao tratamento 01.

Entretanto, deve-se considerar que as variações observadas para o tratamento 01 parecem referir-se a outros fatores e não ao método em si, uma vez que seria impossível haver perda da viabilidade celular num mês e um aumento nesta recuperação no mês subsequente. Um dos fatores pode estar ligado à manipulação do operador, pois a retirada de grãos de cereais é bastante subjetiva, podendo-se retirar grãos com quantidade reduzida de micélio resultando em uma fonte com menor quantidade de inóculo.

Tempo, custo e trabalho podem ser poupados conforme o método aplicado. A manutenção em água destilada é recomendável porque é um método comprovadamente eficiente e econômico, não necessitando de equipamento especial e dispendioso, além de apresentar boa viabilidade (Smith et al., 1994).

#### **4.3 Viabilidade de *A. blazei* preservado em óleo mineral**

A Tabela 8 apresenta os resultados dos tratamentos de preservação em óleo mineral sob diferentes condições de temperatura, em cada mês de estocagem.

**TABELA 8** Avaliação da preservação de *A. blazei* em óleo mineral em relação ao tempo de estocagem (\* valores médios do diâmetro de crescimento micelial em mm/dia)

Tempo de Estocagem (meses)	Tratamento 03		Tratamento 04		Tratamento 07		Tratamento 08	
	Cereais/ Ambiente		BDA/ Ambiente		Cereais/ 4°C		BDA/ 4°C	
01	3,5	a B	4,8	a A	3,2	a B	4,3	a A
02	3,4	a B	2,4	cd C	3,1	a B	4,1	a A
03	2,4	b B	3,0	b A	0	b C	3,1	b A
04	2,0	b C	4,6	a A	0	b D	2,9	bc B
05	2,0	b B	2,6	bc A	0	b C	2,4	c AB
06	0	c C	2,5	bcd A	0	b C	1,7	d B
07	0	c B	2,0	d A	0	b B	2,4	c A
08	0	c	0	e	0	b	0	e
09	0	c	0	e	0	b	0	e
10	0	c	0	e	0	b	0	e
11	0	c	0	e	0	b	0	e
12	0	c	0	e	0	b	0	e

\* As médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey, a 5% de probabilidade (DMS = 0,59). Letras minúsculas e maiúsculas comparam respectivamente, médias nas colunas e nas linhas.

Analisando-se os dados da Tabela 8 verificou-se que, nos tratamentos 04 (BDA/óleo mineral/ambiente) e 08 (BDA/óleo mineral/4°C), a recuperação do crescimento micelial de *A. blazei* foi obtida até o 7º mês de estocagem, enquanto que, para os tratamentos 03 (cereais/óleo mineral/ambiente) e 07 (cereais/óleo mineral/4°C), a recuperação cessou a partir do 6º e do 3º mês, respectivamente. Nota-se ainda, que, nos tratamentos 04 e 08 a recuperação manteve basicamente



os mesmos valores entre si, não existindo diferença significativa para o 7º mês. Observando-se os resultados do armazenamento a 4°C, nota-se que o óleo mineral pareceu ter exercido algum efeito protetor quando se tratou de BDA.

Todavia, do 8º ao 12º mês, para todos os tratamentos estudados da Tabela 8, o crescimento micelial foi nulo, indicando ser o óleo mineral um preservativo menos eficaz que a água destilada (Tabela 7) para estocagem superior a este período. De acordo com Putzke & Putzke (1988), a aderência do óleo pode retardar o crescimento micelial durante a recuperação.

Segundo Quimio et al. (1990), culturas de *Volvariella*, também pertencentes à ordem *Agaricales*, não sobrevivem em óleo mineral.

#### **4.4 Viabilidade de *A. blazei* preservado em diferentes substratos e na ausência de preservante**

Os tratamentos 13 e 14, utilizando cereais como substrato, foram testados por serem empregados na produção de inoculantes para cultivo comercial, sendo utilizados como controle deste experimento.

