



UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS

**ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO  
DE BACTÉRIAS PRESENTES NOS  
SOLOS DE COBERTURA E  
AVALIAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO  
CRUZADA SOBRE O COGUMELO**

*Agaricus blazei*

**VALDIRENE APARECIDA DA SILVA**

**2005**

59362  
050637

VALDIRENE APARECIDA DA SILVA

**ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS PRESENTES NOS  
SOLOS DE COBERTURA E AVALIAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO  
CRUZADA SOBRE O COGUMELO *Agaricus blazei***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, para a obtenção do título de “Mestre”.

Orientador

Prof. Dr. Eustáquio Souza Dias

LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2005

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

Silva, Valdirene Aparecida

Isolamento e identificação de bactérias presentes nos solos de cobertura e avaliação da contaminação cruzada sobre o cogumelo *Agaricus blazei* / Valdirene Aparecida Silva. —Lavras : UFLA, 2005.

61 p. : il.

Orientador: Eustáquio Souza Dias.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Cogumelo. 2. Camada de cobertura. 3. Microbiologia. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-576.163

**VALDIRENE APARECIDA DA SILVA**

**ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS PRESENTES NOS  
SOLOS DE COBERTURA E AVALIAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO  
CRUZADA SOBRE O COGUMELO *Agaricus blazei***

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

APROVADA em 04 de março de 2005

Profa. Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli do Valle

UFLA

Prof. Dr. Romildo da Silva

UFLA

  
Prof. Dr. Eustáquio Souza Dias  
UFLA  
(Orientador)

LAVRAS  
MINAS GERAIS – BRASIL

A Deus, pela Presença e Luz em todos os momentos.

Aos meus pais, Maura e Valdo, pelo exemplo de amor, dedicação e perseverança

Às minhas irmãs, Valéria e Vanessa, pelo carinho e incentivo.

## **DEDICO**

## AGRADECIMENTO

A Deus, pelas oportunidades concedidas, coragem e sabedoria para superar nossas limitações.

À minha família, Valdo, Maura, Valéria e Vanessa, pelo amor incondicional, otimismo e sabedoria em todos os momentos.

Ao Rodrigo, pelo carinho e incentivo, mesmo que distante.

A Patrícia e Grazielle, pela dedicação durante todo o experimento, paciência e ombro amigo.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Ciência dos Alimentos, pela oportunidade concedida para a realização do curso de Pós-Graduação e ao CNPq, pelo apoio financeiro.

Ao Prof. Dr. Eustáquio Souza Dias, pela orientação, convivência harmoniosa e confiança depositada em mim para realização do trabalho.

À Profa. Dra. Rosane Freitas Schwan e à Profa. Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli do Valle, pela atenção e contribuições.

Ao Prof. Dr. Romildo da Silva, pelo apoio durante a condução do experimento e importantes sugestões.

A Cidinha, Ivani, Magda e Fábio (DBI/UFLA), pela amizade, carinho e paciência em todos os momentos.

A Tina, Sandra e Eliana (DCA/UFLA), pelo apoio na realização das análises e importantes dicas.

Aos amigos João Vicente e Victor, pela amizade e ajuda para a realização de algumas análises.

Aos amigos Márcia Tomizawa, Evânia, Halan, Claudia Labory, Miriam, Whasley, Euziclei, Márcio e Andressa, pela amizade, convivência e palavras acolhedoras.

A todos os estagiários do DBI/UFLA e novos colegas de Mestrado que, se enumerados, poderia involuntariamente esquecer algum.

Aos amigos Vanderley, Glaucimar, Mariá, Fabiano, Jupys, Felipe, Dulce e Leticia, pela amizade, companheirismo e alegre dividida do mesmo teto.

A Viviane e Sueli, pelas palavras de fé, coragem e amizade.

A todos, meu reconhecimento e gratidão.

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
RESUMO .....	i
ABSTRACT .....	ii
1 INTRODUÇÃO .....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO....	3
2.1 Valor nutricional dos cogumelos.....	3
2.2 Potencial terapêutico de <i>A. blazei</i> .....	4
2.3 Histórico .....	5
2.4 Cultivo .....	7
2.4.1 Camada de cobertura .....	8
2.4.1.1 Desinfestação da camada de cobertura .....	10
2.4.1.2 Espessura da camada de cobertura .....	12
2.4.1.3 Microbiota do material de cobertura .....	13
2.4.1.4 Gênero <i>Pseudomonas</i> em cultivo de cogumelos .....	14
2.5 Colheita, pós-colheita e armazenamento de <i>A. blazei</i> .....	16
3 MATERIAL E MÉTODOS .....	20
3.1 Obtenção do material de cobertura .....	20
3.2 Cultivo de <i>A. blazei</i> .....	20
3.3 Desinfestação da camada de cobertura .....	21
3.3.1 Tratamento com formol .....	21
3.3.2 Tratamento com vapor d'água .....	21
3.3.3 Terra sem tratamento .....	21
3.4 Preparo das amostras.....	22
3.5 Quantificação da comunidade bacteriana nos diferentes tipos de solo.....	22

3.6 Isolamento e identificação de bactérias da camada de cobertura.....	22
3.7 Adaptação e manutenção de <i>Pseudomonas putida</i> (ATCC).....	23
3.7.1.1 Preparo do inóculo de <i>Pseudomonas putida</i> para a camada de cobertura.....	24
3.7.1.2 Inoculação de <i>P. putida</i> na camada de cobertura .....	24
3.7.2 Crescimento do micélio de <i>A. blazei</i> e <i>A. bisporus</i> in vitro na presença de <i>P. putida</i> .....	25
3.7.2.1 Obtenção dos inóculos de <i>A. blazei</i> e <i>A. bisporus</i> .....	25
3.7.2.2 Suspensão de <i>P. putida</i> e discos de ágar com a bactéria .....	25
3.7.2.3 Produção de corpo de frutificação em meio sólido “Halbschalentest” .....	26
3.8 Efeito de <i>P. putida</i> na indução do crescimento de <i>Agaricus</i> .....	26
3.9 Análise estatística .....	27
3.10 Colheita e lavagem dos basidiocarpos .....	28
3.11 Determinação da composição centesimal de basidiocarpos de <i>A. blazei</i> de dois fluxos, oriundos da camada de cobertura desinfestada com vapor d’água .....	28
3.12 Análise microbiológica de basidiocarpos de <i>A. blazei</i> desidratados .....	29
3.12.1 Detecção e quantificação de coliformes a 35°C e coliformes termotolerantes .....	29
3.12.2 Detecção de <i>Salmonella</i> sp .....	30
3.12.3 Detecção de <i>Staphylococcus</i> sp.....	30
3.12.4 Quantificação de fungos filamentos e leveduriformes.....	30
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
4.1 Quantificação da comunidade bacteriana presente na camada de cobertura .....	31

4.2 Identificação de bactérias isoladas do material de cobertura .....	36
4.3 Inoculação de <i>P. putida</i> na camada de cobertura .....	41
4.4 Produtividade de <i>A. blazei</i> .....	42
4.5 Indução de primórdios por <i>P. putida</i> in vitro .....	43
4.6 Análise microbiológica de <i>A. blazei</i> desidratado .....	44
4.7 Composição centesimal de basidiocarpos de <i>A. blazei</i> .....	47
5 CONCLUSÕES.....	50
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS. ....	51
ANEXOS .....	59

## RESUMO

SILVA, Valdirene Aparecida. **Isolamento e identificação de bactérias presentes nos solos de cobertura e avaliação da contaminação cruzada sobre o cogumelo *Agaricus blazei***. 2005. 61 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras - MG.\*

O cultivo do cogumelo *Agaricus blazei*, espécie nativa do Brasil, vem se intensificando devido ao seu valor nutricional e potencial terapêutico. O cultivo comercial de *A. blazei* fundamenta-se nos conhecimentos aplicados ao cultivo de *Agaricus bisporus* Lange, conhecido como “champignon”. Dentre as etapas empregadas, a camada de cobertura influencia diretamente a produção e a qualidade do produto. O objetivo deste trabalho foi avaliar a contaminação cruzada ocorrida entre o solo utilizado e o cogumelo, identificando as bactérias presentes e avaliar a eficiência da desinfestação com vapor d’água e formol no solo de cobertura. Isolados de *A. blazei* e *A. bisporus* foram crescidos em condições experimentais associados a *Pseudomonas putida*, avaliando-se o crescimento micelial. Outro aspecto analisado foi a análise centesimal e microbiológica dos basidiocarpos desidratados de dois fluxos. A população microbiana apresentou valores médios de  $2,64 \times 10^6$  e  $3,0 \times 10^6$  UFC/g, para a desinfestação com vapor e sem tratamento, respectivamente. O tratamento com formol apresentou maior redução no número de bactérias nas terras de barranco (Latosolo Vermelho distroférico) e solo de pastagens (Latosolo Amarelo distrófico), enquanto que no solo hidromórfico, oriundo de várzea (Gleissolo Melânico), nenhum dos tratamentos foi suficiente para reduzir a população bacteriana. Foram identificadas bactérias do gênero *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Enterobacter* e *Shigella*, dentre outras, denotando que os tratamentos de desinfestação não eliminam bactérias potencialmente benéficas, mas também não eliminam bactérias patogênicas. Não houve crescimento significativo do micélio de *A. blazei* e *A. bisporus* em associação com *P. putida* nos meios BDA e malte. A composição centesimal apresentou-se dentro dos limites esperados em ambos os fluxos e foi detectada na análise microbiológica dos basidiocarpos desidratados, presença de coliformes termotolerantes a 35°C, fungos filamentosos e leveduriformes, *Staphylococcus* sp e ausência de *Salmonella*. Os resultados mostram a necessidade de monitoramento microbiológico dos cogumelos pós-colheita e legislação sanitária específica para *A. blazei* desidratado.

---

\* Comitê Orientador: Prof. Dr. Eustáquio Souza Dias – UFLA (Orientador), Profa. Dra. Rosane Freitas Schwan- UFLA (co-orientadora).

## ABSTRACT

SILVA, Valdirene Aparecida. **Isolation and identification of bacteria present in the casing layer and evaluation of cross contamination on the mushroom *Agaricus blazei***. 2005. 61 p. Dissertation (Master Degree in Food Science) – Federal University of Lavras, Lavras - Minas Gerais, Brazil.\*

The growing of the mushroom *Agaricus blazei*, a species native to Brazil, has been increasing due to its nutritional value and therapeutic value. The commercial cultivation of *A. blazei* is based upon the knowledge applied to the cultivation of *Agaricus bisporus* Lange, known as the “champignon”. Among the steps, the casing layer influences directly both the yield and quality of the produce. The objective of this work was to evaluate the cross contamination occurred between the used soil and the mushroom, identifying the bacteria present and evaluate the efficiency of the water vapor and formal disinfection on the casing layer. *A. blazei* and *A. bisporus* isolates were grown under experimental conditions associated with *Pseudomonas putida*, evaluating the mycelial growth. Other aspect analyzed was the centesimal and microbiological analysis of the dehydrated two flush basidiocarps of. The microbial population showed an increased reduction in the number of bacteria on the ravine soils (distroferic red Latosol) and grazingland soil (distrofic yellow Latosol), while in the hydromorphic soil coming from lowland (Melanic Gleysol), none of the treatments was enough to reduce the bacterial population. Bacteria of the genus *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Enterobacter*, *Shigella*, among others, denoting that the disinfection treatments does not eliminate potentially beneficial bacteria but does not eliminate pathogenic bacteria either. There was no significant growth of the mycelium of *A. blazei* and *A. bisporus* in association with *P. putida* in the BDA and malt media. The centesimal composition presented itself within the limits expected in both flushes and presence of heat-tolerant bacilliforms at 35°C, filamentous fungi and leveduriforms, *Staphylococcus* sp. and absence of *Salmonella* was detected in the microbiological analysis. the results show the need for microbiological monitoring of the post-harvest mushrooms and sanitary legislation particular to dehydrated *A. blazei*.

---

\* Guidance Committee: Prof. Dr. Eustáquio Souza Dias – UFLA (Adviser), Profa. Dra. Rosane Freitas Schwan- UFLA (co-adviser).

## 1 INTRODUÇÃO

A espécie de cogumelo *Agaricus blazei* Murril, popularmente conhecido como “cogumelo-do-sol<sup>®</sup>” é nativa do Brasil e foi identificada inicialmente no sul do estado de São Paulo, na década de 60. Embora exista o cultivo em escala comercial de outras espécies de cogumelo desde o princípio da década de 90, o cultivo de *A. blazei*, por ser uma cultura recente e com poucas pesquisas, ainda é praticado de forma empírica e sem embasamento técnico, pela maioria dos produtores.

As tecnologias empregadas no cultivo restringem-se, principalmente, aos conhecimentos aplicados ao *Agaricus bisporus* Lange (popularmente conhecido como “champignon”). A produção brasileira de cogumelos comestíveis tem sido fundamentada em técnicas desenvolvidas na Europa, Ásia e América do Norte. No entanto, as novas metodologias estão sendo desenvolvidas visando uma melhor adaptação das diferentes espécies às condições climáticas e tecnológicas disponíveis no Brasil.

Uma das etapas envolvidas no cultivo de cogumelos *Agaricus* que influencia a produtividade é a camada de cobertura, a qual assegura maior indução dos primórdios formados. A presença de bactérias na camada de cobertura exerce influência na frutificação de *A. bisporus* e o gênero *Pseudomonas* spp tem sido mencionado em diversos trabalhos associando a produtividade dos cogumelos com a presença das bactérias desse gênero, em particular a espécie *Pseudomonas putida*. No entanto, além das bactérias *Pseudomonas putida*, normalmente, o solo utilizado como camada de cobertura contém outras espécies de bactérias, inclusive patogênicas. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a contaminação cruzada ocorrida entre o solo utilizado e o cogumelo, identificando as bactérias presentes e avaliar a eficiência

da desinfestação com vapor d'água e formol no solo de cobertura. Outros aspectos analisados foram a influência da presença e ausência de bactérias *Pseudomonas putida*, inoculadas na camada de cobertura e produtividade dos cogumelos. Isolados de *A. blazei* e *A. bisporus* foram crescidos em condições experimentais, associados com a *P. putida*, avaliando-se o seu crescimento micelial.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Valor nutricional dos cogumelos

A aplicação de fungos para a obtenção de produtos fermentados ou utilizados diretamente como alimento ou medicamento, data de tempos mais remotos. Na mitologia romana, o surgimento dos cogumelos estava associado aos deuses e acreditava-se que os cogumelos eram formados por meio de raios e trovões lançados por Júpiter para iluminar a terra (Alexopoulos et al., 1996). Mizuno et al. (1995) mencionam que existem na literatura dados que apontam o cultivo de cogumelos como o *Ganoderma lucidum* na China desde 500 a.C, sendo conhecido por suas propriedades medicinais.

