



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



**CONTAMINAÇÃO FÚNGICA NO CULTIVO DE *Pleurotus* spp. NUMA
PRODUÇÃO CONDUZIDA NO SISTEMA FAMILIAR**

FERNANDA DE OLIVEIRA ROSA

MONOGRAFIA DE CONCLUSÃO DE CURSO



Universidade Federal de Pelotas
Campus Universitário s/nº
Caixa-postal 354 CEP 96010-900
Pelotas – RS – Brasil

2007

FERNANDA DE OLIVEIRA ROSA

**CONTAMINAÇÃO FÚNGICA NO CULTIVO DE *Pleurotus* spp. NUMA
PRODUÇÃO CONDUZIDA NO SISTEMA FAMILIAR**

Monografia apresentada à Universidade Federal de Pelotas, sob a orientação do Prof. Dr. José Soares do Nascimento, como parte das exigências do Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas, Área de concentração em Meio Ambiente.

Comitê de Orientação:

Prof. Dr. José Soares do Nascimento

Comitê de Avaliação:

Prof. Dr. José Soares do Nascimento

Msc. Eduardo Bernardi

Msc. Lorena Pastorini Donini

Pelotas, 2007

Dedico

A mim, por achar que não iria conseguir fazer tudo ao mesmo tempo (monografia, relatórios, planos de aula, aulas propriamente ditas...) e ainda assim, ter conseguido.

AGRADECIMENTOS

À minha família, pela compreensão, pelas caronas até o Campus, por estarem presentes quando eu achei que seria difícil demais pra mim, por terem me perguntado várias vezes sobre o quê mesmo era minha monografia, por me fazerem explicar o cultivo de *Pleurotus* toda vez que respondia qual era o assunto... Muitíssimo obrigada!

Aos funcionários do Departamento de Microbiologia e Parasitologia, por me agüentarem perguntado onde era o lugar das coisas, que eu nunca lembrava e por limparem parte da sujeira.

À colega, e grande amiga, Elisandra Minotto, pelas conversas, por reclamar da monografia, cada uma da sua, pela ajuda durante todo o experimento, por ter me ajudado quando entrei no LEMICO, ter me explicado o que era semente de cogumelo (cogumelo tem semente??? longa história), enfim... por tudo.

Ao professor José Soares do Nascimento, meu orientador (não haveria um prefixo aqui?), amigo, Patrono da turma de Biólogos 2007/1, por ter me feito trabalhar feito uma “Camela” (a menor delas, uma vicuña) e assim, tornar possível aprender as coisas, além de corrigir essa monografia.

A Lorena Pastorini Donini, por aceitar participar da banca.

Ao Danielson e à Juliana, por permitirem minhas coletas na produção de *Pleurotus* spp. deles. Muito Obrigada!

E, por último, mas de propósito, ao Eduardo Bernardi. Pela idéia, pela ajuda nas coletas, no preparo do material, na identificação dos fungos, na organização dos dados, por corrigir a monografia antes do Nascimento, pelos incômodos no “MSN” (e não foram poucos!), por participar da banca, por ter-se revelado uma pessoa bem legal (e não o chato que eu achei que ele era) e por ter-se tornado um amigo. Muuuuuuuuuuuuuuuu Obrigada!

RESUMO

ROSA, Fernanda de Oliveira. **Contaminação fúngica no cultivo de *Pleurotus* spp. numa produção conduzida no sistema familiar.** 2007. 44f. Monografia de Conclusão de Curso (Bacharelado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Orientador: José Soares do Nascimento

O aparecimento de contaminantes durante o cultivo de cogumelos comestíveis tem sido freqüente, entretanto poucos são os relatos existentes e as pesquisas realizadas no Brasil, sobre esse aspecto no cultivo. Os principais problemas sanitários relacionados no cultivo têm sido causados pelos insetos, ácaros, vírus, bactérias e fungos. Estes podem atuar tanto como patógenos na cultura, e também como competidores e/ou antagonistas no substrato, interferindo no rendimento de cogumelos. Neste caso, podem depender do manejo e dos demais fatores relacionados ao cultivo. O objetivo deste trabalho foi identificar, quantificar e estabelecer as causas das contaminações fúngicas presentes no cultivo do cogumelo comestível *Pleurotus* spp., conduzido num sistema de produção familiar. As amostras experimentais foram coletadas numa pequena produção de cogumelos, localizada na cidade do Capão do Leão, RS e processadas no Laboratório Experimental de Micologia, no Instituto de Biologia da UFPel. Foram coletadas amostras da palha de arroz (*Oryza sativa* L.) hidratada, utilizada como substrato, bem como da água utilizada antes e após a pasteurização e do substrato colonizado pelo *Pleurotus* spp. Além dessas, foram coletadas amostras de fungos do ar no interior da sala de incubação, por exposição de placas de Petri contendo meio de cultura BDA e também coletas com “swab” estéril do substrato colonizado com *Pleurotus* spp. que apresentaram sinais de contaminação. As amostras foram diluídas em água peptonada, semeadas em meio BDA acidificado e incubadas a 25°C por três dias. A coleta em “swab” também foi semeada e todo o material foi incubado nas mesmas condições, para quantificação das unidades formadoras de colônias e a identificação dos espécimes. Os fungos identificados com maior freqüência foram *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma* e espécimes não identificadas, na forma de micélio. As populações de fungos foram bastante

variáveis, conforme o local analisado, sendo maiores na água antes da pasteurização e na palha hidratada. A pasteurização durante três horas a aproximadamente 100°C eliminou praticamente todos os contaminantes fúngicos. A presença de fungos contaminantes no composto colonizado foi devido à exposição do substrato ao ar contaminado, durante a inoculação e a incidência de fungos no ar da sala de incubação, sendo que estes, pouco interferiram na colonização do substrato pelo *Peurotus* spp. Durante o experimento houve uma incidência considerável do contaminante *Neurospora*, na segunda coleta, o qual afetou o rendimento de cogumelos, mas não persistiu na terceira coleta.

Palavras-chave: Contaminantes, fungo, cogumelos comestíveis, shimeji, *Trichoderma*, *Neurospora*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Espécies de <i>Pleurotus</i> cultivadas no Capão do Leão, RS.....	18
Figura 2: Pasteurizador utilizado no preparo do substrato para cultivo de <i>Pleurotus</i> spp.....	19
Figura 3: Inoculação de substrato com <i>Pleurotus</i> spp.....	19
Figura 4: Acondicionamento do substrato inoculado com <i>Pleurotus</i> spp. em sacos plásticos.....	20
Figura 5: Sala de incubação para o cultivo de <i>Pleurotus</i> spp.....	20
Figura 6: Coleta de amostras.....	23
Figura 7: Preparo da lâmina para identificação dos contaminantes.....	24
Figura 8: Frutificações de <i>Neurospora</i> nos sacos de cultivo de <i>Pleurotus</i> spp.	28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Tratamentos utilizados para coleta das amostras de materiais sujeitos à contaminações.....	22
Tabela 2: População de Contaminantes fúngicos no substrato e na água utilizados no cultivo de <i>Pleurotus</i> spp. Capão do Leão – RS, 2007.....	25
Tabela 3: Quantidade e Identificação de espécimes fúngicas no substrato e na água utilizados no cultivo de <i>Pleurotus</i> spp. Capão do Leão – RS, 2007.....	26
Tabela 4: Identificação e quantificação de fungos contaminantes no substrato colonizado pelo <i>Pleurotus</i> spp. Capão do Leão – RS, 2007.....	28
Tabela 5: Quantificação média e identificação de fungos do ar (anemófilos) na sala de cultivo de <i>Pleurotus</i> spp. Capão do Leão – RS, 2007.....	29

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	11
3 MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1 Sistema de cultivo	17
3.2 Preparo do material para coleta dos contaminantes	21
3.2.1 Meio de cultura.....	21
3.2.2 Água peptonada	21
3.2.3 Frascos para coleta.....	21
3.3 Coleta das amostras	22
3.4 Diluições.....	23
3.5 Distribuição das amostras	23
3.6 Identificação dos fungos.....	24
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
4.1 População fúngica da palha de arroz e da água	25
4.2 Avaliação de contaminantes fúngicos em substrato colonizado com <i>Pleurotus</i> spp., em fase de incubação	228
4.3 Fungos dispersos no ar (anemófilos) na sala de cultivo de <i>Pleurotus</i> spp.....	28
5 CONCLUSÕES	33
6 REFERÊNCIAS.....	34
APÊNDICES.....	38

1 INTRODUÇÃO

O consumo de cogumelos tem se tornado mais freqüente entre os brasileiros, seja pela descoberta do ótimo sabor que eles apresentam, ou por serem fontes de proteínas, podendo ser incorporados à dieta vegetariana, além de possuírem um valor calórico muito baixo. Ainda possuem, os cogumelos, determinadas propriedades terapêuticas, tais como ação antitumoral, antiinflamatória e antibiótica. A mídia também tem desempenhado um importante papel na divulgação popular, aumentando, desta forma, o interesse pela cultura do cogumelo.