Os tratamentos 15, 16, 17 e 18, utilizando composto como substrato, foram testados baseando-se no fato de que, segundo Chang et al. (1978), o composto é um meio natural complexo e nutritivo, especialmente adequado para a manutenção das linhagens.

Os tratamentos 19 e 20, utilizando solo como substrato, foram testados pelo fato de o *A. blazei* ser um fungo descoberto em solo de florestas tropicais brasileiras (Mizuno, 1997).

Além da temperatura ambiente, avaliou-se também a temperatura de 10°C, na tentativa de reduzir o metabolismo do fungo, pois o *Agaricus blazei* é um cogumelo que se desenvolve bem em temperaturas entre 24°C e 28°C (Bononi, 1995), procurando, desta forma, manter sua viabilidade por um maior período de tempo.

Na Tabela 9 encontram-se os resultados dos tratamentos de preservação em cereais, solo e composto, na ausência de solução preservante, durante um período de 10 meses de armazenamento, sob diferentes condições de temperatura.

**TABELA 9** Avaliação dos tratamentos de preservação aplicados ao *A. blazei* num período de 10 meses

Tratamentos	Tempo de Armazenamento (meses)										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
13. cereais/amb	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+-	---	---
14. cereais/4°C	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
15. comp/BDA/amb	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+-	---	---
16. comp/cereais/amb	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+-
17. comp/BDA/10°C	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
18. comp/cereais/10°C	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
19. solo/BDA/10°C	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
20. solo/BDA/10°C	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

Legenda: (+) Recuperação celular (-) Não recuperação celular  
 (comp) composto / (amb) ambiente  
 Cada sinal indica uma repetição (1 placa)

A preservação em cereais sob temperatura de 4°C (Trat. 14) foi totalmente ineficiente desde o primeiro mês de sua avaliação. Notou-se, ainda, por observação visual, que o meio desidratou rapidamente em comparação com o tratamento 13 (cereais/ambiente). Isto talvez possa ser justificado pela redução da temperatura de armazenamento e ausência do preservante, principalmente quando se comparam os resultados do Experimento I para o tratamento cereais/água destilada/ambiente (Tabela 6).

Pelos resultados, nota-se que, a partir do 8º mês de armazenamento, o tratamento 13 tornou-se menos eficiente em relação aos demais tratamentos, pois houve um decréscimo na recuperação da cultura, não tendo sido observado nenhum crescimento micelial no 10º mês. Nesse mesmo sentido, o tratamento 15 (composto/BDA/ambiente) apresentou drástica redução na capacidade de recuperação da cultura a partir do 10º mês.

A análise conjunta desses dados reforça os resultados apresentados na Tabela 6, em que verifica-se que o tratamento cereais/água destilada/temperatura ambiente apresentou desempenho superior na recuperação da cultura em relação ao meio BDA.

Por outro lado, os tratamentos 17 e 18, utilizando o composto como substrato, bem como os tratamentos 19 e 20, utilizando o solo, demonstraram ser mais eficientes que os demais, da primeira à última avaliação. Isto pode ser justificado pela temperatura de armazenamento adotada (10°C), o que, possivelmente, pode ter possibilitado redução do metabolismo sem a sua suspensão absoluta.

Até a realização desta última análise, o tipo de substrato utilizado na preservação do isolado parece não ter exercido nenhum efeito significativo sobre a viabilidade da cultura. Neste caso, sugere-se a continuidade dessas avaliações para que se possa verificar a eficácia destes tratamentos.