O consumo de cogumelos comestíveis vem aumentando significativamente devido ao reconhecimento do seu valor nutricional. É um alimento com poucas calorias e com conteúdo protéico relativamente alto, variando de 1,5% a 6 % de sua massa fresca, evidenciando as diferenças entre as espécies (Vedder, 1991 e Steineck, 1987, citado por Braga et al., 1998). Além do conteúdo em proteínas, os cogumelos são ricos em minerais, tais como potássio, fósforo, manganês, ferro e cálcio. Também são ricos em vitaminas, como tiamina (vitamina B<sub>1</sub>), riboflavina (vitamina B<sub>2</sub>), piridoxina (vitamina B<sub>6</sub>), cobalamina (vitamina B<sub>12</sub>), ácido pantotênico, biotina (vitamina H), niacina, ácido fólico, ácido ascórbico (vitamina C), ergosterol (vitamina D), tocoferol (vitamina E) e quinona (vitamina K) e, ainda, são fonte de quase todos os aminoácidos (Braga et al., 1998). Algumas espécies são apreciadas como aromatizantes, podendo ser utilizadas como condimento, melhorando o sabor de outros alimentos (Braga et al., 1998).

## 2.2 Potencial terapêutico de *Agaricus blazei*

A constante busca de substâncias ou métodos que aumentem ou potencializem o sistema imunológico, induzindo a resistência sem causar efeitos colaterais deletérios ao organismo, tem sido uma importante busca da ciência na cura contra o câncer.

Na medicina popular, a utilização de cogumelos é uma prática antiga, sendo ministrada com fins terapêuticos no combate a hemorragias, cólicas, feridas, asma, etc. (Braga et al., 1998). Segundo Bononi et al. (1995), algumas tribos indígenas brasileiras usavam *Pycnoporus sanguineus* (“orelha-de-pau vermelha”) para a cicatrização de feridas.

Substâncias, como glicosídeos, ácidos orgânicos, óleos, alcalóides e polissacarídeos, são encontradas em extratos de cogumelos e vegetais, os quais demonstraram atividade imunoestimulatória. Os polissacarídeos são considerados o grupo de substâncias com grande importância metabólica na saúde e na nutrição humana (Wong et al., 1994).

Park et al. (2003) mencionaram que os cogumelos comestíveis apresentam compostos com propriedades funcionais, em particular os homo e heteroglucanos com ligações glicosídicas do tipo  $\beta(1\rightarrow3)$  e  $\beta(1\rightarrow6)$ . Esses polissacarídeos estão relacionados a diversas espécies de cogumelos e apresentam atividade antitumoral (Mizuno et al., 1990a). Dentre as espécies de cogumelos comestíveis, o *Agaricus blazei* tem despertado crescente interesse da comunidade médica.

Em estudos realizados no Japão utilizando extratos de *A. blazei*, foi observada a redução no crescimento de células cancerígenas *in vitro* e grande atividade imunoestimulatória e antitumoral em cobaias contra o sarcoma 180 (Mizuno et al., 1990a, 1990b).

As substâncias biologicamente ativas denominadas polissacarídeos do tipo beta glucanas apresentam ligações beta glicosídicas associadas a

determinadas proteínas denominadas complexo glucano-proteico ou (1→6) β-D-glucano-proteína, com possível ação antitumoral (Mizuno et al., 1990a, 1990b; Kawagishi et al., 1990). Reshetnikov et al. (2001) e Wasser et al. (2002) mencionaram que tais substâncias podem ser extraídas dos corpos de frutificação ou micélio vegetativo cultivado em meio líquido.

### 2.3 Histórico

O cogumelo *Agaricus blazei* é uma espécie saprófita nativa das florestas tropicais brasileiras. De acordo com a classificação taxonômica que divide os seres vivos em cinco reinos (Whittaker, 1959), a espécie *A. blazei* é pertencente ao reino *Fungi*, na divisão *Basidiomycota*, da ordem *Agaricales*, na família *Agaricaceae* e ao gênero *Agaricus*.

A espécie *Agaricus blazei* Murril, popularmente conhecida como “cogumelo-do-sol” ou “cogumelo Piedade”, foi descoberta no Brasil e coletada inicialmente por um agricultor e pesquisador autônomo, o Sr. Takatoshi Furumoto (Braga et al., 1998) na década de 60. De ocorrência natural na região sul do estado de São Paulo, onde predomina a Mata Atlântica, a espécie nativa foi cultivada e alguns exemplares foram enviadas para o Instituto Iwade de Cogumelos no Japão, tendo como objetivo estudar suas possíveis propriedades medicinais.

Devido às condições climáticas favoráveis ao cultivo desse cogumelo, matrizes reproduzidas no Japão foram enviadas de volta ao Brasil e, desde então, várias técnicas de produção têm sido adaptadas (Braga et al., 1998). As amostras enviadas ao Japão foram identificadas por um cientista belga, Dr. Heinemann, em 1967, como *Agaricus blazei* Murril, nome em que estava cadastrado e, até hoje prevalece com o mesmo nome.

Existem controvérsias taxonômicas relacionadas ao fungo, uma vez que a análise dos isolados de diferentes regiões brasileiras apresentou diferenças em

relação à espécie analisada por Murril, a qual era nativa da Flórida. Dessa forma, os isolados brasileiros devem ser referidos como *Agaricus blazei* (Murril) ss Heinemann ou quando a comunidade científica referendar como nova espécie de *Agaricus brasiliensis* (Wasser et al., 2002).

No Brasil, não existe documentação precisa que permita localizar no tempo, com precisão, o início do cultivo de cogumelos (Fidalgo & Guimarães, 1985). Segundo Coutinho (1994), o cultivo em escala comercial, iniciou-se no ano de 1950. Tal fato não se encontra registrado na escassa literatura nacional, sendo considerado que parte da população da região Centro-Sul conhecia e fazia uso de cogumelos comestíveis há aproximadamente uns 40 anos.

Molena (1985) afirmou que, desde 1953, japoneses e coreanos da região de Mogi das Cruzes produziam cogumelos comestíveis. Estes inicialmente eram avicultores e, devido a problemas no setor, muitos optaram pelo cultivo de cogumelos, com insucesso da grande maioria. Na década de 60 imigrantes chineses provenientes de Formosa introduziram algumas melhorias no cultivo de *Agaricus bisporus* (“champignon”). A metodologia de plantio era fundamentada em experiências herdadas por muitas gerações, destituídas de fundamentos científicos e aprimoramentos técnicos, decorrentes da falta de conhecimentos (Coutinho, 1994).

As tecnologias envolvidas no cultivo comercial de fungos comestíveis no Brasil restringem-se, principalmente, ao *Agaricus bisporus* Lange (“champignon”) e, em menor escala, aos cogumelos *Lentinula edodes* Berk e *Pleurotus* spp, popularmente conhecidos como “shiitake” e “hiratake”, respectivamente (Braga et al., 1998; Braga & Eira, 1999; Coutinho, 1994).

A espécie *Agaricus bitorquis* (Quel) Sacc também foi introduzida no Brasil e a tecnologia de cultivo é praticamente a mesma empregada para a espécie *Agaricus bisporus* (Coutinho, 1994). Com a descoberta das propriedades antitumorais da espécie *A. blazei*, o Japão passou a ser o principal importador

desse cogumelo, cultivado principalmente nos estados de São Paulo, Paraná e Minas Gerais.

## 2.4 Cultivo

No Brasil, a técnica de cultivo comercial de *A. blazei* baseia-se nas técnicas utilizadas para a produção do “champignon” (*Agaricus bisporus*) envolvendo as seguintes etapas: preparo do substrato de cultivo (compostagem e pasteurização); inoculação ou “semeadura”; colonização do substrato inoculado ou “corrida do micélio”; cobertura do substrato; produção e processamento.

Cada uma das etapas consiste de diversos passos seqüenciais de igual importância para o sucesso do produtor (Colauto & Eira, 1998; Braga et al., 1998). O composto é constituído, geralmente, de materiais fibrosos à base de palhas de vegetais ricos em carbono (C) e pobres em nitrogênio (N), como palha de arroz, bagaço de cana, gramíneas e outros materiais ricos em celulose. Para suprir a necessidade de nitrogênio e outros nutrientes, adiciona-se algum tipo de farelo (soja ou trigo), fósforo e potássio, além de calcário e gesso para ajustar o pH e estrutura do composto. O micélio desenvolve-se bem com pH em torno de 6,5-7,5 (Braga et al., 1998; Eira, 2003).

O micélio vegetativo apresenta ótimo desenvolvimento no substrato em temperaturas que vão de 23°C a 30°C, sendo 25°C a temperatura ideal para o desenvolvimento dos corpos de frutificação. A umidade relativa do ar deve estar compreendida entre 80% e 90% e a época ideal para o cultivo é entre a primavera e o verão (Braga et al., 1998; Dias et al., 2002).

Segundo Colauto & Eira (1998), praticamente todas as etapas de cultivo estão dominadas, apesar de algumas das soluções indicadas para aumentar a produção ou melhorar a qualidade não serem adaptadas ao clima quente e úmido do Brasil.

#### **2.4.1 Camada de cobertura**

Um dos aspectos da produção de cogumelos ainda não muito bem elucidados é o da indução de frutificação. Dentre as etapas de cultivo, a indução da frutificação merece destaque, uma vez que é considerada indispensável para o cultivo de cogumelos e afeta diretamente a produtividade.

Esta indução da frutificação é a etapa do cultivo em que se adiciona terra e ou outros materiais sobre o substrato colonizado. O termo “camada de cobertura” também é utilizado em referência aos materiais utilizados em sua composição. Na Europa é utilizada a turfa de musgo com grande sucesso. No Brasil, a exploração comercial de turfa é regulada pela legislação ambiental. Além dessa restrição, nem sempre a turfa encontrada é de boa qualidade.

Sabe-se que ela é responsável pela variação ambiental necessária para a mudança fisiológica no comportamento do micélio, que passa do estado vegetativo para o reprodutivo, ou seja, induz a formação de primórdios de basidiocarpos (Edwards, 1978; Flegg et al., 1985, citado por Braga & Eira, 1999), sendo, portanto um dos fatores mais importantes na produtividade e uniformidade durante a colheita (Braga & Eira, 1999).

Segundo Stamets & Chilton (1983), citados por Braga & Eira (1999), as funções básicas da camada de cobertura são: proteger o substrato colonizado contra a perda de umidade, promover microclima úmido para a formação e desenvolvimento dos primórdios, suporte físico (Kurtzman, 1995), servir como reservatório de água para os cogumelos em crescimento, permitir trocas gasosas (Kurtzman, 1995; Wuest & Beyer, 1996), favorecer o desenvolvimento de microrganismos benéficos à frutificação (Hayes, 1978; Reddy & Patrick, 1990) e proteger o substrato de microrganismos competidores ou patogênicos.

Diversos materiais têm sido utilizados como camada de cobertura ao longo do tempo Edwards (1978) mencionou que, após a década de 50 a turfa de

musgo passou a ser utilizada como material de cobertura nos canteiros da Inglaterra.

A turfa apresenta características químicas e físicas diferentes, dependendo do local e material de origem, sendo o mesmo fator crucial na determinação da qualidade da mesma (Labuschagne & Eicker, 1995).

O material utilizado como camada de cobertura deve apresentar características específicas como ter boa umidade e baixa capacidade para liberá-la (Vijay et al., 1987; Hayes, 1981), ser livre de doenças e pragas (Vijay et al., 1987; Hayes, 1978), apresentar porosidade suficiente para permitir trocas gasosas (Kurtzman, 1995; Hayes, 1981), pH entre 6,5-8,0 (Hayes, 1978; Vijay et al., 1987) e apresentar população microbiana benéfica (Curto & Faveli, 1972; Hayes, 1981; Rainey et al., 1990).

Fatores químicos, físicos e biológicos corroboram concomitantemente para que o fenômeno da frutificação ocorra, tais como porosidade, profundidade, potencial osmótico, água, gases, especialmente o CO<sub>2</sub>, substâncias químicas voláteis ou não, hormônios e microrganismos, principalmente bactérias. Entretanto, devido à complexidade de interações dos mesmos, diversas pesquisas apresentam mais sugestões que conclusões, justamente pelo fato de não conseguirem isolar todas as variáveis que interferem na indução de primórdios (Colauto, 2003).

Diferentes materiais alternativos foram testados como camada de cobertura, dentre eles: composto exaurido (Hayes, 1978), polpa de celulose (Wuest & Beyer, 1996), solos (Hayes, 1978), fibras de coco (Labuschagne & Eicker, 1995; Pardo et al., 2002), resíduos de pinheiro (Pardo et al. 2002), "rockwool" (lã mineral), perlite e vermiculita (Wuest & Beyer, 1996), dentre outros.

Hayes (1981) mencionou em seus estudos as dificuldades encontradas para determinar e padronizar um material de cobertura, considerando as

complexas variações químicas, físicas e microbianas encontradas nos diferentes materiais.

Segundo Colauto & Eira (1998), até o momento, a turfa de musgo com pH ajustado com carbonato de cálcio ou calcário tem sido o material que melhor preenche os requisitos de boa camada de cobertura, apesar de ter a desvantagem de sujar o cogumelo. É amplamente usada no cultivo de cogumelos em toda a Inglaterra e Holanda, e utilizada no Brasil quando disponível, uma vez que a importação da turfa europeia é controlada por legislação ambiental.

No Brasil, a camada de cobertura utilizada em cultivo de *A. blazei* tem sido a terra removida durante a preparação dos canteiros para o cultivo desprotegido ou terra retirada de barrancos no cultivo em estufa. Geralmente, nenhum tratamento é realizado com a terra, para o cultivo desprotegido, ocorrendo apenas a retirada de raízes e ou pedras e adição de calcário para corrigir o pH em torno de 7 (Braga et al., 1998). No cultivo em estufa tem sido comum o uso de formol para a desinfestação da terra de cobertura. No Brasil, ocorre o predomínio do uso de camadas de cobertura à base de terra argilosa ou mista e, recentemente, turfas brasileiras têm sido utilizadas (Colauto, 2003).

#### **2.4.1.1 Desinfestação da camada de cobertura**

Diferentes métodos têm sido utilizados na tentativa de eliminar a população indesejável e reduzir as atividades microbianas presentes no material de cobertura. Dentre os métodos, podem ser citados a pasteurização com calor úmido e com calor seco, a irradiação gama e os gases químicos (Trevors, 1996). O método utilizado depende do objetivo de cada pesquisa, apresentando, cada um deles, vantagens e desvantagens, dependendo da natureza física e química de cada material a ser esterilizado.

Uma das dificuldades encontradas em pesquisas envolvendo pasteurização de solos é a quantidade a ser tratada de cada vez e a manutenção

efetiva do tratamento durante o período determinado. O fato que merece mais atenção refere-se às alterações das propriedades químicas, físicas e estruturais do solo (Trevors, 1996).

O tratamento do material de cobertura deve ser realizado para eliminar possíveis contaminações como doenças e patógenos oriundos do local de coleta ou manuseio. No Brasil, a desinfestação do material usado pode ser de duas formas: com o tratamento a quente (vapor d'água) ou com reagentes químicos.