O interesse pelo cultivo de cogumelos comestíveis do gênero *Pleurotus* spp., na região do Capão do Leão, RS, ainda é recente, como no resto do país. Antes, o comércio era mais freqüente em relação ao *champignon* de Paris (*Agaricus bisporus*). Este ainda é o cogumelo mais comercializado no mundo, mesmo que seu cultivo não seja tão fácil quanto o de *Pleurotus* spp., conhecido também como shimeji. A técnica de cultivo deste cogumelo é bastante viável, já que não possui maiores exigências para se desenvolver; exige baixo investimento financeiro inicial, cresce em vários tipos de substratos e, praticamente em todas as regiões de base agrícola há uma ampla disponibilidade de resíduos agroindustriais. Desta forma, o cogumelo se torna um ótimo aliado no reaproveitamento dessa matéria-prima, a qual seria desprezada no ambiente, causando grandes impactos ecológicos. Por ser grande produtora de arroz, a região Sul do Rio Grande do Sul possui grande disponibilidade desse tipo de palha, a qual pode ser usada como substrato, nesse caso.

O cultivo de cogumelos é uma atividade que pode ser conduzida com a mão-de-obra familiar, pois esse cultivo é facilitado pelas técnicas aplicadas, como as dos cultivos em substrato compostado, esterilizado (axênico) ou com a utilização de substrato apenas pasteurizado. No sistema de produção de baixa escala e com

tecnologia menos sofisticada, podem ocorrer algumas desordens durante o processo, dentre elas, uma de singular importância é o controle de pragas e doenças. No substrato esterilizado, o controle destas interferências deve ser mais intenso, pois o substrato contamina-se facilmente pela exposição. Mesmo que o substrato seja pasteurizado, na técnica menos sofisticada ainda existe chance de contaminações da produção nas diferentes etapas do cultivo, seja por insetos, ácaros, vírus, bactérias ou fungos, os quais são os mais comuns.

As contaminações por fungos são facilmente perceptíveis durante o cultivo de cogumelos, pois, ao iniciarem o crescimento, são evidenciadas pela distinção de cores ou aspectos que imprimem no substrato contaminado. Dentre as contaminações, as ocasionadas por fungos são mais frequentes no cultivo de cogumelos, sendo que alguns deles, como, por exemplo, os gêneros *Trichoderma* e *Verticillium*, são responsáveis por grandes perdas, diminuindo ou, ainda, causando perda total da produção, gerando um enorme prejuízo (NASCIMENTO; EIRA, 2003). Um substrato contaminado pode diminuir o rendimento da produção, causar deformações nos cogumelos, tornando-os menos atrativos para venda, além de causarem prejuízo para o produtor. Algumas medidas de controle podem ser tomadas, mas, ainda assim, as medidas preventivas, por exemplo, uma boa prática higiênica, têm sido apontada como a melhor solução.

Os fungos contaminantes mais comumente encontrados no cultivo de cogumelos são os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Trichoderma*, os chamados “mofos ou bolores” verdes. A contaminação pode ocorrer através dos grãos, da palha utilizada como substrato, de insetos ou ácaros que transportam os microrganismos até o composto, de uma pasteurização ineficiente, do aumento da temperatura do substrato, pois os esporos desses fungos estão no ar e são transportados com muita facilidade pelo vento. Esse tipo de contaminação, por fungos, por causar deformações, causa deflação na venda e também o tempo de permanência na prateleira, pois cogumelos danificados estragam mais facilmente.

O objetivo geral desse trabalho foi identificar os fungos contaminantes que se desenvolvem no cultivo de *Pleurotus* spp. preparado apenas com substrato orgânico pasteurizado, em sistema de baixa tecnologia, em nível de pequeno produtor.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A partir dos anos 70 o interesse pelo cultivo de cogumelos cresceu muito, pois havia necessidade de se desenvolver fontes não convencionais de alimentos e aproveitar, de forma mais adequada, recursos disponíveis. Além disso, o aumento no interesse mundial pelo que é “ecologicamente correto e seguro” e o avanço de uma cultura orgânica foram grandes incentivadores (ROYSE; VÁZQUEZ, 2001).

O cultivo de *Pleurotus* spp. é recente, mas apesar disso tem se desenvolvido muito rapidamente, sendo cultivado em quase todos os lugares do mundo. Por ser capaz de se desenvolver em vários tipos de substratos, permite observar de maneira direta o impacto positivo do cultivo de cogumelos no aproveitamento de resíduos agroindustriais. A variedade de substrato depende da disponibilidade de matéria-prima em cada região.

Um outro ponto positivo no cultivo desse cogumelo é que pode apresentar produtividade até três vezes maior que o gênero *Agaricus*, onde se inclui o cogumelo-do-sol e o champignon de Paris (COLAUTO et al. 1998), sendo este o principal fungo comestível produzido no mundo (ROYSE e VÁZQUEZ, 2001).

Segundo Labarère e Bois (2001), do ponto de vista alimentar, esse crescimento está relacionado com o excelente sabor que o gênero possui, a facilidade com que é cultivado, a ampla variação de temperatura que tolera, além de exigir um investimento inicial baixo para a implementação de sua produção em escala comercial.

O interesse por *Pleurotus* spp. estende-se, recentemente à área terapêutica, pois tem sido comprovada a existência de substâncias capazes de reduzir o colesterol, além de uma atividade antitumoral, antimicrobiana, antiinflamatória e antiviral (WISBECK, 2003). Segundo Mizuno e Zhuang (1995), polissacarídeos

extraídos de *Pleurotus sajor-caju* teriam apresentado atividade antitumoral contra o Sarcoma 180 em camundongos. Essas propriedades terapêuticas são vistas com mais frequência em *Lentinula edodes*, sendo este descrito por Ishikawa et al. (2001) como antibacteriano, com ação sobre *Bacillus subtilis*, e antimutagênico (PACCOLA et al., 2004), protegendo células eucarióticas, expostas à radiação ultravioleta. De acordo com Bonatti (2004), os cogumelos, possuem altas concentrações de proteínas, carboidratos, minerais (cálcio, fósforo e ferro) e vitaminas (tiamina, riboflavina e niacina), além de baixo teor calórico.

Até a década de 70 o consumo de *Pleurotus* dependia basicamente de espécies nativas coletadas diretamente em bosques. No início do século foi iniciada uma cultura rústica, à base de troncos de madeira colocados nas florestas. No final dos anos 50, foram feitas as primeiras experiências utilizando serragens como substrato de cultura, e nos anos 60 começou a ser utilizada palha na produção em massa desse tipo de cogumelo (BONONI et al., 1999).

As várias espécies de *Pleurotus* podem ser distinguidas pela cor do píleo, temperatura de frutificação, necessidades nutritivas e tempo de incubação (RAMOS et al., s/d).

A produção de inóculos segue recomendações técnicas semelhantes para vários tipos de cogumelos comestíveis: preparo do meio de cultura para isolamento; colheita de um cogumelo saudável; isolamento da matriz primária a partir do basidioma ou de esporos; cultivo e manutenção adequada da matriz primária em meios de cultura específicos e em condições de assepsia; preparo da matriz secundária (escolha e preparo de grãos para inoculação da matriz secundária); preparo do inóculo a partir da matriz secundária. Todas estas etapas devem ser realizadas em laboratório, devidamente equipado, para controle estrito das condições de esterilidade, pois contaminações por outros fungos, bactérias e insetos são muito frequentes (ROSA, 2007).

Para Quimio (2001), quando se cultiva cogumelos em pequena escala, não há necessidade de preparar o próprio inóculo. Geralmente é possível ter acesso a produtores comerciais, os quais devem ter estabelecimentos onde possam avaliar as características de produção de cada lote de semente.

Durante o cultivo de cogumelos, muitos contaminantes ou outros microrganismos podem se desenvolver. O aparecimento destes pode ser decorrente da qualidade dos materiais e equipamentos utilizados e do sistema e manejo de

cultivo utilizado pelo produtor. A maior fonte de contaminação para o micélio do fungo em crescimento é o grão ou substrato utilizado para preparar a semente, especialmente no que diz respeito à esterilização. Com os cuidados necessários, é possível reduzir a contaminação por fungos e bactérias em até 100%. O controle de qualidade consiste em eliminar todas as unidades visivelmente contaminadas (QUIMIO, 2001).

Segundo Velasco e Bella (2004), o local para cultivar o cogumelo deve ter quatro principais áreas: área de armazenamento do substrato, área de pasteurização, área de incubação e área de produção. Os acessos e a translocação entre estas áreas devem ser limitados ou controlados como forma de evitar a transferência de contaminantes.

A região de Pelotas - RS, é um pólo orizícola, sendo assim, a palha de arroz (*Oryza sativa* L.) é um material abundante, podendo ser usada ou reaproveitada como substrato para o cultivo de cogumelos (PEIL et al., 1996). Em estudo realizado por Zhang et al. (2002), os autores compararam a palha de arroz e a palha de trigo (*Triticum aestivum* L.) como substratos, sendo que a primeira rendeu quase 10% mais cogumelos que a segunda, sob as mesmas condições. Ainda, esse mesmo estudo concluiu que o uso do substrato moído, ao invés de apenas cortá-lo, aumenta a produção de cogumelos, talvez porque esse processo acabe rompendo a parede celular do substrato, fazendo com que os nutrientes se tornem mais acessíveis e acelerem a frutificação em até cinco dias.