## 5 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, conclui-se que:

- para preservação de *A. blazei* por um período de 12 meses recomenda-se o tratamento cereais/água destilada/ambiente (Trat.01);
- para preservação de *A. blazei* até 7 meses, pode-se também utilizar o tratamento BDA/água destilada/ambiente (Trat. 02);
- o armazenamento a 4°C utilizando água destilada, tanto com cereais quanto BDA, foi ineficaz para períodos superiores a 2 meses;
- para preservação em óleo mineral, tanto a 4°C quanto à temperatura ambiente, o meio BDA apresentou melhores resultados do que cereais;
- a conservação de micélios de *A. blazei* sob temperaturas de -20°C e -86°C não é recomendável;
- a preservação em cereais a 4°C (Trat. 14) mostrou-se ineficaz;
- a preservação em cereais (Trat.13) ou composto (Trat. 15 e 16), sob temperatura ambiente, apresentou redução na eficácia até a data avaliada;
- a preservação a 10°C mostrou-se bastante eficiente por um período de 10 meses, utilizando-se como substrato tanto o solo quanto o composto (Trat. 17, 18, 19 e 20), sugerindo maiores estudos para verificação da eficácia destes tratamentos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W. **Introductory mycology**. New York: John Wiley, 1996. 632 p.
- ANDERSON, E. E.; FELLERS, C. R. The food value of mushrooms (*Agaricus campestris*). **Proceedings of the American Society for Horticultural Science**, New York, v. 41, p. 301-304, July 1942.
- ARORA, D. **Mushrooms demystified: a comprehensive guide to fleshy fungi**. Berkeley: Ten Speed Press, 1986. 959 p.
- BANO, Z.; RAJARATHNAM, S. Pleurotus mushrooms as a nutrition food. In: CHANG, S. T.; QUIMIO, T. H. (Ed.). **Tropical Mushrooms: their biological nature and cultivation methods**. HongKong: The Chinese University Press, 1982. p. 363-380.
- BERBEE, D. J.; TAYLOR, J. W. 2 Ascomycete classes based on fruiting-body characters and ribosomal DNA-sequence. **Molecular Biology and Evolution**, Lawrence, v. 9, n. 2, p. 278-284, Mar. 1992.
- BOESWINKEL, H. J. Storage of fungal cultures in water. In: SMITH, D.; ONIONS, A. G. H. **The preservation and maintenance of living fungi**. England: CAB International, 1994. p. 3-5.
- BONONI, V. L. R.; CAPELARI, M.; MAZIERO, R.; TRUFEM, S. F. B. **Cultivo de cogumelos comestíveis**. São Paulo: Edito Ícone, 1995. 206 p.
- BRAGA, G. C.; EIRA, A. F.; CELSO, P. G.; COLAUTO, N. B. **Manual do cultivo de *Agaricus blazei* Murr. "Cogumelo do Sol"**. Botucatu -SP: FEPAF-UNESP, 1998.
- BRUNS, T. D.; WHITE, T. J.; TAYLOR, J. W. Fungal molecular systematics. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, v. 22, p. 525-564, 1991.
- CALDWELL, D. R. **Microbial physiology & metabolism**. Dubuque, Iowa, 1995. p. 353.

- CAPRILES, C. H.; MATA, S.; MIDDELVEEN, M. Preservation of fungi um water (Castellani): 20 years. *Mycopathologia*, Dordrecht, v. 106, n. 2, p. 73-79, May 1989.
- CASTELLANI, A. Maintenance and cultivation of common Pathogenic fungi of a man in sterile distilled water. Further researches. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, Oxford, v. 70, n. 8, p. 181-184, Aug. 1967.
- CASTELLANI, A. Viability of some pathogenic fungi in distilled Water. In: SMITH, D.; ONIONS, A. G. H. *The preservation and maintenance of living fungi*. England: CAB International, 1994. p. 27-28.
- CHANG, S. T.; HAYES, W. A. *The biology and cultivation of edible Mushrooms*. London: Academic Press, 1978. p. 819.
- CHANG, S. T.; MILES, P. G. Historical record of the early cultivation of *Lentinus* in China. In: QUIMIO, T. H.; CHANG, S. T.; ROYSE, D. J. *Technical guidelines for mushroom growing in the tropics*. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1990. 153 p.
- CHEUNG, P. C. K. Functional properties of edible mushrooms. *Journal Of Nutrition*, Bethesda, v. 118, n. 1128, p. 1512-1516, 1988. Supplement.
- COONEY, D. G.; EMERSON, R. Thermophilic fungi. In: SMITH, D.; ONIONS, A. G. H. *The preservation and maintenance of living fungi*. England: CAB International, 1994.
- CRISAN, E. V.; SANDS, A. Nutritional value. In: CHANG, S. T.; HAYES, W. A. *The biology and cultivation of edible mushrooms*. New York: Academic Press, 1978. p. 137-168.
- DEACON, J. W. *Modern mycology*. USA: Blackwell Science, 1997. p. 303.
- DELÚ, M. A. da F. *Caracterização de basidiocarpos desidratados de *Agaricus blazei**. 2003. 49 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- DIAS, E. S.; LABORY, C. G.; STANGARLIN, J. R. *Biologia e cultivo de cogumelos comestíveis*. Lavras: FAEPE-UFLA, 1999.