De acordo com Hayes (1978), os microrganismos presentes em solos submetidos ao tratamento a quente podem ser destruídos com temperatura de 65°C/30 minutos ou um pouco mais elevada, em torno de 82°C/30 minutos. No Brasil, não se têm ainda informações a esse respeito.

Hayes (1978) mencionou a dificuldade em manter a temperatura constante por todo o material, considerando as diferenças entre solos, principalmente relacionadas com a estrutura.

As construções normalmente são túneis, salas ou o próprio local de cultivo equipado com ventiladores e estruturas para injeção de vapor e ar. No Brasil, a estrutura projetada para pasteurização de composto tem sido usada também com a finalidade de pasteurizar a terra de cobertura. (Peil et al., 1996).

A temperatura no interior da câmara de pasteurizar permanece entre 60°C e 65°C, visando eliminar larvas de insetos e esporos de fungos (Braga et al., 1998). Tripathi et al. (1991) sugeriram que o período de pasteurização fluente do material pode ser compreendido em até 6 horas e períodos superiores podem interferir e ocasionar alterações na estrutura e porosidade do material.

Outro tratamento disponível consiste na adição de reagentes químicos e ou fumigantes diretamente no material de cobertura. Dentre os reagentes químicos aplicados têm-se o brometo de metila (Peil et al., 1996) e o formol, estando o uso do primeiro proibido no país. O método de desinfestação com solução de formol é uma alternativa com baixo custo, consistindo na irrigação de

cada metro cúbico de terra com 20 litros de solução a 10%. O material deve permanecer coberto durante período aproximado de 4-5 dias. Para a sua utilização, deve ser descoberto e espalhado até a completa volatilização do formol (Braga et al., 1998).

#### **2.4.1.2 Espessura da camada de cobertura**

A camada de cobertura é essencial na indução dos corpos de frutificação de cogumelos e variações de espessura do material de cobertura podem afetar a indução de primórdios e a produtividade. De acordo com a literatura pertinente, a espessura da camada de cobertura para o cultivo de *Agaricus* pode variar de 3 a 6 cm para substratos com profundidade de 15-20 cm (Edwards, 1978; Kalberer, 1983; Kalberer, 1985).

Kalberer (1985) estudou os diferentes efeitos de variações na espessura da camada de cobertura e observou que camadas inferiores a 3 cm favorecem a perda de umidade do substrato prejudicando a formação de basidiocarpos. Camadas com espessuras superiores a 6 cm minimizam o ressecamento do composto mas reduzem o peso do cogumelo (Kalberer, 1983; Kalberer, 1985).

No cultivo em canteiros de *A. blazei*, Braga & Eira (1998) sugerem que a terra seja colocada sobre o substrato colonizado numa profundidade de 6-8 cm. A profundidade da camada de cobertura pode variar em função da sua composição, ambiente de cultivo e manejo.

#### **2.4.1.3 Microbiota do material de cobertura**

Alguns fungos podem permanecer na fase vegetativa por longos ou curtos períodos, dependendo das condições ambientais e em todos os fungos a frutificação depende de alterações ambientais (Reddy & Patrick, 1990). A reprodução dos fungos é regulada por fatores abióticos, como temperatura, composição do substrato, luminosidade e outros fatores que têm requerido mais

atenção (Dahberg & Van Eten 1982, citados por Reddy & Patrick, 1990). Os microrganismos exercem um papel importante na regulação e reprodução fúngica uma vez que as interações microbianas ocorrem naturalmente no ambiente.

Segundo Hume & Hayes (1972), estudos realizados por Eger utilizando uma técnica de indução da frutificação em placa de Petri, denominada “Halbschalentest” demonstraram as mudanças críticas que ocorrem na fase vegetativa (micélio) para a fase reprodutiva, quando a frutificação está associada com os microrganismos presentes no material de cobertura.

Curto & Faveli (1972) relataram que Eger, em 1962, foi o primeiro pesquisador a sugerir que a frutificação de cogumelos estava associada aos microrganismos. Posteriormente, diversos trabalhos foram conduzidos em condições laboratoriais e comprovaram a participação dos microrganismos associados com a frutificação de cogumelos comestíveis (Curto & Faveli, 1972; Hayes, 1981; Rainey & Cole, 1987; Rainey et al., 1990; Reddy & Patrick, 1990; Rainey, 1991; Miler et al., 1995; Pardo et al., 2002; Yong-Sup Cho et al., 2003).

Estudos confirmando a presença de microrganismos na camada de cobertura, particularmente do gênero *Pseudomonas*, promoveram diferentes estudos para verificar se esses microrganismos induziam a formação de basidiocarpos, a quantidade presente dos mesmos nos diferentes materiais usados como cobertura e o efeito produzido por culturas axênicas ou pela combinação de diferentes grupos de microrganismos (Curto & Faveli, 1972; Rainey et al., 1990; Rainey, 1991; Pardo et al., 2002).

#### **2.4.1.4 Gênero *Pseudomonas* em cultivos de cogumelos**

As bactérias pertencentes ao gênero *Pseudomonas* são caracterizadas como organismos quimiorganotróficos aeróbios, bastonetes, gram-negativos, não formam esporos, móveis por meio de um ou mais flagelos e apresentam

capacidade de crescimento em uma grande variedade de substratos orgânicos (Palleroni, 1984).

Os membros desse gênero são amplamente distribuídos em diferentes habitats e devido a sua versatilidade metabólica, fisiológica e genética, estão envolvidos em importantes atividades no equilíbrio da natureza, biodegradação e reciclagem de compostos orgânicos e xenobióticos (Timmis, 2002). Ainda estão associados à deterioração de alimentos, são agentes de doenças em plantas e animais ou são encontrados em associação com os mesmos, fazendo parte da microbiota normal (Budzikiewicz, 1993).

No cultivo de cogumelos comestíveis há espécies desse gênero que são consideradas agentes causais de doenças, afetando o crescimento e o desenvolvimento no cultivo de *A. bisporus* (Grewal & Rainey, 1991; Sole-Rivas et al., 1999).

Existem três principais doenças bacterianas no cultivo de cogumelos oriundos de *Pseudomonas*. A mais conhecida e com difusão mundial é a presença de manchas marrons ocasionadas por *Pseudomonas tolaasii*, ocorrendo necroses no píleo e estirpe. A segunda doença é caracterizada por manchas vermelhas com formação de lesões pigmentadas com coloração vermelha no píleo. O agente causal foi chamado de *P. gingeri* e, segundo Fett et al. (1995), sua ocorrência foi primeiramente relatada por Wong et al. (1982). A terceira doença tem como principal característica a formação de lesões moles, com coloração marrom-negra distribuída por todo o corpo de frutificação, sendo ocasionada pela bactéria patogênica *P. agarici* (Fett et al., 1995).

Por outro lado, a interação entre *Pseudomonas* sp e *A. bisporus* (Lange) Imbach durante a formação dos primórdios tem sido confirmada por estudos de microscopia eletrônica (Masaphy et al., 1987; Miller et al., 1995).

A espécie *Pseudomonas putida* (Trevisan) Migula é referida como estimuladora de crescimento e formação inicial de basidiocarpos em *A. bisporus*,

proporcionando o estímulo necessário para desencadear a frutificação (Rainey & Cole, 1987; Rainey et al., 1990; Grewal e Rainey, 1991; Fett et al., 1995; Rainey, 1991).

Dois metabólitos são produzidos e exsudados em abundância pelo micélio, CO<sub>2</sub> e oxalato de cálcio. No substrato, as hifas jovens apresentam-se circundadas por cristais de oxalato de cálcio em toda a extensão, enquanto que o mesmo não é observado nas hifas presentes na camada de cobertura (Masaphy et al., 1987). O oxalato agrega-se ao cálcio, para formar cristais de oxalato de cálcio criando uma barreira física que protege o micélio contra ataques de bactérias ou fungos (Whitney & Arnott, 1987).

Trabalhos realizados por Rainey (1991) têm revelado duas respostas distintas do micélio em relação a *P. putida* durante a morfogênese de *A. bisporus*, *in vitro*. A primeira resposta ocorre por meio do contato da hifa com a bactéria, ocasionando um aumento em extensão da hifa. A segunda evidência é a formação de primórdios. O mesmo autor menciona que ambas as respostas podem ocorrer no substrato/camada de cobertura, desde que os dois organismos recebam condições aproximadas as utilizadas durante o cultivo comercial de cogumelos.

A confirmação da presença dessa espécie bacteriana em materiais à base de turfa ou misturados a solos (Miller et al., 1995; Colauto & Eira, 1998; Pardo et al., 2002) tem sido unânime na literatura, com atribuições de efeitos estimulantes de crescimento micelial e morfogênese de basidiocarpos (Curto & Faveli, 1972; Hume & Hayes, 1972; Rainey & Cole, 1987; Rainey et al., 1990; Rainey, 1991).

Método simulando a formação de primórdios *in vitro* foi descrito por Hume & Hayes (1972) e vários outros autores descrevem como um método trabalhoso com excessiva demanda de tempo para ser implantada (Rainey et al., 1990; Colauto & Eira, 1998), alguns deles não tendo mostrado resultados

suficientemente consistentes (Rainey & Cole, 1987). As tentativas de conduzir *in vitro* o processo de morfogênese dos basidiocarpos visam esclarecer o que acontece nos cultivos comerciais. Combinações de fatores físicos (temperatura e umidade), químicos (nutrientes) e biológicos (microrganismos) influenciam a transição da fase vegetativa para a reprodutiva (Hume & Hayes, 1972). Segundo o mesmo autor, investigações nutricionais são relevantes para a formação da frutificação, entretanto, esses esclarecimentos têm sido limitados pelo fato das culturas comerciais de *A. bisporus* normalmente não formarem primórdios em meios artificiais.

## **2.5 Colheita, pós-colheita e armazenamento de *A. blazei***

O início de formação de primórdios, após a colocação da camada de cobertura no substrato, pode ser muito variável. Em cultivos de *A. blazei*, a falta de controle das condições ambientais, como temperatura e umidade, pode ser as principais causas das enormes variações que ocorrem na produtividade (Braga et al., 1998). Em cultivos tecnificados de *A. bisporus*, o início das frutificações ocorre de 17 a 21 dias após a cobertura do substrato (Braga & Eira, 1999) e, em cultivos de *A. blazei* em canteiro, o início da colheita ocorre após um período aproximado de 20-25 dias se as condições climáticas e o solo forem favoráveis (Braga et al., 1998).

O ponto de colheita deve ser aquele em que o cogumelo atinge seu maior peso, mantendo o padrão comercial. A colheita é efetuada assim que o cogumelo alcance o seu maior tamanho, ainda no estágio imaturo, com o píleo de formato cilíndrico, véu fechado e estipe curto e espesso (Eira, 2003). Após a primeira colheita, realizam-se outras sucessivamente, intercaladas por um período aproximado de 10 a 14 dias, denominadas fluxos. Todo o ciclo do cultivo completa-se em torno de 60 a 90 dias aproximadamente, quando a colheita começa a tornar-se inviável economicamente (Eira, 2003).

Para o *A. bisporus*, diversos trabalhos citados na literatura pertinente estabelecem métodos e tecnologias para armazenamento e aumento de vida de prateleira na sua forma hidratada destinada à alimentação (Czapski & Szudyga, 2000; Sapers et al., 2001). Esses procedimentos não se aplicam ao *A. blazei*, uma vez que o consumo dessa espécie é feito, normalmente, na forma desidratada, com utilização em preparações na forma caseira de chás ou na ingestão de cápsulas após trituração do basidiocarpo desidratado (Eira, 2003; Delú, 2003).

Existem dois padrões comerciais estabelecidos pelo mercado importador, determinado pela indústria e pelos consumidores. As exigências da indústria são menos rigorosas em termos de cor e tamanho, buscando somente a extração específica de substâncias. Já a venda direta do produto ao consumidor estabelece que o mesmo tenha tamanho homogêneo com coloração amarela tendendo ao dourado, após o processo de desidratação (Braga et al., 1998; Eira, 2003).

A classificação do produto desidratado segue as exigências do mercado importador, principalmente o japonês, que estabelece parâmetros de qualidade em função da aparência. Após a desidratação, os cogumelos são classificados em função do tamanho e coloração; os do tipo A<sup>+</sup> e A são destinados à exportação. Os basidiocarpos desidratados do tipo A<sup>+</sup> devem apresentar coloração clara, amarelo-dourado, com 7-8cm, sem danificações físicas ou manchas e os do tipo A devem apresentar as mesmas características do A<sup>+</sup>, diferindo apenas no tamanho de 5-7cm. Os do tipo B são vendidos no mercado interno e os cogumelos são aqueles que não atingiram o tamanho ideal para exportação e apresentam coloração mais escura, ocasionada por problema da desidratação. Os do tipo C geralmente são aqueles que se quebraram durante o processamento e são destinados à moagem para comercialização em pó no mercado interno (Eira, 2003).

A coloração é um dos atributos mais importantes exigidos pelos consumidores e, no caso específico de *A. blazei*, essa valorização visual é atributo de qualidade, estando relacionada ao estágio de maturação, colheita e práticas de pós-processamento.

Após a colheita, os cogumelos são submetidos a uma série de etapas compreendendo: pré-lavagem, lavagem, escovação, seleção, corte, secagem e embalagem (Braga et al., 1998). Regras de higiene e limpeza devem ser criteriosamente seguidas, pois trata-se, sobretudo, de um alimento vulnerável às más condições de manipulação e armazenamento, podendo sofrer alterações devido aos fatores intrínsecos (atividade de água, acidez, potencial de oxirredução, composição química, etc.) e extrínsecos (umidade, temperatura ambiente e composição química da atmosfera que envolve o alimento).

A etapa de desidratação merece especial cuidado, pois os cogumelos após serem cuidadosamente lavados e seccionados ao meio, são transferidos para secadores de bandejas verticais ou horizontais, à temperatura de 45°C a 60°C (Eira, 2003). Esse processo de secagem requer cuidados e ou aperfeiçoamento para assegurar maior rapidez e evitar a proliferação de microrganismos durante o período de desidratação do produto, uma vez que Rosa et al. (1999), ao analisarem amostras desidratadas de *A. blazei*, detectaram problemas na qualidade sanitária do mesmo.

Pelo fato de *A. blazei* ser utilizado na forma desidratada para o preparo de chás, o mesmo deve oferecer não apenas aspecto agradável, mas também fornecer ao consumidor garantias de um alimento seguro. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), por meio da Resolução RDC nº 12, de 2 janeiro de 2001, estabeleceu padrões microbiológicos para alimentos desidratados, incluindo cogumelos. O grupo de alimentos pertencentes aos produtos a serem consumidos após adição de líquido com emprego de calor, deve apresentar-se isento de *Salmonella* em 25g do produto, coliformes totais e

estafilococos coagulase positiva com índices de até  $10^3$  UFC/g e  $10^2$  UFC/g, respectivamente. Esse grupo de alimentos compreende chá e produtos similares, não obtidos por processamento térmico (secos, desidratados ou não), consumidos após tratamento térmico (infusão e decocção) com ou sem adição de açúcar e outros ingredientes (ANVISA, 2001).