Os substratos, antes de serem utilizados na produção de cogumelos, devem passar por tratamentos térmicos, ou seja, pasteurização ou esterilização, conforme o sistema de cultivo ou o tipo de material. Para Velasco e Bella (2004), a pasteurização é feita de acordo com vários critérios: 2 a 3 horas a 75°C, 5 a 8 horas a 70°C e uma hora a 93°C. A pasteurização é realizada para diminuir, ou eliminar, o crescimento de microrganismos indesejáveis no cultivo de cogumelos.

Peil et al. (1996) em trabalho realizado para desinfestação de composto, ao analisar três métodos diferentes, pasteurização, fumigação com brometo de metila e autoclavagem, concluíram que a pasteurização apresentou-se como o tratamento mais adequado, devido a maior produção de cogumelos/saco, maior número de fluxos obtidos e menor tendência à contaminação pelo fungo *Trichoderma* spp.

Para os substratos preparados pelo método tradicional, que envolve a compostagem e acondicionamento, a pasteurização propicia o desenvolvimento de

microbiota específica no substrato, promovendo seletividade para o subsequente crescimento micelial do cogumelo, remove a amônia volátil tóxica para o micélio e destrói ou limita o crescimento de pragas, como propágulos de fungos competidores e patógenos, nematóides, ácaros e insetos (PEIL et al., 1996).

Para Gea (2001), o substrato para o cultivo de *Pleurotus* spp. não apresenta, de forma natural, uma microbiota tão equilibrada como a do substrato usado para o champignon, tornando possível que vários microrganismos sejam competidores desse fungo, por espaço e nutrientes. O processo de cultivo está exposto a várias alterações, podendo ocasionar baixas no rendimento ou na qualidade do produto.

As alterações podem ser causadas por fatores bióticos e abióticos. Entre as causas bióticas estão os insetos, os ácaros, os fungos, as bactérias e os vírus. Entre os fatores abióticos estão a temperatura, a luz, a umidade relativa, a presença de produtos químicos tóxicos no substrato ou na atmosfera do local de cultivo (GEA, 2001).

Wayne (2000) cita o uso de peróxido de hidrogênio como um ótimo artifício contra os contaminantes, pois, em suficientes concentrações, pode matar bactérias, endósporos, leveduras e esporos de fungos. A vantagem é que, sobre o micélio de fungos já estabelecidos, como o micélio dos cogumelos comestíveis, não interfere em seu crescimento e frutificação, pois este produz altas concentrações de enzimas que degradam o peróxido.

Segundo Gea (2001) o uso de produtos químicos durante o ciclo de cultivo é limitado, pois o cogumelo é muito suscetível aos pesticidas e desinfetantes em geral, e também pelo risco de acúmulo desses materiais nos corpos frutíferos. Portanto, as medidas que melhor podem reduzir a contaminação são a limpeza e a desinfecção dos locais de cultivo vazios, eliminação de todas as possíveis fontes de contaminação, uma pasteurização adequada e um bom manejo.

De acordo com Royse e Vázquez (2001), os problemas de cultivo mais freqüentes são os danos causados pelos fungos mitospóricos *Trichoderma*, *Monilia* e *Penicillium*, na fase de produção do inóculo e incubação do substrato, e por *Coprinus* spp., durante a frutificação. Já para Peil et al. (1996), os contaminantes crescem através do composto, destruindo o micélio, ou competindo com o cogumelo e impedindo o seu crescimento em todo o composto. A presença de fungos

sapróbios no substrato vem sendo apontada como um dos principais fatores que afetam o cultivo.

Os insetos, ao infestarem o basidioma dos cogumelos causam grandes perdas para os produtores, principalmente no verão, sendo que os primórdios são muito sensíveis a vapores químicos, então o uso de pesticidas torna-se difícil (ROYSE, 2003). Velasco e Bella (2004) citam como uma das pragas mais comuns os mosquitos, que estão presentes desde o período de incubação se as condições de limpeza não são boas e os orifícios dos sacos muito grandes, ou, também, se alguma bolsa se rompe ou se o nó do barbante se desfaz. Outras pragas são os moluscos, que proliferam devido à umidade do meio, mas podem ser controlados por uma mistura de cal e sal, colocada nas principais entradas e orifícios da sala de cultivo. Ainda, os mofos também são grande problema, podendo se espalhar por todo o substrato, impedindo que o micélio do cogumelo cresça.

Além dos insetos, pestes como fungos e bactérias, são responsáveis por deformações nos cogumelos e pelo baixo rendimento. Os fungos anemófilos presentes no local de cultivo também se tornam um problema, pois vários gêneros podem ser transportados pelo ar, vindo a contaminar o substrato de cultivo (BERNARDI; NASCIMENTO, 2005).

De acordo com Stamets e Chilton apud Stamets e Chilton (1983) a forma como uma doença é introduzida, ou seja, o vetor, pode ser usado para traçar o caminho inverso do contaminante. Os vetores mais prováveis são o cultivador, o ar, o substrato a ser inoculado, o micélio que foi transferido e o material para inoculação, equipamentos etc. Diferentes contaminantes serão associados aos diferentes estágios do cultivo. Contaminantes da cultura com ágar quase sempre serão esporos aéreos; nos grãos, além de aéreos, podem vir do grão usado para preparar o inóculo. Nesse caso, os contaminantes são esporos de fungos mitospóricos, leveduras e bactérias. No composto, os maiores contribuintes para a contaminação são o material utilizado, o inóculo e os manipuladores durante as atividades realizadas.

Para Fletcher et al. (1986), durante o cultivo podem ocorrer dois tipos de contaminação por fungos. Esses fungos podem ser parasitas, sendo que sua maioria ataca o esporóforo e não o micélio do cogumelo (MUTHUMEENAKSHI; MILLS, 1995).

Geralmente quando mais cedo o ataque, maiores alterações ocorrerão no cogumelo, podendo haver perda completa da produtividade. Além dos parasitas, também ocorrem os fungos antagonistas, os quais se mantêm no cultivo, pois as condições físicas e químicas do composto são favoráveis para o seu desenvolvimento. Alguns mofos crescem junto com o micélio do cogumelo, competindo por nutrientes; outros são antagonistas e, uma vez estabelecidos, impedem o crescimento micelial (FLETCHER et al., 1986).

A identificação dos fungos contaminantes do cultivo de *Pleurotus* spp. é, portanto, de grande importância. Sabendo qual fungo está causando desordens durante o processo torna-se mais fácil desenvolver meios de prevenção, seja através de barreiras físicas, químicas ou biológicas, diminuindo as perdas por parte do produtor e controlando a ação danosa dos patógenos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Sistema de cultivo

No município do Capão do Leão, Rio Grande do Sul, um produtor do cogumelo *Pleurotus* spp. (*P. ostreatus*, *P. ostreatoroseus* e *P. sajor-caju*) cultiva estes cogumelos há um ano (Fig.1), favorecido pela disponibilidade de substratos, visto que nesta região, a cultura de arroz é muito comum, sendo a palha desta cultura utilizada como substrato para produção dos cogumelos.

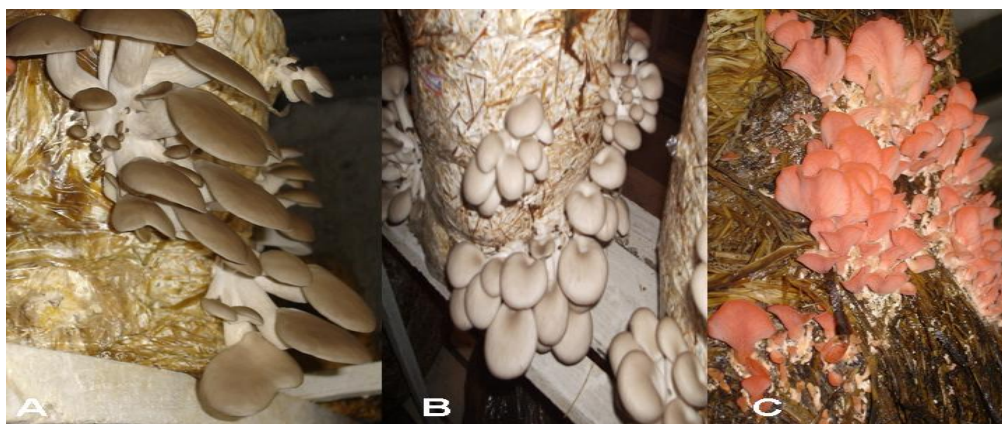


Figura 1: Espécies de *Pleurotus* cultivadas no Capão do Leão, RS: A= *P. sajor-caju*, B= *P. ostreatus* e C= *P. ostreatoroseus*.

As atividades relacionadas ao cultivo, colheita e comercialização foram realizadas pelo sistema de produção familiar, constituída pela atividade do casal.