DORNBERG, K.; SCHADE, W.; TRESSELT, D.; ZURECK, A.; RADICS, L. Antibiotics from basidiomycetes. Evidence for the occurrence of the 4-hydroxybenzenediazonium ion in the extracts of *Agaricus xantodermus* Genevier (Agaricales). *Tetrahedron Letters*, Oxford, v. 27, n. 5, p. 559-560, 1986.

FERMOR, T. R.; RANDLE, P. E.; SMITH, J. F. Compost as a substrate and its preparation. In: FLEGG, P. B.; SPENCER, D. M.; WOOD, D. A. **The biology and technology of cultivation mushrooms**. New York: J. Wiley, 1985. p. 81-109.

FIGUEIREDO, M. B. Métodos de preservação de fungos patogênicos. *O Biológico*, São Paulo, v. 63, n.1/2, p. 73-82, 2001.

FIGUEIREDO, M. B.; PIMENTEL, C. P. V. Métodos utilizados para conservação de fungos na micoteca de seção de micologia fitopatológica de Instituto Biológico. In: SMITH, D.; ONIONS, A. G. H. **The preservation and maintenance of living fungi**. England: CAB International, 1994. p. 27-28.

GASPAR JÚNIOR, P. J. **Requerimentos nutricionais e caracterização enzimática de isolados do cogumelo *Agaricus blazei***. 2003. 66 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

GOOS, R. D.; DAVIS, E. E.; BUTTERFIELD, W. Effect of warming rates on the viability of frozen fungus spores. *Mycologia*, New York, v. 59, n. 1, p. 58-66, Jan. 1967.

GRIFFIN, D. H. **Fungal physiology**. Wiles-Liss: New York, 1994. p. 458.

HAWKSWORTH, D. L.; SASTRAMIHARDJA, I.; KOKKE, R.; STEVENSON, R. Guidelines for the establishment and operation of collections of cultures of microorganisms. In: SMITH, D.; ONIONS, A. G. H. **The preservation and maintenance of living fungi**. England: CAB International, 1994. p. 3-5.

HAYES, W. A.; HAND, P. Vitamin B<sub>12</sub> in substrates and fruit bodies of *Agaricus bisporus*. **Mushroom Science**, Jaxley, v. 11, n. 2, p. 177-181, 1981.

HAYES, W. A.; WRIGHT, S. H. Edible mushrooms. In: ROSE, A. H. **Economic microbiology: microbial biomass**. London: Academic Press, 1979. p. 39-176.



HECKLY, R. J. Preservation of microorganisms. **Advances in Applied Microbiology**, New York, v. 24, p. 1-53, 1978.

HWANG, S. W.; KWOLEK, W. F.; HAYNES, W. C. Investigation of ultra-low temperature for fungal cultures. III. Viability and growth rate of mycelial cultures following cryogenic storage. **Mycologia**, New York, v. 68, n. 2, p. 77-387, Mar./Apr. 1976.

KAWAGISHI, H.; INAGAKI, R.; KANAOKA, T.; MIZUNO, T.; SHIMURA, K.; ITO, H.; HAGIWARA, T.; NAKAMURA, T. Fractionation and Antitumor activity of the water-insoluble residue of *Agaricus blazei* Fruiting bodies. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 186, n. 2, p. 267-273, Mar. 1989.