Ainda não existe uma resolução nacional que defina a qualidade do cogumelo *A. blazei* desidratado destinado ao mercado interno e externo. Cada comprador define diferentes tipos de padrões, visando atender às exigências do mercado exportador (Eira, 2003), ficando os produtores à mercê dessas exigências sem especificações determinadas pela legislação no país.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Obtenção do material de cobertura

O trabalho de pesquisa foi conduzido no Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA), MG. As amostras de material de cobertura (terra) foram obtidas nas proximidades de Lavras, MG, e conduzida para a área experimental de cultivo de cogumelos comestíveis e medicinais situada nas dependências do Departamento de Biologia da UFLA. A obtenção das amostras de terra foram realizadas nos meses de fevereiro e março de 2004, sendo posteriormente submetidas aos diferentes tratamentos. As três amostras de terras de localidade e natureza físico-química distintas, classificadas de acordo com EMBRAPA (2000), em Latossolo Vermelho distroférico (LVdf), Latossolo Amarelo distrófico (LAdi) e Gleissolo Melânico (GSm), foram peneiradas em peneira com malha de 1cm, para a retirada de raízes, pedras e vegetação nativa oriunda do local de coleta. Todas as amostras foram armazenadas em vasos de polietileno e posteriormente submetidas aos diferentes tratamentos. As análises física dos solos estão listadas em Anexo.

#### 3.2 Cultivo de *Agaricus blazei*

O composto utilizado para o cultivo de *A. blazei* foi adquirido previamente colonizado do Laboratório de Cogumelos Comestíveis e Medicinais do DBI/UFLA, e transferido para vasos de polietileno, onde cada vaso recebeu 5kg de composto. A cada vaso foi adicionada uma camada de 5cm de terra (de acordo com o tratamento). Durante toda a etapa de cultivo, a temperatura do ar manteve-se em torno de 28°C e a umidade da terra de cobertura em 70%.

### **3.3 Desinfestação da camada de cobertura**

As amostras de camada de cobertura analisadas foram igualmente submetidas a dois diferentes tipos de tratamento, sendo pasteurização com vapor d'água e tratamento com formol. O controle não recebeu nenhum tratamento.

#### **3.3.1 Tratamento com formol**

As amostras foram acondicionadas em vasos de polietileno (capacidade 15 kg) e a cada vaso foi adicionada solução de formol a 10%, sendo 20 litros/m<sup>3</sup> de terra (Braga et al., 1998). Em seguida, os vasos foram cobertos com sacos plásticos garantindo a vedação, permanecendo dessa forma pelo período aproximado de 5 dias. Para a utilização como camada de cobertura, foi removido o saco plástico e a terra foi espalhada até total volatilização do produto ficando as amostras sem o odor característico da solução.

#### **3.3.2 Tratamento com vapor d'água**

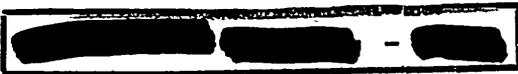
As três amostras de terra foram colocadas sobre uma fina tela (sombrite) no fundo de um pasteurizador de composto, ficando com aproximadamente 3-4 cm de altura, recebendo vapor d'água fluente durante o período aproximado de 6 horas. A temperatura no interior da câmara permaneceu entre 60°C e 65°C.

#### **3.3.3 Terra sem tratamento**

As amostras de terra utilizadas foram apenas peneiradas e acondicionadas em vasos de polietileno.

### **3.4 Preparo das amostras**

Alíquotas das três amostras de terra foram coletadas utilizando materiais estéreis e acondicionadas em embalagens plásticas, sendo devidamente transportadas para o Laboratório de Microbiologia do Departamento de Biologia



da UFLA. As amostras referentes aos três materiais de cobertura, submetidos aos diferentes tratamentos, foram previamente homogeneizadas antes da retirada das alíquotas destinadas às análises.

### **3.5 Quantificação da comunidade bacteriana nos diferentes tipos de solo**

Para a análise microbiológica, foram pesados 10 gramas das diferentes amostras, as quais foram transferidas para frascos Erlenmeyer contendo 90mL de água peptonada 0,1% estéril. Cada amostra foi agitada a 200rpm/30 minutos. Para a contagem de colônias, foi utilizado a técnica de plaqueamento por microgota (Romeiro, 2001), das diluições decimais seriadas em meio de cultivo AN (em g.L<sup>-1</sup>: extrato de carne, 3; peptona bacteriológica, 5; NaCl, 3; ágar, 13) e PIA (*Pseudomonas* Isolation Ágar – DIFCO) (em g.L<sup>-1</sup>: peptona bacteriológica, 20; cloreto de magnésio, 1,4; sulfato de potássio, 10; Irgasan ® 0,025; ágar bacteriológico, 13,6). As placas foram incubadas a temperatura ambiente de 25°C ± 1°C, durante 24 horas.

Após incubação, foram contadas e selecionadas as placas que continham entre 3-30 colônias, de acordo com técnica de plaqueamento em microgota (Romeiro, 2001). O número de colônias contadas foi multiplicado pela recíproca da diluição e o resultado expresso como unidades formadoras de colônias (UFC).

### **3.6 Isolamento e identificação de bactérias da camada de cobertura**

Para a seleção de isolados de acordo com morfotipo das colônias, foi utilizado o cálculo da raiz total destes, que foram transferidos para tubos de ágar inclinado com o meio original e incubado em temperatura ambiente até o crescimento das colônias.

Os isolados foram purificados utilizando-se a técnica de estrias compostas em meio AN e confirmada sua pureza com testes de coloração de Gram. As cepas de bactérias gram-negativas foram identificadas com “kits” bioquímicos Bactray I, II e III.

Além do isolamento de bactérias nos diferentes tipos de terra submetidos aos diferentes tratamentos, foi realizado o isolamento de bactérias na camada de cobertura desde a colocação da terra sobre o composto até o início da frutificação. Para essa etapa, foi selecionado o Latossolo Amarelo distrófico (LAdi) desinfestado por vapor d'água. Foram utilizados 10 vasos com 5kg de composto/vaso e uma camada de 5cm de cobertura.

Foram retiradas aleatoriamente alíquotas de terra desses vasos durante o período de 1, 7, 14, 21, 28 e 32 dias, até início da frutificação, para avaliar o número de microrganismos presentes na terra durante esse período e identificá-los. As amostras de terras oriundas do mesmo local, submetidas aos tratamentos com formol e sem tratamento, também foram adicionadas ao composto colonizado, sendo observada a produtividade para cada tratamento.

### **3.7 Adaptação e manutenção de *Pseudomonas putida* (ATCC)**

A adaptação e a multiplicação das células bacterianas iniciou-se com a inoculação de uma alçada da cultura de *P. putida* (ATCC), adquirida da Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia André Tosello, Campinas, SP, em meio nutriente à temperatura de 25°C/24 horas. Alíquotas foram transferidas para tubos plásticos com caldo nutriente e mantidas sob congelamento em glicerol a 20% e por estrias compostas em meio AN em geladeira a 4°C.

### **3.7.1 Preparo do inóculo de *Pseudomonas putida* para a camada de cobertura**

Alíquotas de 200 $\mu$ L da cultura reativada foram adicionadas a 200mL de caldo nutriente sob agitação a 100rpm/24 horas. A cultura foi centrifugada a 4000 rpm/15 minutos a 4°C e as células foram ressuspendidas em solução salina a 0,85%. O procedimento foi repetido e o pellet foi diluído em 200mL de solução fisiológica 0,85% para posterior adição a vermiculita estéril (material inerte).

#### **3.7.1.2 Inoculação de *Pseudomonas putida* na camada de cobertura**

O Latossolo Amarelo distrófico foi autoclavado a 121°C/1hora (Trevors, 1996), durante 3 dias consecutivos, em sacos plásticos com 1kg de terra.

O material inerte, vermiculita (200g/embalagem), foi umedecido com 50 mL de água e autoclavado a 121°C/30 minutos. Após resfriamento do material, células de *Pseudomonas putida* foram adicionadas nas concentrações de  $10^5$  e  $10^4$  mL/g de terra. Para cada 4kg de terra foram utilizados 200g de vermiculita estéril, com as respectivas concentrações de células de bactérias.

A vermiculita com a bactéria foi cuidadosamente homogeneizada em bandeja plástica antes de ser adicionada à terra autoclavada. Para essa etapa, foi estabelecida a quantidade de 4kg de composto colonizado/vaso. Para a concentração de  $10^5$ , foram utilizados 7 vasos e, para a concentração de  $10^4$ , 6 vasos. No tratamento controle, foi utilizado a terra autoclavada sem adição de bactérias, com 7 repetições.

### **3.7.2 Crescimento do micélio de *A. blazei* e *A. bisporus* in vitro na presença *Pseudomonas putida***

#### **3.7.2.1 Obtenção dos inóculos de *A. blazei* e *A. bisporus***

Para padronizar o inóculo de *A. blazei* foram retirados discos com dimensões de 6x6 mm da margem de uma cultura cultivada em meio BDA (em g.L<sup>-1</sup>: batata, 200; glicose, 15; ágar, 15), a 25°C, com 10 dias de crescimento, do isolado CS1. Para o *A. bisporus*, os discos foram retirados com 15 dias de crescimento da cultura a 25°C (Rainey, 1991), de um isolado pertencente à coleção de fungos filamentosos do Departamento de Biologia da UFLA, denominado CHP.

#### **3.7.2.2 Suspensão de *P. putida* e discos de ágar com a bactéria**

Para reativar as células bacterianas, uma alçada da cultura mantida em AN armazenado em geladeira, foi inoculada em 3mL de caldo nutriente e mantida a 25°C ±1 durante 24 horas. Alíquota de 500µL da cultura reativada foi transferida para 100 mL de meio nutriente líquido e mantida sob agitação de 100rpm por 24 horas (adaptado de Cho et al., 2003). O número de células foi obtido por meio da técnica de plaqueamento por microgota (Romeiro, 2001) e o resultado expresso em unidade formadora de colônia (UFC/mL). Cada 1mL de suspensão da cultura bacteriana continha 3x10<sup>9</sup> células, sendo essa a cultura padrão.

Os discos de ágar nutriente contendo a *P. putida* foram preparados adicionando-se 19mL de ágar água 1,5% (AA) com 1mL da suspensão padrão em uma placa de Petri estéril (Hume & Hayes, 1972; Cho et al., 2003). Após a solidificação, foram cortados com auxílio de uma ponteira estéril, de modo que cada disco mantivesse diâmetro de 6x6mm.

### 3.7.2.3 Produção de corpo de frutificação em meio sólido “Halbschalentest”

O método “Halbschalentest” (Eger, 1962; Hume & Hayes, 1972) foi simulado com adaptações nos meios de cultivo utilizados. Foram utilizadas placas de Petri de plástico com divisão central esterilizadas com solução de formol/24 horas em recipiente fechado e 60 minutos de luz ultravioleta (UV). Os meios BDA, ágar malte (AM) (em g.L<sup>-1</sup>: extrato de malte, 20; ágar, 15), meio composto (MC) (em g.L<sup>-1</sup>: composto autoclavado, 500; glicose, 10; ágar 20, pH ajustado para 7,0 com NaOH 1N antes de autoclavar a 121°C/30 minutos) e meio composto com adição de malte (MCM) (em g.L<sup>-1</sup>: composto autoclavado, 500; glicose, 10; extrato de malte, 7,5; ágar, 20, com pH ajustado para 7,4 com NaOH 1N antes de autoclavar a 121°C/30 minutos) (adaptado de Rainey et al., 1990), e ágar água (AA) (em g.L<sup>-1</sup>: ágar 15) foram utilizados.

Em uma das divisões da placa foi adicionado um dos meios citados acima (BDA, AM, MC, MCM), simulando o crescimento vegetativo (meio rico em nutrientes), aos quais foram adicionados dois discos de *A. blazei*. As placas foram incubadas a 25°C até o micélio atingir a porção central da placa. À outra metade da placa foi adicionado ágar água (AA), meio pobre em nutrientes e, incubadas, durante um período adicional de aproximadamente 30 dias, a 25°C. Durante esse período, discos de ágar água contendo *P. putida* foram adicionados à superfície do meio pobre em nutrientes (AA). As placas foram novamente incubadas à temperatura ambiente.

O mesmo procedimento foi repetido com *A. bisporus* como controle. Todas as análises foram realizadas utilizando dez repetições.

### 3.8 Efeito de *P. putida* na indução do crescimento de *Agaricus*

Discos de micélio de *A. blazei* e *A. bisporus* foram analisados juntamente com a bactéria *P. putida*. Os meios de cultivo BDA, ágar malte e,

meio composto com adição de malte (adaptado de Rainey et al., 1990), foram previamente adicionados a placas de Petri e submetidos a dois procedimentos.

A cada placa de Petri foi adicionado um disco de *A. blazei* 6x6mm de diâmetro oriundo da margem de uma colônia com 10 dias de crescimento, o qual foi incubado a 25°C por 6 dias. Após esse período, uma alíquota de 10µL de *P. putida* foi inoculada na superfície do meio numa área de 20x25mm e espalhada com auxílio de alça de platina, de forma que cobrisse toda a região delimitada. A região delimitada foi mensurada em intervalos de tempos consecutivos durante 120 horas, em temperatura ambiente (adaptado de Rainey, 1991).

Outro procedimento foi a inoculação de 10µL da cultura bacteriana espalhada com alça de Drigalski na superfície do meio previamente solidificado, sendo adicionado um disco de micélio na região central de cada placa, realizado com dez repetições. As placas controle não foram inoculadas com a bactéria, sendo realizado o procedimento com oito repetições.

O micélio de *A. bisporus* foi avaliado de acordo com o mesmo procedimento, mantendo o mesmo número de repetições.

Foram testadas estrias simples utilizando alça de platina, partindo do disco de micélio inoculado centralmente, espalhando alíquota de 10µL da cultura bacteriana. Esse procedimento foi realizado para micélios de *A. blazei* e *A. bisporus* (Rainey et al., 1990).

### **3.9 Análise estatística**

A análise estatística foi realizada no programa SISVAR 4,3 (Ferreira, 1999) por meio do teste de Tukey a 5% de probabilidade, para a comparação da população total dos microrganismos nas diferentes amostras de terra, antes e após os tratamentos. Da mesma forma, foi realizada análise durante o período de 1 a 32 dias com o tratamento vapor utilizando o Latossolo Amarelo distrófico (LAdi) oriunda da área de pastagem.

### **3.10 Colheita e lavagem dos basidiocarpos**

A colheita dos basidiocarpos ocorreu antes da abertura do píleo, enquanto suas bordas ainda estavam voltadas para baixo. Tal fato iniciou-se aproximadamente duas semanas e meia após a adição da camada de cobertura.