A palha de arroz seca foi obtida, em fardos, junto a produtores após a colheita dos grãos. Para o preparo do material utilizado no cultivo, esse substrato foi previamente imerso em água por 24 horas, em caixas d'água de 500L. para rehidratação, sendo, posteriormente, pasteurizado a 80°C durante 4 horas. O

pasteurizador consiste numa caixa retangular de aço, com tampa, capacidade para 600L, sendo aquecida pela queima de madeira (Fig. 2).



Figura 2: Pasteurizador utilizado no preparo do substrato para cultivo de *Pleurotus* spp.

Após o resfriamento a aproximadamente 20 a 30°C, o substrato foi adicionado com 3% de inoculante e homogeneizado em uma bandeja de plástico (Fig. 3). Para desinfecção dos equipamentos e a antissepsia das mãos, durante a manipulação dos materiais, foi utilizado álcool 70%.



Figura 3: Inoculação de substrato com *Pleurotus* spp.: A= resfriamento a temperatura ambiente e B= inoculação

Após a inoculação, o material foi acondicionado em sacos de polipropileno transparente, com 8Kg e atados com barbante (Fig. 4A). Em seguida, foram feitos 8 a 10 furos laterais, nos sacos (Fig. 4B), para facilitar as trocas gasosas.



Figura 4: Acondicionamento do substrato inoculado com *Pleurotus* spp. em sacos plásticos: A= atados com barbante e B= perfurações laterais com material perfurante.

Os sacos foram dispostos lateralmente em prateleiras de madeira, em uma sala para colonização do substrato à temperatura de 20 a 28°C. Durante o inverno, quando a temperatura diminuiu, a sala foi aquecida para elevar o nível de temperatura. Após a completa colonização, os sacos foram levados para uma sala de frutificação contendo prateleiras, janelas laterais com tela e pedilúvio com cal hidratada na porta de entrada. Nesta sala, a temperatura variou entre 22 e 28°C, com luminosidade difusa durante o dia (300 LUX) e umidade relativa controlada entre 80 a 90% (Fig. 5).



Figura 5: Sala de incubação para o cultivo de *Pleurotus* spp.: A= termohigrômetro para controle de temperatura e B= sacos dispostos lateralmente nas prateleiras.

A colonização transcorreu, em média, de 15 a 20 dias da incubação. Em seguida, aos 25 a 30 dias de incubação, ocorreu a formação de primórdios em torno dos furos previamente feitos. Após o início da frutificação, foram feitos mais furos nos sacos onde ocorreu a formação dos primórdios, e os cogumelos foram coletados manualmente após 7 dias, ao atingirem a expansão das lamelas, o que levou de 3 a 5 dias.

A frutificação de cogumelos transcorreu em três a cinco fluxos, com intervalos entre os fluxos de aproximadamente 10 dias. Cada fluxo transcorreu por até 10 dias de frutificação. Os cogumelos foram embalados e destinados à comercialização.

3.2 Preparo do material para coleta dos contaminantes

O material para coleta foi preparado no Laboratório Experimental de Micologia (LEMICO), Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas.

3.2.1 Meio de cultura

O meio de cultura foi preparado previamente, utilizando-se 140g de batatas descascadas e cortadas em cubos, cozidas em 1L de água destilada, por aproximadamente 15 minutos. No decoto filtrado adicionou-se 10g de dextrose e 15g de ágar e o volume foi completado para 1L. Esse meio foi esterilizado em autoclave a 121°C por 20 minutos e, posteriormente, o pH corrigido para 3,5 mediante a adição de ácido tartárico a 10%, e vertido em placas de Petri estéreis.

Ainda foram utilizadas placas de Petri com meio de cultura não acidificado, obedecendo ao mesmo modo de preparo citado acima, exceto a adição de ácido tartárico, para as coletas de fungos presentes no ar da sala de cultivo.

3.2.2 Água peptonada

Para o preparo de 1L de água destilada peptonada, adicionou-se 0,1% de peptona de carne bacteriológica. Esse volume foi distribuído em tubos com 9mL, com o auxílio de pipetas. Além disso, foram preparados Erlenmeyers contendo 225mL de água peptonada, para homogeneização das amostras sólidas.

Todo material acima descrito, após preparado, foi esterilizado em autoclave, a 121°C por 20 minutos.

3.2.3 Frascos para coleta

Os frascos de vidro, usados para colocar as amostras coletadas, foram esterilizados a 121°C por 20 minutos, hermeticamente fechados e identificados de acordo com o tratamento (tab. 1). Além dos frascos foram preparados “swabs” estéreis para coleta nos sacos incubados com área indicando contaminações.

Tabela 1. Tratamentos utilizados para coleta das amostras de materiais e áreas sujeitas a contaminações

Tratamentos	Descrição
T1	Palha após a hidratação
T2	Palha pasteurizada
T3	Substrato colonizado
T4	Água usada antes da pasteurização palha
T5	Água quente após a pasteurização
T6	Fungos anemófilos
T7	Coleta do composto incubado com áreas contaminadas

3.3 Coleta das amostras

As amostras foram coletadas dos tratamentos com evidências de contaminações desenvolvidas, da palha de arroz hidratada, pasteurizada e da colonizada, e da água, antes e depois da pasteurização (Fig. 6A e 6B).

Para coleta dos contaminantes fúngicos presentes nos sacos de cultivo, foram usados swabs, previamente esterilizados, sendo um swab/contaminação. Após a coleta, estes foram armazenados em tubos de ensaio estéreis, devidamente identificados, fechados com papel alumínio e acondicionados em caixa de isopor. Os frascos de vidro usados para coleta da palha e da água, foram mantidos em caixas térmicas após a coleta do material.

Na coleta de fungos anemófilos, foram expostas placas com meio de cultura BDA sobre as prateleiras, em cinco diferentes pontos, dentro da sala de frutificação. Essas placas, em duplicatas, foram colocadas a uma altura de 1m do piso, permanecendo destampadas em exposição por 15 minutos, distribuídas entre as prateleiras (Fig. 6C).

Ao final, todas as amostras foram transportadas em uma caixa de isopor até o LEMICO, onde foram incubadas em estufa a 25°C por três dias para crescimento das colônias fúngicas e posterior quantificação e identificação.



Figura 6: Coleta de amostras: A= sacos com evidência de contaminação; B= coleta da palha já colonizada sem evidências de contaminação e C= disposição das placas para coleta de fungos anemófilos na sala de frutificação

3.4 Diluições

No Laboratório, uma alíquota de 25 gramas de cada uma dos tratamentos T1, T2 e T3 foi colocada em um Erlenmeyer contendo 225mL de água peptonada (0,1%), os quais foram agitados tornando a mistura homogênea. A seguir, foram feitas diluições seriadas (10^{-1} até 10^{-7}) em tubos contendo 9mL de água peptonada estéril. As amostras que continham somente água (T4 e T5) foram semeadas diretamente (10^0), além das diluições usadas para os outros tratamentos.

3.5 Distribuição das amostras

Após realizadas as diluições, as mesmas foram semeadas em meio de cultura BDA acidificado, sendo que para cada diluição foram feitas duas repetições, transferindo-se 0,1mL para cada placa de Petri, com o auxílio de uma pipeta estéril. Logo, com um bastão de vidro em “L” estéril, o inóculo foi espalhado no meio de cultura.

Para as coletas realizadas com swabs, estes foram semeados em BDA acidificado, em placas de Petri e incubadas em estufa, a 25°C por três dias para o crescimento das colônias, juntamente com as placas para coletas de anemófilos.

3.6 Identificação dos fungos

Para a contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFC) foi determinado a partir das diluições que resultaram em até 150 colônias por placa. A partir deste valor os resultados foram expressos em mais de 150, devido a dificuldade de enumeração.

A identificação dos fungos contaminantes foi feita em laboratório, através de um microscópio óptico, sendo utilizada a técnica de preparo da lâmina com fita adesiva (Fig. 7). As lâminas foram coradas com azul de Amann, sendo feita uma lâmina para cada colônia morfologicamente diferente, visualizada nas placas.

Os fungos foram identificados, em nível de gêneros, de acordo com Funder (1968), Ellis (1971), Barnett e Hunter (1972) e Singh et al. (1991).

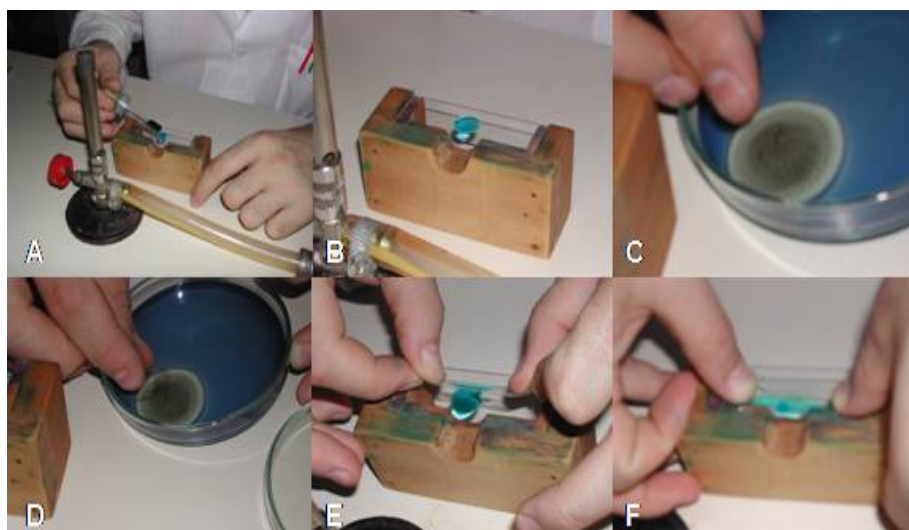


Figura 7: Preparo da lâmina para identificação dos contaminantes: A= Colocação de corante azul de Amann sobre a lâmina; B= Lâmina com uma gota do corante; C e D= Aderência da fita adesiva na colônia do fungo; E e F= Colocação da fita adesiva sobre a lâmina contendo o corante.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 População fúngica da palha de arroz e da água

A população de fungos determinada nos diferentes estágios, materiais e locais, bem como entre as três coletas avaliadas foram bastante variáveis (tab 2).