JONG, S. C. Conservation of reference strains of *Fusarium* in pure culture. In: SMITH, D.; ONIONS, A. G. H. **The preservation and maintenance of living fungi**. England: CAB International, 1994.

LAMBERT, E. B. Improving spawn cultures of cultivated mushrooms. In: CHANG, S. T.; HAYES, W. A. **The biology and cultivation of edible mushrooms**. New York: Academic Press, 1959. p. 246.

LASTRA, C. C. L.; HAJEK, A. E.; HUMBER, R. A. Comparing methods of preservation for cultures of entomopathogenic fungi. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 80, n. 10, p. 1126-1130, Oct. 2002.

LI, G. S. F.; CHANG, S. T. Nutritive value of *Volvariella volvacea*. In: CHANG, S. T.; QUIMIO, T. H. (Ed.) **Tropical Mushrooms: their biological nature and cultivation methods**. HongKong: The Chinese University Press, 1982. p. 199-219.

MANNING, K. Food value and chemical compositions. In: FLEGG, P. B.; SPENCER, D. M.; WOOD, A. D. **The biology and technology of cultivation mushrooms**. New York: J. Wiley, 1985. p. 211-230.

MAZUR, P. Studies on the effects of subzero temperatures on the viability of spores of *Aspegillus flavus*. In: CHANG, S. T.; HAYES, W. A. **The biology and cultivation of edible mushrooms**. New York: Academic Press, 1956. 819 p.

MERYMAN, H. T. Cryoprotective agents. **Criobiology**, San Diego, v. 8, n. 2, p. 173-183, 1971.

MINTER, D.W. Dried reference collections as a microbiological resource. In: Allsop, D., Colwell, R.R., Hawksworth, D.L. **Microbial diversity and ecosystem function**. CAB International, Wallingford, 1995, p. 403-404

MIZUNO, T. Bioactive biomolecules of mushrooms – food, function and medicinal effect of mushroom fungi. **Food Review International**, New York, v. 11, n. 1, p. 7-21, 1995.

MIZUNO, T. **Solução para o câncer através da alimentação**. São Paulo: Paulo's Comunicação e Artes Gráficas, 1997.

MOLENA, O. **O moderno cultivo de cogumelos**. São Paulo: Nobel, 1986. 170 p.

MORRIS, G. J. Cryopreservation: an introduction to cryopreservation in culture collections. In: SMITH, D.; ONIONS, A. G. H. **The preservation and maintenance of living fungi**. England: CAB International, 1994.

PEGLER, D. N.; SPOONER, B. **Identifying mushrooms**. New Jersey: Chartwell Books, 1984. 80 p.

PUTZKE, J.; PUTZKE, M. T. L. **Os reinos dos fungos**. Santa Cruz do Sul: EDUN/ SC, 1988. v. 1.

QUIMIO, T. H.; CHANG, S. T.; ROYSE, D. J. **Technical guidelines for mushroom Growing in the tropics**. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1990. 153 p.

RAJARATHNAM, S.; BANO, Z. *Pleurotus* mushrooms. Part IB. Pathology, in vitro and in vivo growth requirements, and world status. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 26, n. 3, p. 243-311, Jan. 1988

RAJARATHNAM, S.; BANO, Z. *Pleurotus* mushrooms. Part III. Biotransformation of natural lignocellulosic wastes: comercial applications and implications. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 28, n. 1, p. 31-113, Jan. 1989

RAJARATHNAM, S.; SHASHIREKHA, M. N.; BANO, Z. Biodegradative and biosynthetic capacities of mushrooms: present and future Strategies. **Critical Reviews in Biothecnology**, Boca Raton, v. 18, n. 2/3, p. 91-236, 1998.

ROYSE, D. J.; SCHISLER, L. C. Mushrooms, their consumption, production and culture development. In: QUIMIO, T. H.; CHANG, S. T.; ROYSE, D. J. **Technical guidelines for mushroom growing in the tropics**. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1990. 153 p.