Os basidiocarpos foram lavados individualmente em água corrente com auxílio de escova e esponja macia, de modo que toda terra fosse retirada. Após lavagem, a massa fresca foi determinada com auxílio de uma balança semi-analítica e os basidiocarpos foram seccionados ao meio e transferidos para estufa à temperatura de 50°C, por 24-48 horas, até total desidratação das amostras. Em seguida, foram selecionados de acordo com o tamanho e acondicionados em embalagem plástica, mantida em refrigerador a 4°C. As amostras submetidas a quantificação microbiológica, após o período de desidratação foram imediatamente retiradas e submetidas às respectivas análises.

### **3.11 Determinação da composição centesimal de basidiocarpos de *A. blazei* de dois fluxos, oriundos da camada de cobertura desinfestada por vapor d'água**

A análise centesimal de dois fluxos sucessivos de *A. blazei* foi determinada considerando as características: umidade, extrato etéreo, proteína, fibra, cinzas e fração glicídica, todas expressas em porcentagem.

Para determinar a umidade, foi utilizado o método gravimétrico com emprego de calor (105°C), até obtenção de peso constante das amostras (AOAC, 1990). A fração protéica foi obtida pela determinação da porcentagem de nitrogênio, dosado pelo método de Kjeldahl e multiplicado pelo fator de correção 6,25 (AOAC, 1990). O extrato etéreo ou lipídeo foi obtido por meio da extração contínua em aparelho do tipo Soxhlet, segundo método AOAC (1990), enquanto a fibra bruta foi determinada pelo método gravimétrico, após hidrólise ácida (AOAC, 1990). Para a determinação da porcentagem do resíduo de cinzas

foi necessária a incineração (550°C) de quantidade definida de matéria seca desengordurada (AOAC, 1990) e a fração glicídica ou extrato não nitrogenado foi obtida pela diferença.

### **3.12 Análise microbiológica de basidiocarpos de *A. blazei* desidratados**

A determinação da análise microbiológica dos basidiocarpos de *A. blazei* cultivados em vasos de polietileno, utilizando o Latossolo Amarelo distrófico (LAdi) como camada de cobertura, desinfestada por vapor d'água, formol e controle foi determinada após desidratação, empregando metodologia proposta para produtos utilizados em infusão (ANVISA, 2001).

#### **3.12.1 Detecção e quantificação de coliformes a 35°C e coliformes termotolerantes**

Para a quantificação de coliformes a 35°C foi empregada a técnica do número mais provável (NMP), usando-se o caldo lauril-sulfato-triptose (LST) em série de três tubos. As amostras foram previamente homogeneizadas em Stomacker por 10 minutos. Aliquotas foram transferidas para tubos de LST incubados a 35°C/24-48 horas. A análise de coliformes termotolerantes foi realizada pela transferência de aliquotas das culturas positivas em LST para tubos contendo caldo *E. coli* (EC) e incubados a 45,5°C/24-48 horas em banho-maria. Para análise de coliformes totais, repetiu-se o mesmo procedimento descrito acima, diferindo no meio de cultura e temperatura, sendo utilizado caldo verde-brilhante bile (VB) incubado a 35°C/24-48 horas. Aliquotas dos tubos positivos em caldo EC foram estriadas em meio ágar para enterobactérias Hecktoen e incubadas a 35°C/24 horas (Silva et al., 1997).

### **3.12.2 Detecção de *Salmonella* sp**

Foram pesados 25g da amostra, que foi homogeneizada em 225mL de água peptonada tamponada. Após homogeneização, as amostras foram incubadas por 35-37°C/18-20 horas, fase de pré-enriquecimento. Alíquotas de 1mL da fase de pré-enriquecimento foram transferidas para tubos com 9mL de caldo Rappaport e caldo Tetrionato, incubados a 35-37°C/24 horas, sendo essa etapa o enriquecimento seletivo.

Do enriquecimento seletivo foram feitas estrias em meios sólidos ágar entérico de Hecktoen e ágar Rambach (Merck®), incubadas a 35-37°C/24 horas (Silva et al., 1997).

### **3.12.3 Detecção de *Staphylococcus* sp**

Alíquotas de 0,1mL das amostras diluídas foram incubadas em placas contendo ágar Baird-Parker, utilizando-se a técnica de plaqueamento em superfície. Após a inoculação, as placas foram incubadas a 35°C por 48 horas. Foi avaliado o número total de colônias e o resultados expresso em UFC/g (Silva et al., 1997).

### **3.12.4 Quantificação de fungos filamentosos e leveduriformes**

Foram pesados 25g da amostra e homogeneizados em 225mL de água peptonada 0,1% e realizada as diluições decimais seriadas. Alíquotas de 0,1mL de cada diluição foram inoculadas em triplicata, utilizando-se a técnica de plaqueamento em superfície no meio sólido ágar batata dextrose (BDA) acidificado com ácido tartárico. Após homogeneização, as placas foram incubadas a 20-25°C, de 3 a 5 dias (Silva, et al., 1997).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Quantificação da comunidade bacteriana presente na camada de cobertura

Na Tabela 1 encontra-se a contagem total de bactérias presentes em três diferentes terras utilizadas como camada de cobertura, com resultados expressos em UFC/g<sup>-1</sup>. Os métodos de desinfestação foram analisados e correlacionados com os materiais disponíveis na região, utilizados como camada de cobertura. O tratamento com formol apresentou redução mais expressiva no número de microrganismos, não apresentando diferenças significativas entre o Latossolo Vermelho distroférico (LVdf) e o Latossolo Amarelo distrófico (LAdi) com nível de probabilidade de 5%. Na terra hidromórfica (Gleissolo Melânico - GSm), os tratamentos não foram eficientes na redução da população microbiana, sendo quantificados valores médios de  $1,24 \times 10^7$  UFC/g. Tal fato deve-se, provavelmente, às propriedades estruturais e ao local de amostragem da terra. Essa amostra de terra é proveniente de uma área de várzea, contendo grande quantidade de matéria orgânica, excessiva umidade e baixa capacidade de liberá-la.

Os valores médios encontrados para a desinfestação com vapor d'água ou sem nenhum tratamento não apresentaram diferenças significativas. A contagem total apresentou valores de  $2,64 \times 10^6$  e  $3,0 \times 10^6$  UFC/g para a desinfestação com vapor e sem tratamento, respectivamente.

Pardo et al. (2002) obtiveram valores médios para contagem total de bactérias de  $3,5 \times 10^5$  e  $2,1 \times 10^7$  UFC/g, trabalhando com diferentes tipos de camada de cobertura utilizada no cultivo de *A. bisporus* na Espanha. Foram testados solos e uma mistura binária de 80% de solo e 20% de materiais alternativos, como turfa, turfa negra, resíduos da indústria madeireira, fibra de

coco e resíduos de uva. Os resultados referentes à contagem média de bactérias ao utilizar somente terra como material de cobertura estão compreendidos entre  $10^5$  e  $10^6$  UFC/g, determinados no momento da colocação da camada de cobertura sobre o composto colonizado.

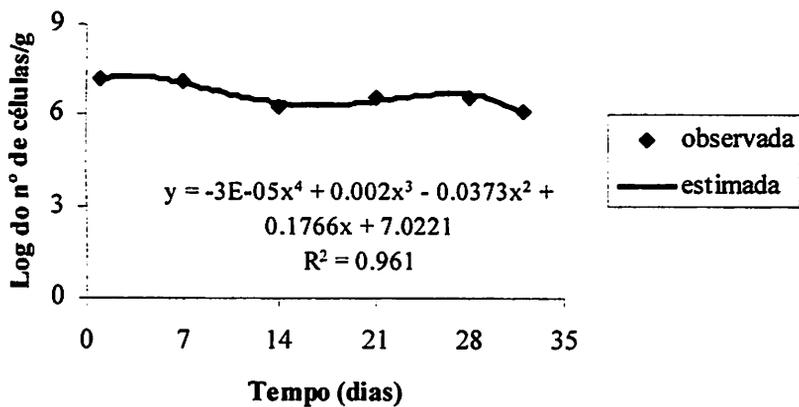
**TABELA 1** Contagem total de bactérias presentes nas três diferentes terras submetidas aos tratamentos de desinfestação da camada de cobertura, expressos em UFC/g de terra no cultivo de *A. blazei*. Média de oito repetições.

Desinfestação	Terras							
	LAdi		GSm		LVdf		Média*	
Autoclavada	0	cA	0	cA	0	dA	0	c
Formol	5,0x10 <sup>4</sup> bB		1,24x10 <sup>7</sup> aA		2,70x10 <sup>4</sup> cB		4,15x10 <sup>6</sup> b	
Vapor	3,72x10 <sup>6</sup> aA		3,57x10 <sup>6</sup> bA		2,27x10 <sup>5</sup> bB		2,64x10 <sup>6</sup> a	
S/Tratamento	4,13x10 <sup>6</sup> aA		4,50x10 <sup>6</sup> bA		8,02x10 <sup>5</sup> aB		3,0x10 <sup>6</sup> a	
Média*	1,98x10 <sup>6</sup> B		5,12x10 <sup>6</sup> A		2,64x10 <sup>5</sup> C			

\* Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo Teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Letras minúsculas comparam as médias nas colunas e as letras maiúsculas comparam as médias na linha.

Colauto & Eira (1998), ao analisarem diferentes camadas de cobertura e camadas alternativas, utilizadas no Reino Unido para *A. bisporus*, também encontraram elevadas populações microbianas, uma vez que essas misturas contribuem para maior diversidade de microrganismos presentes nesses materiais.

A contagem total de bactérias e de gram-negativos foi determinada durante 32 dias após a etapa de cobertura do composto colonizado. Os dados estão expressos em Tendência Polinomial, com coeficiente de determinação  $R^2$  de 96% (Figura 1).

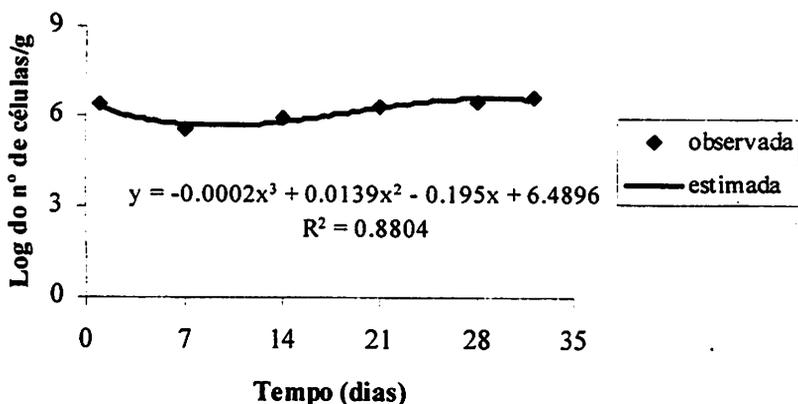


**FIGURA 1** Contagem total de bactérias presentes no Latossolo Amarelo distrófico (LAdi) desinfestado por vapor d'água no período de 1 a 32 dias, até início da frutificação.

A contagem total de bactérias revelou a diminuição da população bacteriana inicial até o 14º dia. Após esse período, verificou-se um ligeiro aumento no crescimento da população. Em trabalhos com *A. bisporus*, Reddy & Patrick (1990) observaram que a população bacteriana manteve altos índices, associada à camada de cobertura, durante as primeiras semanas. Segundo os mesmos autores, foi observada acentuada atividade bacteriana em dois picos na camada de cobertura, uma a aproximadamente 14 dias e a outra com 42 dias após a aplicação da cobertura do composto colonizado com *A. bisporus*.

Neste trabalho é possível que o aumento da população bacteriana esteja associado à colonização da terra pelo micélio do *A. blazei*, considerando que a retirada da amostra ocorreu sempre 1cm abaixo da superfície da camada de cobertura, porque somente após 15 a 20 dias o micélio de *A. blazei* consegue colonizar toda a terra de cobertura. Ao mesmo tempo, a diminuição da população bacteriana até o 14º dia pode ser explicada pelo fato da superfície sofrer maiores variações de umidade e temperatura.

Da mesma forma, foi estabelecida a quantificação de bactérias gram-negativas durante os 32 dias após a adição da camada de cobertura sobre o composto colonizado, até início da frutificação (Figura 2). Verificou-se que os dados adequaram-se melhor à tendência polinomial, com coeficiente de determinação apresentando valores de 88%. A população de bactérias gram-negativas apresentou um decréscimo na população inicial, da mesma forma que a contagem total de microrganismos. Entretanto, essa redução mostrou-se mais acentuada no 7º dia, após o qual ocorreu discreto aumento nessa população, tendendo a estabilizar próximo ao 32º dia, no qual iniciou-se a frutificação.



**FIGURA 2** Crescimento de bactérias gram-negativas presentes no Latossolo Amarelo distrófico (LAdi) desinfectado por vapor d'água, no período de 1 a 32 dias, até início da frutificação.

De acordo com Wood & Fermor (1986), estudos utilizando microscopia eletrônica revelaram contínuo e vagaroso declínio no número de bactérias presentes no composto colonizado durante a produção dos corpos de frutificação.

Em trabalho com *A. bisporus*, Pardo et al. (2002) também observaram aumento na população bacteriana na contagem total e contagem de bactérias gram-negativas após o primeiro fluxo de frutificação, a qual manteve-se elevada durante os sucessivos fluxos.

Diversos autores relatam que o gênero *Pseudomonas* sp predomina no cultivo de *A. bisporus*, associadas ao composto e aos diferentes materiais utilizados como cobertura (Reddy & Patrick, 1990; Miller et al, 1995; Colauto & Eira, 1998; Pardo et al., 2002).

Colauto & Eira (1998) observaram densa população de *Pseudomonas* sp presente no material de cobertura durante a fase de produção. Tal fato pode ser influenciado pela quimiotaxia dessas bactérias, que respondem ao gradiente de nutrientes excretados pelo micélio (Masaphy et al., 1987; Grewal & Rainey, 1991; Miller et al., 1995).

Miller et al. (1995) consideram a influência de dois fatores no aumento do número de bactérias pertencentes ao gênero *Pseudomonas* sp, em relação ao total de bactérias após a colocação da cobertura sobre o composto colonizado. O primeiro fato refere-se ao ambiente fornecido pela camada de cobertura, a qual possui escassos nutrientes, e o segundo fator é inerente à produção de metabólitos pelo fungo que, possivelmente, cria gradiente nutricional que as bactérias quimiostáteis podem responder.

A capacidade de *Pseudomonas* sp mover-se em direção aos nutrientes confere vantagem sobre aquelas com menor motilidade ou não quimiostáteis (Miller et al., 1995). Grewal & Rainey (1991) demonstraram a migração de *P. putida* e *P. tolaasii* em direção aos exsudados do micélio de *A. bisporus*, reforçando a idéia de que o mesmo fato pode ocorrer no ambiente de cobertura do composto. Trabalhos realizados por Steidle et al. (2002) mencionam a capacidade de *P. putida* sintetizar metabólitos com atividade antagônica a patógenos de plantas, presentes no solo, favorecendo o desenvolvimento das raízes desses vegetais.