Tabela 2: População de contaminantes fúngicos no substrato e na água utilizados no cultivo de *Pleurotus* spp. Capão do Leão – RS, 2007

Tratamento	Coleta	Unidades Formadoras de Colônias*
		UFC/g de substrato
Palha após a hidratação	1	$4,1 \times 10^4$
	2	$5,6 \times 10^5$
	3	$5,0 \times 10^6$
Palha pasteurizada	1	$0,5 \times 10$
	2	$0,5 \times 10$
	3	0
Substrato colonizado	1	$1,28 \times 10^3$
	2	$4,95 \times 10^3$
	3	$7,1 \times 10^5$
		UFC/mL de água
Água antes da pasteurização	1	$6,5 \times 10^2$
	2	$9,4 \times 10^3$
	3	$4,1 \times 10^3$
Água quente após a pasteurização	1	$5,55 \times 10$
	2	$0,5 \times 10$
	3	0

* = Média entre duas placas

Os fungos mais freqüentes encontrados nas amostras foram *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma* e as formas não esporuladas (tab. 3). Na palha após a hidratação também foi encontrado *Trichoderma* nas três coletas. Este fungo é um dos mais importantes no cultivo de cogumelos, pois atua como contaminante e como

patógeno em alguns casos, a exemplo da espécie *T. harzianum*. No entanto, com a pasteurização, este gênero foi eliminado, conforme verificado na palha após a pasteurização. As demais espécies foram reduzidas drasticamente para populações insignificantes (tab.2).

Tabela 3: Quantidade e Identificação de espécimes fúngicas no substrato e na água utilizados no cultivo de *Pleurotus* spp. Capão do Leão – RS, 2007

Tratamento	Coleta	Espécime	Gênero
Palha após a hidratação	1	4	<i>Aspergillus, Penicillium, Trichoderma</i> , não esporulado*
	2	6	<i>Alternaria, Aspergillus, Fusarium, Rhizopus, Trichoderma</i> , não esporulado
	3	5	<i>Aspergillus, Cladosporium, Penicillium, Trichoderma</i> , não esporulado
Palha pasteurizada	1	1	<i>Aspergillus</i>
	2	1	<i>Penicillium</i>
	3	0	Ausência de crescimento
Substrato colonizado	1	2	<i>Penicillium, Trichoderma</i>
	2	2	<i>Aspergillus, Trichoderma</i>
	3	2	<i>Monilia, Trichoderma</i>
Água antes da pasteurização da palha	1	5	<i>Aspergillus, Fusarium, Penicillium, Trichoderma</i> , não esporulado
	2	5	<i>Alternaria, Aspergillus, Cladosporium, Fusarium</i> , não esporulado
	3	1	<i>Trichoderma</i>
Água quente após a pasteurização	1	3	<i>Aspergillus, Trichoderma</i> , não esporulado
	2	1	<i>Cladosporium</i>
	3	0	Ausência de crescimento

* Colônias formadas sem evidências de estruturas reprodutivas.

Na água usada após a hidratação da palha evidenciou-se uma elevada população de fungos contaminantes, sendo maiores na segunda e terceira coleta. Isso ocorreu pois o tanque de onde foi retirada a amostra de água, é o mesmo usado para deixar a palha de molho; sendo assim, havia resíduos dessa água usada para umedecer a palha no pasteurizador, o que provavelmente influenciou a elevada população fúngica encontrada nesse tratamento. Esta população de fungos representou o potencial de fungos existente nesse material, que poderia

comprometer a colonização do substrato pelo *Pleurotus* spp., caso houvesse falhas na pasteurização. No entanto, a pasteurização praticamente inativou todas as estruturas fúngicas, conforme as coletas analisadas (tab. 2). Na coleta 1 houve indícios de contaminantes não eliminados pela pasteurização, sem explicação aparente, pois a água estava aquecida a 80 - 100°C.

O Gênero *Trichoderma* foi notificado nas três vezes analisadas após a colonização do substrato. Além dele, verificou-se o aparecimento de *Monilia* na terceira coleta. O aparecimento destes dois gêneros possivelmente foi resultante da contaminação pelo ar, tanto durante a inoculação, quando o substrato estava exposto ao ar, como também pelos furos existentes no saco para as trocas gasosas. As contaminações foram maiores na terceira coleta. Na coleta anterior, houve uma incidência de *Neurospora* no cultivo, com indícios de frutificações deste fungo na maioria dos sacos incubados, através dos furos existentes nos mesmos (Fig.8).

Segundo Gea (2001), os chamados “fungos verdes”, *Trichoderma* spp. e *Penicillium* spp., se desenvolvem no substrato de cultivo de *Pleurotus* spp. durante a incubação. A diferença entre o gênero *Trichoderma* e os outros é que não depende somente dos nutrientes solúveis disponíveis, pois também são capazes de decompor a celulose presente no substrato. Isso, junto com sua capacidade de funcionar tanto como saprófitos ou parasitas, além de sua elevada taxa de crescimento, os torna os fungos mais problemáticos no cultivo de *Pleurotus* spp. De acordo com Gea (2001), esse fungo invade rapidamente o substrato e impede o crescimento do micélio do cogumelo, através da produção de toxinas e antibióticos, ao mesmo tempo em que diminui o pH até valores mais favoráveis para seu desenvolvimento. Os propágulos podem ser disseminados por correntes de ar, aerossóis, insetos, ácaros, ferramentas, roupas etc. Os processos de infecção podem ser afetados pela temperatura interna do substrato, já que se observa uma relação direta entre o desenvolvimento inicial de *Trichoderma* spp. e uma temperatura excessiva durante a incubação que debilita o micélio de *Pleurotus* spp. Conforme salienta Houdeau et al. (1991), o aparecimento de competidores está relacionado ao preparo do substrato, sendo que a temperatura deste durante a colonização é o fator principal, permitindo o crescimento de fungos como o *Trichoderma*, por exemplo. Os autores também se referiram aos gêneros *Alternaria*, *Cladosporium* e *Fusarium*, os quais foram identificados durante este trabalho, como não sendo antagonistas do gênero *Pleurotus*.



Figura 8: frutificações de *Neurospora* nos sacos de cultivo de *Pleurotus* spp.

4.2 Avaliação de contaminantes fúngicos em substrato colonizado com *Pleurotus* spp., em fase de incubação

Os sacos, mesmo colonizados pelo *Pleurotus* spp. apresentaram índices de contaminações. Alguns sacos apresentaram mais de um ponto indicando a contaminação visível. Os contaminantes mais frequentes foram *Trichoderma* presente nas três coletas e com maior índice de incidência, especialmente na primeira coleta (tab 4). Na segunda coleta, também foram evidenciadas colônias alaranjadas de *Neurospora*, entretanto, no total, todos diminuíram na terceira coleta. Conforme evidenciado por Peil et al. (1996) *Trichoderma* também contaminou o cultivo de *Agaricus bisporus* (Lange) Imbach, e inibiu o desenvolvimento do micélio desse cogumelo. Também foi citado por Royse (2003) como um dos fungos mais comuns no cultivo de cogumelos comestíveis.

Além do *Trichoderma*, outro fungo comum no cultivo de cogumelos é o *Verticillium*, descrito por Eicker (1995) e Gea et al. (1995) como o patógeno mais destruidor, responsável por grandes perdas econômicas. Não foram encontrados registros de ocorrência desse fungo durante a revisão bibliográfica para este trabalho, bem como esse fungo não foi identificado durante o experimento, sendo portanto, freqüente no cultivo de champignon.