SAN ANTONIO, J. P.; HWANG, S. W. Liquid-nitrogen preservation of spawn stocks of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus*. In: CHANG, S. T.; HAYES, W. A. **The biology and cultivation of edible mushrooms**. New York: Academic Press, 1970. 819 p.

SMITH, D.; ONIONS, A. H. S. **The preservation and maintenance of living fungi**. England: CAB International, 1983.

SMITH, D.; ONIONS, A. H. S. **The preservation and maintenance of living fungi**. 2. ed. England: CAB International, 1994.

SUGAWARA, H.; MA, J.; MIYAZAKI, S.; SHIMURA, J.; TAKISHIMA, Y. World directory of collections of cultures of microorganisms. In: SMITH, D.; ONIONS, A. G. H. **The preservation and maintenance of living fungi**. England: CAB International, 1994. p. 3-5.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2002. 827 p.

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: EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2001.

VEDDER, P. J. C. **Cultivo moderno del champiñón**. Madrid: Ediciones Mundi – Prensa, 1991. 370 p.

ZHANXI, L.; ZHANHUA, L. Jun-cao technology. Fuzhou: Asia-Pacific Fungi Cultivation Training Center, 1997. 129 p.

## ANEXOS

ANEXO A

Página

Tabela 1A Avaliação dos tratamentos de preservação aplicados ao isolado de de <i>Agaricus blazei</i> , durante 12 meses.....	58
---	----

TABELA 1A Avaliação dos tratamentos de preservação aplicados ao isolado de *Agaricus blazei*, durante 12 meses

TRATAMENTOS	TEMPO DE ARMAZENAMENTO (meses)											
	* valores médios de diâmetro de crescimento micelial em mm/ dia											
	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
1. Cereais/ água/ ambiente	5,8 a	6,0 a	6,0 a	4,5 b	2,3 b	6,0 a	4,5 b	6,0 a	4,3 a	6,0 a	6,0 a	6,0 a
2. BDA/ água/ ambiente	6,0 a	6,0 a	6,0 a	6,0 a	6,0 a	6,0 a	5,5 a	2,4 b	0,4 b	0 b	0 b	0 b
3. Cereais/óleo mineral/ambiente	3,5 c	3,4 c	2,4 c	2,0 d	2,0 b	0 d	0 d	0 c	0 b	0 b	0 b	0 b
4. BDA/ óleo mineral/ ambiente	4,8 b	2,4 d	3,0 b	4,6 b	2,6 b	2,5 b	2,0 c	0 c	0 b	0 b	0 b	0 b
5. Cereais/ água/ 4°C	6,0 a	5,6 a	0 e	0 e	0 c	0 d	0 d	0 c	0 b	0 b	0 b	0 b
6. BDA/ água/ 4°C	5,8 a	5,6 a	1,7 d	0 e	0 c	0 d	0 d	0 c	0 b	0 b	0 b	0 b
7. Cereais/ óleo mineral/4°C	3,2 c	3,1 c	0 e	0 e	0 c	0 d	0 d	0 c	0 b	0 b	0 b	0 b
8. BDA/ óleo mineral/4°C	4,3 b	4,1 b	3,1 b	2,9 c	2,4 b	1,7 c	2,4 c	0 c	0 b	0 b	0 b	0 b
9. Cereais/ glicerol/20 °C	0 d	0 e	0 e	0 e	0 c	0 d	0 d	0 c	0 b	0 b	0 b	0 b
10. BDA/ glicerol/20°C	0 d	0 e	0 e	0 e	0 c	0 d	0 d	0 c	0 b	0 b	0 b	0 b
11. Cereais/ glicerol/86°C	0 d	0 e	0 e	0 e	0 c	0 d	0 d	0 c	0 b	0 b	0 b	0 b
12. BDA/ glicerol/86°C	0 d	0 e	0 e	0 e	0 c	0 d	0 d	0 c	0 b	0 b	0 b	0 b

\* As médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. As letras nas colunas comparam os tratamentos dentro de cada mês.