#### **4.2 Identificação de bactérias isoladas do material de cobertura**

Os microrganismos identificados nos diferentes tratamentos e terras, neste trabalho, estão listados nas Tabela 4 a 7, demonstrando diferentes membros do gênero *Pseudomonas* sp e outras espécies de bactérias.

A bactéria *P. putida* tem sido relatada como espécie presente no processo de indução de frutificação (Curto & Favelli, 1972; Hume & Hayes,

1972; Rainey & Cole, 1987), entretanto, não foi possível identificá-la nas amostragens. No entanto, ainda não se pode afirmar que essa espécie não esteja presente, uma vez que somente parte dos microrganismos isolados foi identificada e em torno de 10% se perderam durante o processo de armazenamento e purificação dos isolados.

As Tabelas 4 e 5 mostram as espécies de bactérias isoladas das terras sem tratamento e desinfestadas com formol, respectivamente, enquanto a Tabela 6 refere-se às espécies isoladas das terras desinfestadas com vapor d'água. Os resultados mostraram a presença de várias espécies consideradas indesejáveis do ponto de vista alimentar, ou seja, relacionado à integridade e à segurança do alimento. Um aspecto muito importante desses resultados é que a desinfestação com formol não foi suficiente para eliminar essas espécies de bactérias (Tabela 5). O mesmo fato foi constatado na terra desinfestada com vapor d'água, observando-se a presença de várias espécies potencialmente patogênicas.

**TABELA 4** Bactérias gram-negativas\* isoladas de três amostras de terras utilizadas como camada de cobertura.

<b>Terras sem tratamento</b>		
<b>Gleissolo Melânico (GSm)</b>	<b>Latossolo Amarelo distrófico (LAdi)</b>	<b>Latossolo Vermelho distroférico (LVdf)</b>
<i>Serratia odorifera</i>	<i>E. agglomerans</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Shigella flexner</i>	<i>F. meningosepticum</i> (2)	<i>P. aerogenes</i>
<i>Enterobacter agglomerans</i>	<i>Pseudomonas vesicularis</i>	<i>F. meningosepticum</i>
<i>Flavobacterium odoratum</i>	<i>Pseudomonas putrefaciens</i>	
<i>F. meningosepticum</i>	<i>Flavobacterium II</i>	
<i>Pseudomonas fluorescens</i>		

\* O número entre parênteses indica a quantidade de microrganismo de mesma espécie.

**TABELA 5** Bactérias gram-negativas isoladas de três terras amostras de utilizadas como camada de cobertura, utilizando desinfestação com formol.

<b>Terras desinfestadas com formol</b>		
<b>Gleissolo Melânico (GSm)</b>	<b>Latossolo Amarelo distrófico (LAdi)</b>	<b>Latossolo Vermelho distroférico (LVdf)</b>
<i>Salmonella enteritidis</i>	<i>Flavobacterium II</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Pseudomonas putrefaciens</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	
<i>Pasteurella multocida</i>		
<i>Taumella pyseos</i>		
<i>Enterobacter agglomerans</i>		
<i>Flavobacterium II</i>		

Na Tabela 6 estão representadas as bactérias presentes nos três tipos de terra desinfestadas por vapor d'água. De maneira geral, as bactérias identificadas em função dos tratamentos de desinfestação da terra, compreendem microrganismos do gênero *Salmonella*, *Shigella*, *Achromobacter*, *Serratia*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Kluyvera*, *Tatumella* e *Pseudomonas*, dentre outros. O tratamento da terra de cobertura tem como objetivo eliminar pragas e microrganismos indesejáveis sem, no entanto, eliminar a microbiota natural e potencialmente benéfica para a frutificação do cogumelo. Por isso, esperava-se neste trabalho verificar se os tratamentos com formol e vapor d'água permitiam a permanência de bactérias do gênero *Pseudomonas*, o que foi confirmado. Porém, se, por um lado, esses tratamentos não eliminam bactérias potencialmente benéficas para a frutificação, por outro lado também não eliminaram bactérias indesejáveis, muitas patogênicas ao homem. Esses resultados mostram a necessidade de monitoramento microbiológico dos

cogumelos pós-colheita e de cuidadoso procedimento de colheita, lavagem e desidratação dos cogumelos.

**TABELA 6** Bactérias gram-negativas isoladas de três amostras de terras utilizadas como camada de cobertura, utilizando desinfestação com vapor d'água.

<b>Terras desinfestadas com vapor d'água</b>		
<b>Gleissolo Melânico (Gsm)</b>	<b>Latossolo Amarelo distrófico (Ladi)</b>	<b>Latossolo Vermelho distroférico (LVdf)</b>
<i>Serratia odorifera</i>	<i>Serratia odorifera</i>	<i>Shigella dysenteriae</i>
<i>Shigella boydii</i>	<i>Pseudomonas cepacia</i>	<i>F. meningosepticum</i>
<i>Yersinia enterocolitica</i>	<i>Salmonella chol. suis</i>	<i>P. cepacia</i>
<i>P. fluorescens</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>P. paucimobilis</i>
<i>Achrombacter</i> sp	<i>F. meningosepticum</i>	<i>Kluyvera</i> sp
	<i>Escherichia. coli</i>	
	<i>Enterobacter agglomerans</i>	
	<i>Pasteurella haemolyticus</i>	
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	

Na Tabela 7 estão descritas as espécies de bactérias isoladas da camada de cobertura desde o momento da adição de terra sobre o composto colonizado (cobertura) até o 32º dia. É importante notar que o gênero *Pseudomonas* esteve presente desde o 1º dia e não foi verificado um aumento significativo na sua população até o 32º dia. Ao mesmo tempo, verificou-se a permanência de espécies patogênicas.

**TABELA 7** Bactérias gram-negativas isoladas do Latossolo Amarelo distrófico (LAdi) desinfestado com vapor d'água, durante período de 32 dias até início da frutificação.

Dias de amostragem	Microrganismos*	
1º dia	<i>Salmonella enteritidis</i>	<i>Shigella boydii</i>
	<i>Pasteurella multocida</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
7º dia	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (2)
	<i>Flavobacterium</i> II	
14º dia	<i>Pasteurella multocida</i>	<i>Salmonella enteritidis</i>
	<i>F. meningosepticum</i>	<i>Pseudomonas cepacia</i>
	<i>Escherichia coli</i>	
21º dia	<i>P. fluorescens</i> (2)	
28º dia	<i>Salmonella enteritidis</i>	<i>Shigella flexner</i> (2)
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	
32º dia	<i>Pseudomonas cepacia</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (2)

\* O número entre parênteses indica a quantidade de microrganismo de mesma espécie.

Cho et al. (2002) isolaram e identificaram 45 bactérias aderidas ao micélio de *P. ostreatus*, pertencentes a 17 gêneros diferentes. Dentre os isolados encontram-se *Enterobacter*, *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Kluyvera* e a espécie *P. putida*, tendo o número de *P. putida* correspondido a 22% dos isolados identificados. Os quatro gêneros citados acima também foram identificados nas terras utilizadas como material de cobertura no cultivo de *A. blazei*.

#### 4.3 Inoculação de *P. putida* na camada de cobertura

No material de cobertura inoculado com a bactéria *P. putida*, ocorreu a frutificação apenas no primeiro fluxo e os resultados não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos com a adição da bactéria e o controle (dados não demonstrados).

Os cogumelos colhidos desse procedimento não apresentaram alterações de tamanho, peso, coloração ou presença de doenças e não houve antecipação do primeiro fluxo de frutificações, como ocorreu em trabalhos com *A. bisporus* desenvolvido por Curto & Favelli (1972).

Esses autores adicionaram diferentes grupos de microrganismos isolados ou combinados no composto colonizado antes da colocação da camada de cobertura e uma semana após a etapa de cobertura. Membros dos gêneros *Bacillus* sp, *Rhizobium* sp, *Azobacter* sp, *Pseudomonas* sp e uma solução mista combinando diferentes membros desses gêneros e de outros, ocasionaram antecipação da frutificação em relação aos tratamentos controle. O aumento da produção total de basidiocarpos foi observado somente no tratamento com adição de *Bacillus* sp, *Azobacter* sp e *Bejerinckia venezuelae*. O tratamento que recebeu a solução mista aumentou a produtividade final em torno de 20%-30% (Curto & Favelli, 1972).

Além disso, os autores observaram que a adição da microalga *Scenedesmus quadriculata* aumentou o número de cogumelos, particularmente

no primeiro fluxo, sem aumentar o tamanho dos mesmos. Neste trabalho, Curto & Favelli (1972) sugerem a ocorrência de diferentes microrganismos e as complexas interações associadas ao cultivo de *Agaricus bisporus*.

#### 4.4 Produtividade de *A. blazei*

Os valores obtidos referentes à produtividade de *A. blazei* nos diferentes métodos de desinfestação de terra estão demonstrados na Tabela 8.

**TABELA 8** Produtividade\* de *A. blazei* em função dos três métodos de desinfestação do material de cobertura, utilizando Latossolo Amarelo distrófico (Ladi), oriundo de área de pastagem.

Desinfestação	Cogumelo fresco	Produtividade(%)	Produtividade (%)
		cogumelo fresco	cogumelo seco
Formol	307	6,14%	0,92%
Vapor d'água	285	5,7%	0,85%
Sem tratamento	391	7,82%	1,00%

\* valores médios de 2 meses de frutificação

Com relação à produtividade de *A. blazei*, Eira (2003) menciona que podem ser obtidos índices de 3% a 25 % em base úmida, ressaltando que essas oscilações podem ser influenciadas pelos sistema de cultivo. O percentual de conversão do substrato em biomassa fúngica é denominado de eficiência biológica (EB). No cultivo de *A. blazei*, a EB ainda obtém baixos índices, quando comparado com a produtividade do *A. bisporus* na Europa, com valores de 105% (Eira, 2003). Braga & Eira (1999) sugerem que a produtividade pode ser afetada por fatores ambientais, umidade e características do material de

cobertura, bem como fatores genéticos e nutricionais (Eira, 2003). No Brasil, considera-se que a produtividade de *A. blazei* deve ser de, pelo menos, 1% para que o cultivo seja viável economicamente, considerando o cogumelo seco.

#### 4.5 Indução de primórdios por *P. putida* in vitro

Método simulando a formação de primórdios in vitro foi descrito por Hume & Hayes (1972) e modificado no presente trabalho, para o crescimento do micélio de *A. blazei* e de *A. bisporus*. No entanto, não foi verificada a formação de primórdios em função da adição de *P. putida*. Cho et al. (2002) ao trabalhar em com *P. ostreatus* associado ao gênero *Pseudomonas* spp obtiveram a formação de primórdios em placas. Esses autores isolaram, identificaram e testaram 45 isolados de bactérias oriundas da superfície do micélio de *P. ostreatus* e nenhum dos isolados apresentou resultados positivos, com exceção da espécie *P. putida* encontrada.

Rainey et al. (1990) também observaram a promoção do crescimento de micélio de *A. bisporus*, sem obter a formação de primórdios pelo método de Hume & Hayes (1972) com adaptações. Entretanto, ao utilizarem *Agaricus bitorquis* em meio de cultura à base de composto e malte, obteve indução de primórdios sugerindo novos estudos em placas de Petri, uma vez que esta espécie possui mecanismos fisiológicos que controlam a frutificação, semelhantes ao do *Agaricus bisporus* (Rainey et al., 1990).

As metodologias realizadas por Rainey et al. (1990) e Rainey (1991) foram seguidas neste trabalho apenas adaptando os meios utilizados. Não houve indução significativa do micélio de *A. blazei* e de *A. bisporus* em associação com *P. putida* nos meios BDA e Malte. Esses resultados reforçam os insucessos de outros trabalhos que atribuem ao método excessiva demanda de tempo e falta de consistência nos dados (Rainey & Cole, 1987; Colauto & Eira, 1998) aliadas a fatores genéticos, físicos e nutricionais.

Em pesquisas com a espécie *A. bitorquis* associado a *P. putida*, desenvolvidas por Rainey et al. (1990), foi possível evidenciar a diferenciação do micélio com formação de primórdios em placas de Petri, reforçando a utilização de *A. bitorquis* como modelo para estudos da morfogênese de basidiocarpos em placas, apesar das condições *in vitro* não representarem as mesmas situações *in vivo*. Entretanto, esses procedimentos são fundamentais para o entendimento da estimulação e diferenciação do micélio nos cultivos comerciais (Rainey, 1991).

Os estudos utilizando a bactéria *P. putida* como indutora de efeitos de crescimento no micélio, fundamentam-se no fato da espécie ser encontrada fortemente aderida ao micélio de *A. bisporus* (Masaphy et al., 1987, Miller et al., 1995) e de *P. ostreatus* (Cho et al., 2002) e de que várias espécies de *Pseudomonas* produzem exopolissacarídeos, os quais possivelmente promovem a adesão entre a bactéria e o micélio do fungo (Rainey, 1991 citado por Fett et al., 1995).

#### **4.6 Análise microbiológica de *A. blazei* desidratado**

O monitoramento microbiológico de basidiocarpos desidratados de *A. blazei* é importante, uma vez que foi detectada a presença de bactérias patogênicas na terra de cobertura. Considerando que os cogumelos são produzidos em contato com essa terra, é possível que os mesmos sejam contaminados durante o seu crescimento, sendo necessário verificar se o processo de lavagem e desidratação foi eficiente na eliminação ou diminuição da população microbiana em níveis aceitáveis pela legislação.

Na análise microbiológica do basidiocarpo desidratado, não foi encontrada *Salmonella*, porém, a presença de coliformes a 35°C teve índices elevados, maior que  $2,4 \times 10^3$  NMP/g. A adoção de critérios e padrões para avaliar a qualidade de cogumelos desidratados, no momento atual, é uma

necessidade, devido à utilização do produto na forma de chás, principalmente por pessoas debilitadas imunologicamente.

De acordo com a Resolução RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001 (ANVISA), os padrões estabelecidos para alimentos consumidos após adição de líquido com emprego de calor devem ser isentos de *Salmonella* em 25g do produto e apresentar valores máximos de coliformes totais em  $10^3$  UFC/g e de *Staphylococcus* coagulase positiva de  $10^2$  UFC/g.

Foi considerado, no presente trabalho, o mesmo parâmetro preconizado por essa resolução, uma vez que ainda não existem no Brasil padrões para controle de qualidade específico para *A. blazei* desidratado, sendo importante salientar que nenhum tratamento de sanificação foi utilizado nesse trabalho, mantendo os mesmos procedimentos normalmente efetuados pelos produtores. A análise de *Salmonella* encontra-se de acordo com a Resolução de 2001. Vale ressaltar que a análise microbiológica foi realizada apenas com três amostragens, uma vez que a produção desse cogumelo foi apenas para moldes experimentais, ou seja, em pequena escala. Como o produto possui em torno de 70%-80% de água, a realização de outras análises para confirmar os dados não foi possível, sendo necessárias novas investigações microbiológicas do basidiocarpo desidratado.