Tabela 4: Identificação e quantificação de fungos contaminantes no substrato colonizado pelo *Pleurotus* spp. Capão do Leão – RS, 2007

Coletas	Total de focos de contaminações	Gêneros identificados	Número de colônias*
1	20	<i>Aspergillus</i>	3
		<i>Fusarium</i>	4
		<i>Geotrichum</i>	2
		<i>Paecilomyces</i>	3
		<i>Penicillium</i>	2
		<i>Trichoderma</i>	18
Total		32	
2	13	<i>Fusarium</i>	1
		<i>Neurospora</i>	2
		<i>Trichoderma</i>	8
		levedura	2
Total		13	
3	5	<i>Trichoderma</i>	5
Total			5

*Corresponde o número de vezes que o fungo identificado apareceu nas coletas

4.3 Fungos dispersos no ar (anemófilos) na sala de cultivo de *Pleurotus* spp.

Os fungos presentes no ar, coletados na sala de incubação, foram relativamente numerosos, pela condição do ambiente de umidade relativa elevada e presença de substratos orgânicos. Alguns destes contaminantes possivelmente cresceram no substrato ou simplesmente foram transportados pelo ar até o interior da sala de cultivo. De modo que, a presença deles, em concentrações elevadas, pode colonizar o substrato incubado com o micélio de cogumelo e comprometer o rendimento, a exemplo dos gêneros *Trichoderma*, *Neurospora* e *Papulospora*, que são potenciais competidores no cultivo de cogumelos. O gênero *Neurospora* foi um dos contaminantes mais severos que ocorreu na segunda coleta. O crescimento desse fungo foi rápido e cobriu toda a placa de meio de cultura, impossibilitando a identificação dos demais espécimes ali presentes (Fig. 8). Por outro lado, a

população maior de fungos contaminantes foi encontrada na terceira coleta, realizada em junho de 2007. De acordo com Ohmasa et al. (1995), o gênero *Trichoderma* é um dos mais importantes patógenos no cultivo de *Lentinula edodes*. No final de 1989, quase todos os produtores de composto e de cogumelos da Irlanda perderam a produtividade por causa desse fungo (MORRIS et al., 1995).

A contaminação por *Neurospora* fez com que o produtor desprezasse mais de 50% dos sacos incubados, pois a contaminação foi 100% em todos os orifícios dos sacos contaminados. Alguns sacos, mesmos contaminados com este competidor, mostraram sinais de produção de cogumelos, mas se torna inviável manter o saco contaminado na sala de cultivo, pois é uma forma de também propagar o contaminante para os próximos ciclos de cultivo. Porém, o produtor informou que retirou os contaminantes manualmente, possibilitando que o cogumelo *Pleurotus* spp. frutificasse normalmente, sem perder por completo a produção de cogumelos.

Tabela 5: Quantificação média e identificação de fungos do ar (anemófilos) na sala de cultivo de *Pleurotus* spp. Capão do Leão – RS, 2007

Coletas (T6)	Pontos	UFC/ 15 minutos de exposição*	Gêneros identificados
1	1	53	<i>Aspergillus, Fusarium,</i>
	2	64	<i>Penicillium, Trichoderma,</i>
	3	48	<i>Cladosporium, Curvularia,</i>
	4	60	<i>Paecilomyces, Drechslera,</i>
	5	46	<i>Geotrichum, Neurospora, não esporulado</i>
Média		54	
2	1	31	<i>Neurospora</i> sobre outros espécimes impossibilitando a identificação
	2	34	
	3	18	
	4	29	
	5	27	
Média		29	
3	1	+150**	<i>Alternaria, Cladosporium, Paecilomyces, Penicillium, Trichoderma, Geotrichum, Fusarium, Papulospora, não esporulado</i>
	2	113	
	3	130	
	4	73	
	5	60	
Média		94	

* Média entre duas placas, **Acima de 150 colônias não foi considerada para efeito de média.

Ainda, foi encontrado, mas com uma freqüência menor que *Trichoderma*, o gênero *Penicillium*, que, de acordo com Gea (2001), também é um fungo competidor, mas, ao contrário do primeiro, compete por nutrientes, podendo infectar o substrato durante a inoculação. Seu desenvolvimento é favorecido por meio de tratamentos térmicos ineficazes, e pela falta de higiene nas áreas de preparo, inoculação e incubação dos substratos. Os esporos desse fungo tendem a permanecer muito tempo no ambiente, existindo um risco de contaminação implícito, podendo haver recontaminação do grão após esterilização, sendo um dos primeiros contaminantes de grãos de cereais. Isso leva a pensar que a fonte de contaminação foi o grão usado no preparo do inóculo (GEA et al., 1995), no entanto este fungo foi detectado em todas as coletas realizadas no interior da sala de incubação.

Lobo et al. (2006), em estudo realizado para identificação de patógenos de sementes de arroz (*Oryza sativa* L.), encontraram os gêneros *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Drechslera*, *Fusarium*, *Penicillium* e *Rhizopus*, como causadores da doença chamada mancha-do-grão. Esses fungos foram encontrados no presente trabalho, aparecendo em todos os tratamentos (tab. 5). Por serem esses mesmos fungos os causadores de doenças no arroz, e nesse tipo de cultivo de *Pleurotus* spp., o substrato utilizado foi a palha do cereal, a origem da contaminação pode estar associada à palha. Porém a pasteurização mostrou-se eficiente, já que comparando os tratamentos 1 e 2 (antes e depois da pasteurização), nota-se diminuição na contagem de colônias que cresceram nas placas de Petri. Esses mesmos fungos, com exceção do gênero *Drechslera*, foram encontrados por Franco et al. (2001), durante a identificação de fungos associados à semente de arroz.

Técnicas para detectar a presença de fungos anemófilos incluem a exposição de placas de Petri, por determinado tempo, no ambiente. Segundo Mezzari et al. (2002) e Bernardi e Nascimento (2005) estudos feitos sobre esses fungos, no Brasil, mostram maior incidência dos gêneros *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Penicillium*, *Rhizopus* e *Trichoderma*. Tais fungos foram encontrados durante o experimento, com exceção de *Rhizopus*, o qual foi encontrado somente na palha após a hidratação (T1).

Nas amostragens do ar na sala de cultivo, o gênero identificado com mais freqüência foi *Penicillium*, seguido por *Paecilomyces*. Tal prevalência também foi citada por ÇOLAKOGLU (2004), tanto no interior quanto no exterior de ambientes.

Rupollo et al. (2005) citam *Neurospora* como um dos contaminantes de grãos de aveia, quando a umidade for inferior a 15%. Por outro lado, Diniz (1999), atribui ao gênero *Neurospora* como sendo um dos contaminantes mais comuns no cultivo de *Psilocybe* spp., juntamente com *Aspergillus* e *Penicillium*. Logo, não foram encontrados trabalhos relatando sobre a incidência de *Neurospora* no cultivo de *Pleurotus* spp., muito embora, durante as coletas realizadas neste trabalho, esse fungo foi um dos mais observados contaminando o substrato e no ar da sala de incubação.

Segundo Rashmi et al. (2003) o nome desse fungo é devido ao fato de seus ascósporos terem a forma parecida com um neurônio. Este gênero foi facilmente reconhecido nos sacos de cultivo por sua coloração, pois, devido aos carotenóides, apresenta uma cor alaranjada ou avermelhada, e ainda pela produção massiva de conídios.

5 CONCLUSÕES

- Os principais gêneros de fungos contaminantes no cultivo de *Pleurotus* spp. são *Aspergillus*, *Penicillium* e *Trichoderma*.
- A intensa contaminação por *Neurospora*, não impede a frutificação do *Pleurotus* spp. após a eliminação do contaminante.
- A maior parte das contaminações ocorre através do ar contaminado na sala de inoculação e incubação e da palha de arroz se não for devidamente pasteurizada.
- A pasteurização do substrato a 80-100°C é suficiente para eliminar praticamente todos os fungos contaminantes contidos no substrato que possam interferir no cultivo de *Pleurotus* spp. por este sistema.

6 REFERÊNCIAS

- BARNETT, H.L.; HUNTER, B.B. **Illustrated genera of imperfect fungi**. Minnesota: Burgess Publishing Company, 1972. 241p.
- BERNARDI, E.; NASCIMENTO, J.S. Fungos anemófilos na Praia do Laranjal, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil. **Arquivos Instituto Biológico**, v.72, n.1, p.93-97, 2005.
- BONATTI, M.; KARNOPP, P.; SOARES, H.M.; FURLAN, S.A. Evaluation of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus sajor-caju* nutritional characteristics when cultivated in different lignocellulosic wastes. **Food Chemistry**, n. 88, p.425-428, 2004.
- BONONI, V. L.; CAPELARI, M.; MAZIERO, R.; TRUFEM, S. F. B. **Cultivo de cogumelos comestíveis**. S.l.: Ícone, 1999.
- COLAUTO, N.B.; EIRA, A.F.; MINHONI, M.T.A. Fatores físicos que afetam a produtividade do cogumelo comestível *Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Singer. **Científica**, São Paulo, v.26, p.25-43, 1998.
- ÇOLAKOGLU, G. Indoor and outdoor mycoflora in the different districts of the city of Istanbul (Turkey). **Indoor Built Environ**, p.13-91, 2004.
- DINIZ, O.G.P. **Usos, bioquímica e atividade biológica do *Psilocybe* spp**, 1999. 68p. Monografia (Especialização em Fitoterapia) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- EICKER, A. The South African experience in growing *Pleurotus* spp. In.: ELLIOT, T.J. **XIV Science and Cultivation of Edible Fungi**. v.2, p.869-876. 1995.
- ELLIS, M.B. **Dematiaceous hyphomycetes**. Kew: Commonwealth Mycological Institute, 1971, 608p.
- FLETCHER, J.T.; WHITE, P.F.; GAZE, R.H. **Mushrooms- pest and disease control**. Inglaterra: Intercept, 1986, 156p.
- FRANCO, D.F.; RIBEIRO, A.S.; NUNES, C.D.; FERREIRA, E. Fungos associados a sementes de arroz irrigado no Rio Grande do Sul. Embrapa Clima Temperado. Pelotas, RS. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.7, n.3, p.235-236, 2001.