Rosa et al. (1999), trabalhando com *A. blazei* desidratado utilizando dois tratamentos térmicos (calor seco) e, paralelamente, o sanificante hipoclorito de sódio ( $5\text{mg L}^{-1}$ ), encontraram elevado nível de contaminação nas amostras não tratadas e desidratadas a  $62^\circ\text{C}$ , por 1-2 horas (até  $6,0 \times 10^4$  UFC/g). O tratamento a  $50^\circ\text{C}$  durante 12 horas apresentou acentuada redução ( $< 10$  UFC/g) e o tratamento químico dos cogumelos *in natura* ocasionou redução na contaminação final do produto desidratado com valores de  $1,7 \times 10^3$  UFC/g. Os testes para coliformes fecais apresentaram resultados negativos (Rosa et al., 1999), ao contrário do observado nessa investigação, a qual apresentou índices

médios de  $2,23 \times 10^2$  NMP/g para coliformes termotolerantes. Segundo Franco & Landgraf (1996), o grupo de coliformes termotolerantes fornece informações seguras sobre as condições sanitárias e eventual ocorrência de enteropatógenos. Embora não exista padrão para coliformes termotolerantes, durante o experimento foi detectada sua presença, fornecendo indícios de processamento inadequado ou recontaminação pós-processamento, podendo ser proveniente de matéria-prima, higiene pessoal precária, bem como desinfecção deficiente dos equipamentos e utensílios (Franco & Landgraf, 1996; Eira, 2003).

Também foi detectada a quantificação média de *Staphylococcus* sp com valores de  $2,4 \times 10^3$  UFC/g. Tais resultados reforçam a necessidade de otimização durante todo o processo, englobando manipulação *in natura*, tratamento e processo de secagem, buscando melhores condições higiênico-sanitárias do produto. De acordo com Silva et al. (1997), a contagem de *S. aureus* em alimentos serve como indicador no controle de qualidade higiênico-sanitária envolvida no pós-processamento ou das condições de sanificação das superfícies destinadas ao contato com o mesmo.

Johannessen et al. (2002) detectaram a presença de bactérias termotolerantes e *Staphylococcus* sp em “champignon”. A presença de bactérias termotolerantes indica falhas nas condições higiênico-sanitárias durante processamento e manipulação, aliadas ao fato do produto crescer em contato direto com o solo. O mesmo autor menciona a detecção de *Staphylococcus* coagulase negativa e pequena parcela de *Staphylococcus* coagulase positiva, tendo o teste para detecção de *Salmonella* revelado resultado negativo.

Nas análises efetuadas para contagem de bolores e leveduras, mesmo não sendo exigida pela RDC nº 12 de 02 de janeiro de 2001, do Ministério da Saúde, foram encontrados valores médios de  $8,1 \times 10^3$  UFC/g para esses microrganismos. Esses dados estão próximos dos encontrados por Celso (2002), citado por Eira (2003), com valores compreendidos entre  $< 1$  e  $20,0 \times 10^2$  UFC/g.

Apesar de não ser uma exigência pela legislação vigente, esses índices merecem atenção pelo fato de alguns fungos serem produtores de micotoxinas, e, se presente nos alimentos, podem vir a comprometer a qualidade do produto e a saúde do consumidor.

O processo de desidratação requer cuidados em função do binômio tempo x temperatura, dos níveis de contaminação inicial do cogumelo durante etapas de colheita, lavagem e corte, e das condições de higiene dos manipuladores e equipamentos (Eira, 2003). Durante a etapa de desidratação, a atividade de água ( $A_w$ ) dos alimentos é reduzida, diminuindo a proliferação de microrganismos. Nos cogumelos desidratados, a  $A_w$  permanece entre os limites de 0,85-0,60, mesmo coeficiente para alimentos como farinha, cereais, frutas secas, gelatinas etc. Segundo Eira (2003), das bactérias patogênicas de veiculação alimentar, somente o *Staphylococcus aureus* desenvolve abaixo do índice de 0,93 e sua multiplicação torna-se suprimida com  $A_w$  menor que 0,85.

#### **4.7 Composição centesimal de basidiocarpos de *A. blazei***

Na Tabela 9 são apresentados resultados parciais dos valores obtidos para os basidiocarpos de *A. blazei* em relação aos seus constituintes nutricionais. O teor de umidade apresentou valores próximos aos encontrados por Delú (2003), trabalhando com a mesma espécie de cogumelos. A percentagem de 8,7%-8,8% de umidade corresponde ao esperado e condizente com a literatura.

Braga et al. (1999) mencionam que algumas espécies de cogumelos comestíveis apresentam índices entre 8,6%-9,0% de umidade, e o valor médio para *A. blazei* desidratado permanece em torno de 7,5% de água. Este é um importante fator comercial, uma vez que o mesmo é normalmente comercializado na forma desidratada.

**TABELA 9** Valores médios da composição centesimal de basidiocarpos desidratados de *A. blazei* de dois fluxos.

<b>Análise centesimal de basidiocarpos de <i>A. blazei</i> desidratado</b>						
<b>Fluxos</b>	<b>Umidade</b>	<b>Proteína*</b>	<b>Lipídeos</b>	<b>Cinza</b>	<b>Fibra</b>	<b>ENN<sup>1</sup></b>
1	8,72	36,4	3,45	6,04	4,52	40,87
2	8,81	44,4	2,61	5,75	4,53	33,90

Dados expressos com base em matéria seca

\* % Proteína = % N X 6,25

<sup>1</sup> ENN = extrato não nitrogenado

Seu conteúdo protéico é relativamente alto, com índices de 1,5% a 6% de sua massa fresca, considerando as diferenças entre as espécies e natureza do substrato de cultivo (Braga et al., 1999). Os valores médios de proteína encontrados estão próximos aos valores apresentados por Mizuno (1995) e Delú (2003), com concentrações em torno de 40%.

Os resultados de concentração de açúcares redutores nos basidiocarpos de *A. blazei* desidratados referentes ao primeiro e segundo fluxo foram de 0,83% e 0,63% de matéria seca (MS). Índices semelhantes foram obtidos por Delú (2003) ao submeter os basidiocarpos a diferentes tratamentos químicos relacionados à conservação e inibição do escurecimento. O conteúdo de açúcares solúveis (glicose/sacarose) no primeiro fluxo apresentou índice de 0,40% de MS e o segundo fluxo de 0,31% de MS. A concentração de açúcares solúveis presentes em alimentos submetidos à desidratação por calor pode ocasionar o escurecimento dos tecidos devido à caramelização desses compostos, especificamente em relação ao *A. blazei*. Essa reação pode ocasionar alterações no produto final, recusa pelos consumidores e diminuição do valor econômico para o produtor (Delú, 2003). O mesmo autor menciona a falta de trabalhos

destacando a importância do conteúdo de açúcares redutores relacionados ao metabolismo celular e trabalhos semelhantes utilizando basidiocarpos desidratados dessa espécie.

O escurecimento nos alimentos pode ser devido ao processo enzimático ou não enzimático. De acordo com Cheftel & Cheftel (1976) e Fennema (1976), a ocorrência do escurecimento em frutas e vegetais ricos em compostos fenólicos é decorrente da atividade enzimática das polifenol oxidases (PPO). No escurecimento não enzimático ocorre a oxidação dos compostos presentes nos alimentos, reação também conhecida como reação de Maillard ou caramelização. A ocorrência desse escurecimento não enzimático pode ser acentuada durante os processos de cocção, pasteurização e desidratação (Cheftel & Cheftel, 1976).

As reações de escurecimento em cogumelos comestíveis geralmente são relacionadas as danificações físicas que ocorrem na superfície dos basidiocarpos, durante o processo de colheita, lavagem, processamento, senescência e também por proliferação de bactérias (Zhang & Flurkey, 1997).

De acordo com Vilas Boas (1999), a composição centesimal de um alimento corresponde à proporção dos grupos homogêneos (umidade, lipídeos, cinzas, fração glicídica, proteína e fibra bruta) de substâncias presentes em 100g do alimento analisado. Nesse contexto, sugere-se que sejam conduzidas novas determinações químicas a respeito do basidiocarpo de *A. blazei*, para determinar valores médios na composição desse cogumelo em função do substrato e manejo, visando uma padronização do produto a ser comercializado.

## 5 CONCLUSÕES

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

1. a contagem total das bactérias nas terras de cobertura permaneceu com índices em torno de  $10^6$  UFC/g e a desinfestação com formol apresentou maior redução no número total de microrganismos;
2. o número de bactérias gram-negativas durante 32 dias de amostragem após cobertura do substrato apresentou altos índices em relação à contagem total;
3. os tratamentos com formol ou vapor d'água não foram suficientes para a eliminação de bactérias indesejáveis, tais como *Salmonella*, *Shigella*, *Serratia*, *Enterobacter*, *Tatumella*, etc.;
4. a produtividade de *A. blazei* não apresentou diferenças significativas, em função da adição de *P. putida* na camada de cobertura;
5. o crescimento do micélio de *A. blazei* e de *A. bisporus* in vitro não apresentou diferenças significativas com *P. putida*, nos meios BDA e Malte, e não ocorreu formação de primórdios em placas de Petri.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA.  
**Resolução RDC nº 12 de 2 de janeiro de 2001 Decreto 3029 de 16/05/1999.**  
Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: out. 2004.
- ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. **Introductory mycology.** New York: John Wiley & Sons, 1996. 632 p.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS – AOAC.  
**Official methods of the Association of the Agricultural Chemists.** 5. ed.  
Washington, 1990. v. 2.
- BONONI, V. L.; CAPELARI, M.; MAZIERO, R.; TRUFEM, S. F. B. **Cultivo de cogumelos comestíveis.** 2. ed. São Paulo: Ícone, 1995. 206 p.
- BRAGA, G. C.; EIRA, A. F. Efeitos da camada de cobertura, da massa do substrato e do ambiente de cultivo, na produtividade de *Agaricus blazei* Murril. **Energia na Agricultura**, Botucatu, v. 14, n. 1, p. 39-51, 1999.
- BRAGA, G. C.; EIRA, A. F.; CELSO, P. G.; COLAUTO, N. B. **Manual do cultivo de *Agaricus blazei* Murr. “Cogumelo-do-sol”.** Botucatu: Fundação de Estudos e Pesquisas Agrícolas e Florestais, 1998. 44 p.
- BUDZIDIEWICZ, H. Secondary metabolites from fluorescent pseudomonads. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 104, n. 2, p. 209-228, 1993.
- CHEFTEL, J. C.; CHEFTEL, H. **Introducción a la bioquímica e tecnología de los alimentos.** Zaragoza: Acribia, 1976. 333 p.
- CHO, Y. S.; KIM, J. S.; CROWLEY, D. E.; CHO, B. G. Growth promotion of the edible fungus *Pleurotus ostreatus* by fluorescent pseudomonads. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 218, n. 2, p. 271-276, Jan. 2003.
- COLAUTO, N. B. Cultivo de cogumelos utilizando diferentes camadas de cobertura In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE COGUMELOS NA ALIMENTAÇÃO, SAÚDE, TECNOLOGIA E MEIO AMBIENTE NO BRASIL, 1., 2003, Brasília, Brasil. p. 77-78.

COLAUTO, N. B.; EIRA, A. F. Avaliação quantitativa da comunidade bacteriana na camada de cobertura de *Agaricus bisporus*. **Energia na Agricultura**, Botucatu, v. 13, n. 2, p. 15-26, 1998.

COUTINHO, L. N. **Taxonomia e controle de *Verticillium* em *Agaricus bisporus* (Lange) Singer**. 1994. 130 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

CURTO, S.; FAVELLI, F. Stimulative effect of certain micro-organisms (bacteria, yeasts, microalgae) upon fruit-body formation of *Agaricus bisporus* (Lange) Sing. **Mushroom Science**, Dublin, v. 7, n. 1, p. 67-74, 1972.

CZAPSKI, J.; SZUDYGA, K. Frozen Mushrooms quality as affected by strain, flush, treatment before freezing, and time of storage. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 65, n. 4, p. 722-725, May/June 2000.

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. R. G.; SILVA, R. **Cultivo de cogumelos comestíveis**. Lavras: FAEPE-UFLA, 2002. 50 p.

EDWARDS, R. L. Cultivation in Western Countries: Growing in Houses. In: \_\_\_\_\_. **The biology and cultivation of edible mushrooms**. New York: Academic Press, 1978. cap. 12, p. 300-336.

EGER, G. The “Halbschalentest”, a simple method for testing casing materials. **Mushroom Growers Association Bull**, v. 148, p. 159-168, 1962.

EIRA, A. F. **Cultivo do cogumelo medicinal *Agaricus blazei* (Murril) ss. Heinemann ou *Agaricus brasilienseis* (Wasser et al.)**. Viçosa: Aprenda Fácil, 2003. 398 p.

EIRA, A. F. Cultivo de cogumelos comestíveis e medicinais: situação atual e perspectivas para o Brasil. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE COGUMELOS NA ALIMENTAÇÃO, SAÚDE, TECNOLOGIA E MEIO AMBIENTE NO BRASIL, 1., 2003, Brasília, Brasil. p. 42-70.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. Brasília: EMBRAPA, 2000. 412 p.

FENNEMA, O. W. **Principles of food science**. Winconsin: Marcel Dekker, 1976. 792 p.

FERREIRA, D. F. SISVAR 4.3 – **Sistema de Análise Estatística**. Lavras: UFLA, 1999.

FETT, W. F.; WELLS, J. M.; CESCUTTI, P.; WIJEY, C. Identification of exopolysaccharides produced by fluorescent *Pseudomonads* associated with commercial mushroom (*Agaricus bisporus*) production. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, n. 2, p. 513-517, Feb. 1995.

FIDALGO, O.; GUIMARÃES, S. M. P. B. Situação do cogumelo comestível no Brasil e no exterior. In: ENCONRO NACIONAL SOBRE COGUMELOS COMESTÍVEIS, 1., 1985, Mogi das Cruzes. **Anais....** São Paulo: Instituto de Botânica, 1985. p 7-23.

FRANCO, B. D. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 1996. 182 p.

GREWAL, S. I. S.; RAINEY, P. B. Phenotypic variation of *Pseudomonas putida* and *P. tolaasii* affects the chemotactic response to *Agaricus bisporus* mycelial exudate. **Journal of General Microbiology**, Reading, v. 137, n. 12, p. 2761-2768, Dec. 1991.

HAYES, W. A. Interrelated studies of physical, chemical and biological factors in casing soils and relationships with productivity in comercial culture of *A. bisporus* Lange (Pilát). In: INTERNATIONAL SCIENTIFIC CONGRESS ON THE CULTIVATION OF EDIBLE FUNGI: MUSHROOM SCIENCE, 1981, Australia. **Proceeding...** Australia: Balkena, 1981. v. 11, p. 103-129.

HAYES, W. A. Nutrition, substrates and principles of diseases control. In: \_\_\_\_\_. **The biology and cultivation of edible mushrooms**. New York: Academic Press, 1978. cap. 9, p. 220-237.

HUME, D. P.; HAYES, W. A. The production of fruit-body primordia in *Agaricus bisporus* (Lange) Sing on agar media. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF MUSHROOM SCIENCE, 8., 1971, Lonon. **Proceedings...** London: Balkena, 1972. p. 527-532.

JOHANNESSEN, G. S.; LONCAREVIC, S.; KRUSE, H. Bacteroligical analysis of fresh produce in Norway. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 77, n. 3, p. 199-204, Aug. 2002.

KALBERER, P. P. Influence of the depth of the casing layer and the harvesting time on changes of the water content of the casing layer and the substrate caused by the first flush of mushrooms. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 21, n. 1, p. 9-18, 1983.

KALBERER, P. P. Influence of the depth of the casing layer on the water extracton from casing soil and substrate by the sporophores, on the yield and on the dry matter content of the fruit bodies of the first three flushes of the cultivated mushroom, *Agaricus bisporus*. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 27, n. 1/2, p. 33-43, 1985.

KAWAGISHI, H.; KANAO, T.; INAGAKI, R.; MIZUNO, T.; SHIMURA, K; ITO, H.; HAGIWARA, T.; NAKAMURA, T. Formolysis of a potent antitumor (1-6)- $\beta$ -D-glucan-protein complex from *Agaricus blazei* fruting bodies and antitumor activity of the resulting products. **Carbohydrates Polymers**, Oxford, v. 12, n. 4, p. 393-403, 1990.

KURTZMAN, R. H. *Agaricus bisporus* (Lge) Imb.casing layer II: porosity, the most important character. **International Journal of Mushroom Science**, New York, v. 1, n. 1, p. 11-17, 1995.

LABUSCHAGNE, P.; EICKER, A. Casing mediums for *Agaricus bisporus* cultivation in South Africa: a preliminary report. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF THE SCIENCE AND CULTIVATION OF EDIBLE FUNGI, 14, 1995, Balkema, Roterdã. **Proceedings...** Balkema, Roterdã, 1995. p. 339-344.

MASAPHY, S.; LEVANON, D.; TCHELET, R.; HENIS, Y. Scanning electron microscope studies of interactions between *Agaricus bisporus* (Lang) Sing hyphae and bacteria in casing soil. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 53, n. 5, p. 1132-1137, May 1987.

MILLER, N.; GILLESPIE, J. B.; DOYLE, O. P. E. The involvement of microbiological components of pet based casing materials in fructification of *Agaricus bisporus*. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF THE SCIENCE AND CULTIVATION OF EDIBLE FUNG, 14, 1995, Balkema, Roterdã. **Proceedings...** Balkema, Roterdã, 1995. p. 313-321.

MIZUNO, T. Kawariharatake, *Agaricus blazei* Murril: medicinal and dietary effects. **Food Reviews International**, New York, v. 11, n. 1, p. 167-172, 1995.

MIZUNO, T.; HAGIWARA, T.; NAKAMURA, T.; ITO, H.; SHIMURA, K.; SUMIYA, T.; ASAKURA, A. Antitumor activity and some properties of water-insoluble hetero-glycans from "Himematsutake," the fruting body of *Agaricus blazei* Murril. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokyo, v. 54, n. 11, p. 2889-2896, Nov. 1990a.

MIZUNO, T.; INAGAKI, R.; KANNO, T.; HAGIWARA, T.; NAKAMURA, T.; ITO, H.; SHIMURA, K.; SUMIYA, T.; ASAKURA, A. Antitumor activity and some properties of water-soluble polysaccharides from "Himematsutake," the fruting body of *Agaricus blazei* Murril. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokyo, v. 54, n. 11, p. 2897-2906, Nov. 1990b.

MOLENA, O. Dificuldades na produção e divulgação da cultura de cogumelos. In: ENCONTRO NACIONAL SOBRE COGUMELOS COMESTÍVEIS, 1., 1985, Mogi das Cruzes. **Anais...** São Paulo: Instituto de Botânica, 1985. p. 25-34.

PALLERONI, N. J. Genus I. *Pseudomonas*. In: KRIEG, N. R.; HOLT, J. G. (Ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore: The Williams & Wilkins, 1984. p. 141-199.

PARDO, A.; DE JUAN, J. A.; PARDO, J. E. Bacterial activity in different types of casing during mushroom cultivation *Agaricus bisporus* (Lange) Imbach. **Acta Alimentaria**, Budapest, v. 31, n. 4, p. 327-342, Dec. 2002.

PARK, Y. K.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S. M.; AGUIAR, C. L. Determinação da concentração de  $\beta$ -glucano em cogumelo *Agaricus blazei* Murril por método enzimático. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, n. 3, p. 312-316, set./dez. 2003.

PEIL, R. M.; ROSSETO, E. A.; PIEROBOM, C. R.; ROCHA, M. T. Desinfestação de composto para cultivo de cogumelo *Agaricus bisporus* (Lange) Imbach. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 2, n. 3, p. 159-164, set./dez. 1996.

RAYNEY, P. B. Effect of *Pseudomonas putida* on hyphal growth of *Agaricus bisporus*. **Mycological Research**, New York, v. 95 n. 6, p.699-704, June 1991.

RAYNEY, P. B.; COLE, A. L. J. Evidence for the involvement of plasmids in sporophore initiation and development in *Agaricus bisporus*. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF SCIENTIFIC AND TECHNICAL ASPECTS OF CULTIVATING EDIBLE FUNGI; DEVELOPMENT IN CROP SCIENCE, 10, 1986, Amsterdam. **Proceedings...** Amsterdam: University Park, 1987. p. 235-248.

RAYNER, P. B.; COLE, A. L. J.; FERMOR, T. R.; WOOD, D. A. A model system for examining involvement of bacteria in basidiome initiation of *Agaricus bisporus*. **Mycological Research**, New York, v. 94, n. 2, p. 191-195, Feb. 1990.

REDDY, M. S.; PATRICK, Z. A. Effect of bacteria associated with mushroom compost and casing materials on basidiomata formation in *Agaricus bisporus*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ottawa, v. 12, n. 3, p. 236-242, Sept. 1990.

RESHETNIKOV, S. P.; WASSER, S. P.; TAN, K. K. Higher basidiomycota as a source of antitumor and immunostimulating polysaccharides (Review). **International Journal of Medicinal Mushrooms**, New York, v. 3, p. 361-394, 2001.

ROMEIRO, R. S. **Métodos em bacteriologia de plantas**. Viçosa: Editora UFV, 2001. 279 p.

ROSA, D. D.; PETTINELLI NETO, A.; CELSO, P. G.; EIRA, A. F. Exame e controle bacteriológico em amostras do cogumelo *Agaricus blazei* com vistas ao seu uso nutricional. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 20., 1999, Salvador, BA. **Anais...** Salvador: CBM, 1999. p. 381.

SAPERS, G. M.; MILLER, R. L.; PILIZOTA, V.; KAMP, E. Shelf-life extension of fresh mushrooms (*Agaricus bisporus*) by application of hydrogen peroxide and browning inhibitors. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 66, n. 2, p. 362-366, Mar./Apr. 2001.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. **Manual de métodos de análises microbiológicas de alimentos**. São Paulo: Varela, 1997. 295 p.

SOLER-RIVAS C.; ARPIN N.; OLIVIER J. M.; WICHERS H. J. The effects of tolaasin, the toxin produced by *Pseudomonas tolaasii* on tyrosinase activities and the induction of browning in *Agaricus bisporus* fruiting bodies.

**Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 55, n. 1, p. 21-28, July 1999.

STEIDLE, A.; ALLESEN-HOLM, N.; RIEDEL, K.; BERG, G.; GIVSKOV, M.; MOLIN, S.; EBERL, L. Identification and characterization of an N-acylhomoserine lactone-dependent quorum-sensing system in *Pseudomonas putida* strain Iso F. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 12, p. 6371-6382, Dec. 2002.

TIMMIS, K. *Pseudomonas putida*: a cosmopolitan opportunist par excellence. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 4, n. 12, p. 779-781, Dec. 2002.

TREVORS, J. T. Sterilization and inhibition of microbial activity in soil. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 26, n. 1/2, p. 53-59, July 1996.

TRIPATHI, K. C.; UPADHYAY, J.; SINGH, R. K. Effect of different casing material on the growth and yield of button mushroom. **Progressive Horticulture**, Chaubattia, v. 23, n. 1/4, p.141-143, 1991.

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

VIJAY, B.; SAXENA, S.; SOHI, H. S. Studies on new casing media for *Agaricus bisporus* (Lange) Sing. **The Mushroom Journal**, Dublin, n. 178, p. 313-315, Oct. 1987.

VILAS BOAS, E. V. de B. **Avaliação nutricional dos alimentos**. Lavras: UFLA/FAEPE, 1999. 51 p.

WASSER, S. P.; DIDUKH, M. Y.; AMAZONAS, M. A. L. A.; NEVO, E.; STAMETS, P.; EIRA, A. F. Is a widely cultivated culinary-medicinal Royal sun *Agaricus* (The Himematsutake Mushroom) indeed *Agaricus blazei* Murril? **International Journal of Medicinal Mushrooms**, New York, v. 4, n. 4, p. 267-290, Oct./Dec. 2002.

WHITNEY, K. D.; ARNOTT, H. J. Calcium oxalate crystal morphology and development in *Agaricus bisporus*. **Mycologia**, Bronx, v. 79, n. 2, p. 180-187, Mar./Apr. 1987.

WHITTAKER, R. H. On the broad classification of organisms. **The Quarterly Review of Biology**, New York, v. 37, n. 1, p. 210-226, Jan./Mar. 1959.

WONG, C. K.; LEUNG, K. N.; FUNG, K. P.; CHOY, Y. M.  
Immunomodulatory and anti-tumor polysaccharides from medicinal plants.  
**Journal of International Medicinal Research**, Sussex, v. 22, n. 6, p. 299-312,  
Nov./Dec. 1994.

WOOD, D. A. ; FERMOR, T. R. Nutrition of *Agaricus bisporus*. In: \_\_\_\_\_ **The biology and technology of the cultivated mushrooms**. 1986. cap. 4, p. 43-62.

WUEST, P.; BEYER, D. M. Manufactured and recycled materials used as casing in (*Agaricus bisporus*) mushroom production. In: **Mushroom Biology and Mushroom Products**. 1996. p. 241-250.

ZHANG, X.; FLURKEY, W. Phenoloxidases in Portobella mushrooms. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 62, n. 1, p. 97-100, 1997.

## ANEXOS

<b>Anexo A</b>		<b>página</b>
<b>TABELA 1A</b>	Análise granulométrica e resultados analíticos de amostras de solos utilizados no cultivo de <i>A. blazei</i> .....	<b>60</b>
<b>TABELA 2A</b>	Quadrados médios da análise de variância para a contagem total de microrganismos para desinfestação e terras, em função do desdobramento da desinfestação em cada tipo de terra.....	<b>61</b>
<b>TABELA 3A</b>	Análise de variância para contagem total de bactérias presentes no Latossolo Amarelo distrófico (LAdi) tratado com vapor d'água durante período de 1 a 32 dias até início da frutificação de <i>A. blazei</i> .....	<b>61</b>
<b>TABELA 4A</b>	Análise de variância para contagem de bactérias gram-negativas presentes no Latossolo Amarelo distrófico (LAdi) tratado com vapor d'água, durante período de 1 a 32 dias, até início da frutificação de <i>A. blazei</i> .....	<b>61</b>

**TABELA 1A** Análise granulométrica e resultados analíticos\* de amostras de solos utilizados no cultivo de *A. blazei*

Análises	solos		
	Gleissolo Melâncio (GSm)	Latossolo amarelo distrófico (LAdi)	Latossolo vermelho distróférico(LVdf)
Areia (dag/kg)	-	15	16
Silte (dag/kg)	-	25	12
Argila (dag/kg)	-	60	72
pH (H <sub>2</sub> O)	5,1	5,7	6,1
P (mg/dm <sup>3</sup> )	40,1	0,9	0,1
K (mg/dm <sup>3</sup> )	17	41	8
Na (mg/dm <sup>3</sup> )	-	-	-
Ca <sup>2+</sup> (mg/dm <sup>3</sup> )	1,4	2,6	0,4
Mg <sup>2+</sup> (mg/dm <sup>3</sup> )	0,3	0,2	0,2
Al <sup>3+</sup> (mg/dm <sup>3</sup> )	1,3	0,1	0,0
H+Al (mg/dm <sup>3</sup> )	15,3	4,5	1,7
SB (cmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup> )	1,7	2,9	0,6
CTC(t)(cmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup> )	3,0	3,0	0,6
CTC(T)(cmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup> )	17,0	7,4	2,3
V (%)	10,2	39,2	26,7
m (%)	43	3	0
ISNa (%)	-	-	-
MO (dag/kg)	15,5	3,1	0,4
P-rem (mg/L)	1,5	7,2	0,7
Zn (mg/dm <sup>3</sup> )	-	-	-
Fe (mg/dm <sup>3</sup> )	-	-	-
Mn (mg/dm <sup>3</sup> )	-	-	-
Cu (mg/dm <sup>3</sup> )	-	-	-
B (mg/dm <sup>3</sup> )	-	-	-
S (mg/dm <sup>3</sup> )	-	-	-

\*Análises realizadas no Laboratório de Análise de Solo UFLA, MG

**TABELA 2A** Quadrados médios da análise de variância para a contagem total de microrganismos para desinfestação, terras e em função do desdobramento da desinfestação em cada tipo de terra.

FV	GL	QM
Desinfestação	3	219,185386*
Terras	2	10,611895*
Tratamentos*Terra	6	3,977757*
Erro	84	0,072835
CV%	6,01	

\* Significativo, a 5% de probabilidade, pelo teste Tukey. Dados transformados em  $\text{Log } 10(X)$ .

**TABELA 3A** Quadrado médio para análise de variância para contagem total de bactérias presentes no Latossolo Amarelo distrófico (LAdi) tratado com vapor d'água, durante período de 1 a 32 dias, até início da frutificação de *A. blazei*.

FV	GL	QM
Dia de coleta	5	1,291357*
Erro	42	0,105911
CV%	4,77	

\* Significativo, a 5% de probabilidade, pelo teste Tukey. Dados transformados em  $\text{Log } 10(X)$ .

**TABELA 4A** Análise de variância para contagem de bactérias gram-negativas presentes no Latossolo Amarelo distrófico (LAdi) tratado com vapor d'água, durante período de 1 a 32 dias, até início da frutificação de *A. blazei*.

FV	GL	QM
Dia de coleta	5	1,296251*
Erro	42	0,153510
CV%	6,28	

\* Significativo, a 5% de probabilidade, pelo teste Tukey. Dados transformados em  $\text{Log } 10(X)$ .