FUNDER, S. **Practical mycology: Manual for identification of fungi**. New York: Hafner, 1968. 146p.

GEA, F.J. Plagas y enfermedades del género *Pleurotus* spp. In. SÁNCHEZ, J. E.; ROYSE, D. **La Biología y el cultivo de *Pleurotus* spp.** México:UTEHA, p.205-224, 2001.

GEA, F.J.; PARDO, A.; NAVARRO, M.J.; PARDO, J. Fungal diseases of mushroom culture from Castilla – La Mancha (Spain): Incidence of *Verticillium fungicola*. In. ELLIOT, T.J. **XIV Science and Cultivation of Edible Fungi**. v.2, p.643-651, 1995.

_____ Mycoflora related to the mushroom spawn. In.: ELLIOT, T.J. **XIV Science and Cultivation of Edible Fungi**, v. 2, p.557-562. 1995.

HOUDEAU, G.; OLIVIER, J.M.; LIBMOND, S. e BAWADIKJI, H. Improvement of *Pleurotus* cultivation. In. MAHER, M.J. **XIII Science and Cultivation of Edible Fungi**. 1991, v.2. p.549-554.

ISHIKAWA, N.K.; KASUYA, M.C.M.; VANETTI, M.C.D. Antibacterial activity of *Lentinula edodes* grown in liquid medium. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.32, p.206-210. 2001.

LABARÈRE, J.; BOIS, F. La conservación y el uso de los recursos genéticos de *Pleurotus* spp. In. SÁNCHEZ, J. E.; ROYSE, D. **La Biología y el Cultivo de *Pleurotus* spp.** México: UTEHA, p.85-123. 2001.

LOBO, V.L.S.; FILIPPI, M.C.; UTUMI, M.M.; MORAIS, O.P.; CASTRO, E.M.; BRITO, A.M. **Perfil Sanitário e Fisiológico de Sementes de Arroz Provenientes de Ensaio de Valor de Cultivo e Uso, em Três Locais**. Embrapa Arroz e Feijão. Goiás, GO. 2006. 40p.

MEZZARI, A.; PERIN, C.; SANTOS JUNIOR, S. A.; BERND, L. A. G. Airborne fungi in the city of Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. **Revista do Instituto Médico Tropical**, v.44, n.5, p.269-272, 2002.

MIZUNO, T.; ZHUANG, C. Houbitake, *Pleurotus sajor-caju*: antitumor activity and utilization. **Food Review International**, v.11, n.1, p.185-187, 1995.

MORRIS, E.; DOYLE, O.; CLANCY, K.J. A profile of *Trichoderma* spp. Species I – Mushroom compost production. In.: ELLIOT, T.J. **XIV Science and Cultivation of Edible Fungi**, v.2, p.611-618, 1995.

MUTHUMEENAKSHI, S.; MILLS, P.R. Detection and differentiation of fungal pathogens of *Agaricus bisporus*. In.: ELLIOT, T.J. **XIV Science and Cultivation of Edible Fungi**, 1995, v.2, p.603-610.

NASCIMENTO, J.S.; EIRA, A.F. Doenças e competidores do *A. blazei*. In: EIRA, A. F. **Cultivo do cogumelo medicinal *Agaricus blazei***. Viçosa: Aprenda Fácil, 2003, p.221-256.

OHMASA, M.; TSUNDA, M.; HIRAIDE, M.A. A method to assay varietal difference of disease resistance of *Lentinula edodes* against *Trichoderma* spp. In.: ELLIOT, T.J. **XIV Science and Cultivation of Edible Fungi**. v.2, p.579-586. 1995.

PACCOLA, E.A.S.; BOMFETI, C.A.; FÁVARO, L.C.L.; FONSECA, I.C.B.; MEIRELLES, L.D.P. Antimutagenic action of *Lentinula edodes* and *Agaricus blazei* on *Aspergillus nidulans* conidia. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.35, p.311-315. 2004.

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 Agrociências**, v.2, n.3, p.159-164, 1996.

QUIMIO, T.H. Preparación de la semilla. In SÁNCHEZ, J. E.; ROYSE, D. **La Biología y el Cultivo de *Pleurotus* spp.** Mexico. UTEHA. p.141-156, 2001.

RAMOS, A.C.; SAPATA, M.M.; CANDEIAS, M.; FIGUEIREDO, E.; GOMES, M.L. **Cultura de Cogumelos do Género *Pleurotus***. INIAP, Estação Agronômica Nacional, Dep. Tecnologia Produtos Agrários. Oeiras/Portugal, s/d, 6 p.

RASHMI, K.; LATHA, J.N.L.; KIRANMAYI, P.; RAO, M.V.; MENON, C.P.S.; MOHAN, P.M. *Neurospora* in full bloom. **Current Science**, v.85, n.12, 2003, 3p.

ROSA, L.H. **Produção de Sementes de Cogumelos Comestíveis e Medicinais**. Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais (CETEC). 2007. Minas Gerais, Brasil. 14p.

ROYSE, D.J. **Cultivation of Oyster Mushroom**. College of Agriculture Sciences – Agricultural Research and Cooperative Extension. The Pennsylvania States University, 2003.

ROYSE, D.; VÁZQUEZ, J.E.S. La importancia del cultivo de *Pleurotus* spp.- Estadísticas mundiales de producción, con énfasis en Hispanoamérica. In: SÁNCHEZ, J. E.; ROYSE, D. **La Biología y el Cultivo de *Pleurotus* spp.** México: UTEHA, 2001, p.19-26.

RUPOLLO, G.; GUTKOSKI, L.C.; MARTINS, I.R.; ELIAS, M.C. Efeito da umidade e do período de armazenamento hermético na contaminação natural por fungos e a produção de micotoxinas em grãos de aveia. **Ciências Agrotécnicas**, v.30, n.1, p.118-25, 2006.

SINGH, K.; FRISVAD, J.C.; THRANE, U.; MATHUR, S.B. **An illustrated manual on identification of some seed-borne *Aspergilli*, *Fusaria*, *Penicillia* and their mycotoxins**. Hellerup: Danish Government Institute of Seed Pathology and Department of Biotechnology, 1991, 133p.

STAMETS, P.; CHILTON, J.S. The contaminants of mushroom culture. In.: STAMETS, P.; CHILTON, J.S. **The mushroom cultivator – A practical guide to growing mushrooms at home**. Olympia, Washington. Agarikon Press. 1983. p.233-317.

VÀZQUEZ, J. E. S.; ROYSE, D. **La Biología y el Cultivo de *Pleurotus* spp.** México: UTEHA. 2001. 290p.

VELLASCO, J.V.; BELLA, E.V. **Cultivo del hongo seta (*Pleurotus ostreatus*).** 2004, 24p.

WAYNE, R.R. **Cultivando hongos de manera fácil – Cultivo de hongos em el hogar com peróxido de hidrógeno.** v.1, 2000. 24p.

WISBECK, E. **Estudo do Cultivo Submerso de *Pleurotus ostreatus* DSM 1833 para a Produção de Biomassa e de Exopolissacarídeos.** 2003. 175f. Tese (Doutorado em Engenharia Química)-Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

ZHANG, R.; LI, X.; FADEL, J.G. Oyster mushroom cultivation with rice and wheat straw. Elsevier Science Ltda. **Bioresource Technology**, n. 82. p.277-284, 2002.

APÊNDICES

Apêndice A

Sistemática dos fungos encontrados

Os fungos foram organizados segundo sistemática encontrada em Stamets e Chilton (in Stamets e Chilton, 1983).

Classe: Fubgos Imperfeitos

Ordem: Moniliales

Família: Dematiaceae

Gênero: *Alternaria*

Muito comum na natureza, é encontrado durante a produção do inoculo e está presente, em grande quantidade, na poeira doméstica. É um dos fungos saprófitas mais presentes nos grãos de centeio, nos grãos em geral, em palhas, folhas, raízes de frutas e manteiga sem sal. Em zonas de clima temperado, prevalece no final do verão e durante o outono. Sua disseminação ocorre através do ar. Bons hábitos de higiene, manutenção de um nível baixo de poeira e uso de micro-filtros são alguns meios de controlar esse fungo.

Classe: Fungos Imperfeitos

Ordem: Moniliales

Família: Eurotiaceae

Gênero: *Aspergillus*

Muito comum em ágar e grãos e durante o preparo do composto. Encontrado na maioria dos compostos orgânicos, *Aspergillus* prefere um pH próximo do neutro. Bandejas de madeira e prateleiras contendo o composto são habitats desse contaminante na casa de frutificação. Os esporos são disseminados pelo ar. Boa higiene, remoção do suporte do substrato, especialmente resíduos de alimento e do composto consumido, além de filtrar o ar são formas de evitá-lo.

Classe: Ascomycete

Ordem: Sphaeriales

Família: Chaetomiaceae

Gênero: *Chaetomium*

Comum no adubo fresco, especialmente nos compostos pasteurizados anaerobicamente, materiais que sobraram, palha, solo, restos de palha, produtos de papel e na fabricação de roupas. É um raro contaminante de grãos e frequentemente é encontrado na cultura com ágar. É disseminado pelo ar, solo, composto e pelo grão. Pode ser controlado através de práticas higiênicas comuns, pasteurização aeróbia e uma sala de preparo adequada.

Classe: Fungos Imperfeitos

Ordem: Moniliales

Família: Dematiaceae

Gênero: *Cladosporium*

É o gênero predominante dentre os comtaminantes anemófilos. As espécies podem ser tanto saprófitas quanto parasitas. Pelo menos três espécies infectam o inoculo. A maioria das espécies cresce no meio ágar-malte. Muitos decompõem produtos de papel, restos de plantas e vegetais no geral. Os meios de controle são boas práticas de higiene, remoção do suporte do substrato e filtragem do ar através de micro-filtros.

Classe: Basidiomycetes

Ordem: Agaricales

Família: Coprinaceae

Gênero: *Coprinus*

Comum no composto e/ou na decomposição da palha. Primeiramente é disseminado pelo ar; posteriormente, através dos materiais usados na preparação do composto. Os meios de controle incluem atenção à compostagem e a higiene na casa de frutificação, pasteurização, redução da amônia e da água no composto final; e homogeneidade consistente da estrutura do composto (evitar a compactação das zonas).

Classe: Fungos Imperfeitos

Ordem: Moniliales

Família: Tuberculariaceae

Gênero: *Fusarium*

Comumente encontrado na produção do inóculo e na cultura com ágar. Um habitante natural dos grãos, *Fusaria* também são encontrados no solo, plantas vivas ou apodrecidas e decompondo papel e tecidos. É disseminado pelo ar, pelo grão e pelo solo. As formas de controle são a esterilização suficiente do grão e o isolamento e distribuição apropriada das culturas contaminadas. Práticas básicas de higiene e filtragem do ar previnem esse contaminante. Aumentar a ventilação enquanto, simultaneamente, se diminui a umidade, impedem a proliferação desse contaminante potencialmente perigoso.

Classe: Fungos Imperfeitos

Ordem: Moniliales

Família: Moniliaceae

Gênero: *Geotrichum*

Geralmente saprófita, mas algumas formas atuam como parasitas. Muito comum na natureza, raramente encontrado no composto para cogumelos, a não ser que este tenha sido preparado diretamente no solo. *Geotrichum* habita o solo, esterco, palha velha, pilhas do composto e decompõe algumas frutas e vegetais. No geral, espécies desse gênero são termófilas, sensíveis à temperatura de pasteurização. É disseminado pelo ar, solo, palha velha e composto já consumido. Medidas de controle incluem compostagem numa superfície concreta, pasteurização do composto e da palha, e uso de materiais de cobertura limpos.

Classe: Fungos Imperfeitos

Ordem: Moniliales

Família: Moniliaceae

Gênero: *Monilia*

Relativamente comum em ágar, grãos, composto e na cobertura do solo. Disseminado pelo ar, solo e grãos. Medidas de controle incluem filtragem do ar, manutenção de boa higiene no laboratório e na sala de crescimento, especialmente

isolamento e remoção das culturas contaminadas e dos restos da colheita. Esterilização do grão e pasteurização da cultura reduzem a possibilidade de contaminação. Acredita-se que esse contaminante seja introduzido por esporos aéreos. Filtros de alta eficiência previnem o esporo de *Monilia* de contaminar o inóculo e diminuem o risco de contaminação na sala de crescimento.

Monilia é a forma imperfeita, enquanto a forma perfeita é a *Neurospora*. Se não for tratado, esse contaminante pode ser muito difícil de erradicar. A limpeza completa do laboratório é a única forma.

Classe: Ascomycetes

Ordem: Xylariales

Família: Sordariaceae

Gênero: *Neurospora*

Encontrada no ágar e em grãos. *Neurospora* tem um crescimento rápido, algumas vezes levando apenas 24 horas para colonizar totalmente metade de uma placa de Petri. É ubíquo na natureza, ocorrendo no esterco, no solo e em plantas com problemas. Disseminada pelo ar, solo, grãos e esterco. Medidas de controle incluem filtragem do ar, incubação das culturas num meio estéril, esterilização dos grãos, isolamento e destruição das culturas contaminadas e manutenção da higiene.

A habilidade desse organismo de mutar da forma assexuada *Monilia*, para a forma sexuada (*Neurospora*), é um fator determinado pela nutrição e pelo pH, baixo pH favorece a expressão da forma assexuada, enquanto pH médio favorece a forma sexuada. Todas as culturas infectadas devem ser removidas o quanto antes do laboratório e eliminadas. Uma limpeza é absolutamente necessária. Filtros de alta eficiência eliminam esse contaminante.

Classe: Fungos Imperfeitos

Ordem: Mycelia Sterilia

Gênero: *Papulospora*

Um saprófita, comum no composto maduro ou com excesso de umidade. Algumas espécies crescem diretamente na madeira usada na construção das bandejas e depois se espalham para as estantes. Disseminado através do ar, através do composto utilizado ou das bandejas não esterilizadas que já foram contaminadas com esse fungo. As medidas de controle incluem evitar que a compostagem seja

exagerada, balanceamento da umidade no composto, remover o composto antigo ou contaminado, limpeza das bandejas e manutenção de boa higiene entre as colheitas.

Classe: Fungos Imperfeitos

Ordem: Moniliales

Família: Eurotiaceae

Gênero: *Penicillium*

Um contaminante muito comum. Mesmo não ocorrendo com tanta frequência na natureza quanto o *Cladosporium*, este fungo é o mais comum entre os contaminantes de interiores, um fato que está ligado aos hábitos alimentares dos seres humanos. *Penicillium* é abundante em gêneros alimentícios como as frutas, queijos e grãos armazenados. Muitas espécies preferem um habitat com pH ácido. *Penicillia* são ocasionais ou frequentes em compostos de cogumelos mal desenvolvidos, na cobertura do solo e em restos de cogumelos descartados.

A disseminação ocorre primeiramente através do ar, também em grãos estocados e outros gêneros alimentícios, bem como os humanos são os maiores disseminadores desse mofo. A filtragem do ar, remoção de restos de produtos, isolamento das culturas contaminadas e manutenção de um alto nível de higiene são as medidas de controle que devem ser tomadas.

Classe: Zygomycetes

Ordem: Mucorales

Família: Mucoraceae

Gênero: *Rhizopus*

Um saprófita, comumente visto tanto na cultura com agar quanto nos grãos. *Rhizopus* habita naturalmente estrume e solos e é um decompositor de plantas e animais mortos. Dentro de casa, este contaminante é visto com frequência sobre o pão velho ou em grãos e frutas armazenados. A disseminação é feita pelo ar. Medidas de controle incluem a filtragem de ar, aderir às práticas de higiene, e esterilização dos grãos e do meio com agar.

Classe: Fungos Imperfeitos

Ordem: Moniliales

Família: Moniliaceae

Gênero: *Trichoderma*

Muito comum no composto, na cobertura do solo e em menos grau no grão e no agar. *Trichoderma* frequentemente parasita culturas de cogumelos e pode inibir ou diminuir a frutificação. Muitas espécies crescem na floresta ou nos tecidos da madeira e são abundantes em turfas. Frequentemente cresce em bandejas de madeira que contêm o composto.

Primeiramente é anemófilo quando contamina a cultura de agar e grãos. Na cobertura do solo, é introduzido através da turfa ou do húmus. *Trichoderma* é comumente disseminado durante a colheita, limpeza das camas ou irrigação. Espécies desse gênero geralmente preferem pH ácido.

Medidas de controle incluem cuidado ao escolher, disposição dos cogumelos mortos ou doentes, redução dos níveis de umidade e dos níveis de dióxido de carbono e aumento na circulação de ar para eliminar os esporos aéreos mortos. Princípios isolados de *Trichoderma* podem ser facilmente contidos por métodos diversos. Desde que esse fungo cresça em habitats ácidos, a elevação do pH do solo nos arredores inibe o crescimento. Talvez o jeito mais fácil de elevar o pH seja cobrir a colônia infectada com sal, hipoclorito de sódio ou bicarbonato de sódio. Reconhecer e tratar esse fungo nos estágios iniciais, antes que muitos esporos sejam produzidos, reduz enormemente o risco de colônias satélites se espalharem pela sala de crescimento. Cogumelos afetados pelo *Trichoderma* devem ser cuidadosamente isolados. Todos os itens que entrarem em contato com esse contaminante (ferramentas, trabalhadores etc.) devem ser limpos. Pasteurização a 120°C, por uma hora, efetivamente mata os esporos desse fungo.

Sobre o fungo *Drechslera*, não foi encontrada bibliografia citando-o como contaminante no cultivo de *Pleurotus* spp. Por isso, sua aparição durante esse experimento foi atribuída ao fato de ser um patógeno dos grãos de arroz, sendo que o substrato para o cultivo do cogumelo foi a palha dessa Poaceae.