

AVALIAÇÃO DO TEMPO DE AUTOCLAVAGEM SOBRE O POTENCIAL DE CONTAMINAÇÃO DE SUBSTRATO NA TÉCNICA DE PRODUÇÃO EM SERRAGEM DE COGUMELOS *GANODERMA LUCIDUM*

Sérgio Miguel Mazaro¹, Sabrina Santos Guimarães², Valdecir Szepanhuk³, Marcio Barreto Rodrigues⁴ & Marcos Vily Paladini⁵

1-Professor Doutor em Agronomia - Produção Vegetal; 2-Estagiária do Laboratório de bioquímica e fitossanidade; 3-Acadêmico do curso de Horticultura; 4-Professor Doutor do curso de Química; 5-Acadêmico do curso de Agronomia da UTFPR

Resumo - O experimento foi conduzido na Universidade Tecnológica Federal do Paraná - Campus Dois Vizinhos PR, no ano de 2007, com objetivo de avaliar o efeito de diferentes tempos de autoclavagem sobre o potencial de contaminação de substrato na técnica de produção em serragem de cogumelos *Ganoderma lucidum*. O tempo de exposição dos substratos à autoclave a 121°C e pressão de trabalho de 1,2 Kg/cm² foi o que constituiu os tratamentos, sendo o tratamento 1 (30 min autoclavagem); tratamento 2 (60 min autoclavagem); tratamento 3 (30 min autoclavagem/ intervalo de 24h/ 30 min autoclavagem); tratamento 4 (60 min autoclavagem/ intervalo de 24h/ 60 min autoclavagem). Conforme resultado observado no presente experimento a técnica de autoclavagem do substrato por 30 minutos, com intervalo de 24 horas e posteriormente mais 30min de autoclavagem possibilitou completa esterilização do substrato, demonstrando que os microorganismos que resistiram a primeira exposição ao calor, não suportam a uma segunda exposição.

Palavras-Chave: cogumelo, substrato, fungos contaminantes.

EVALUATION OF THE TIME OF AUTOCLAVING ON THE POTENTIAL OF SUBSTRATE CONTAMINATION IN THE TECHNIQUE OF PRODUCTION IN SAWDUST OF *GANODERMA LUCIDUM* MUSHROOMS

Abstract- The experiment was carried out at Federal Technological University of the Paraná - Dois Vizinhos - Campus - PR, during 2004 with the objective to evaluate the Effects of different autoclaving times on the potential of substrate contamination in the technique of production in sawdust of *Ganoderma lucidum* mushrooms. The time of exposition of substrate to the sterilizer the 121°C and pressure of work of 1,2 Kg/cm² was what it constituted the treatments, being treatment 1 (30 minutes autoclaving); treatment 2 (60 minutes of autoclaving); treatment 3 (30 minutes autoclaving and interval of 24 hours and 30 minutes of autoclaving); treatment 4 (60 minutes of autoclaving and interval 24 hours and 60 minutes of autoclaving). As result observed in the present experiment the technique of autoclaving of the substratum per 30 minutes, with interval the 24hours and more 30 minutes of autoclaving possible complete sterilization of the substrate, demonstrating that the microorganisms that had resisted the first exposition the heat, do not support to one second exposition.

KeyWord: mushroom, substrate, saprophytic fungi.

1. INTRODUÇÃO

O *Ganoderma lucidum* é o cogumelo medicinal mais famoso no mundo, sendo muito difundido na China, Coréia, Japão e Estados Unidos. É conhecido pelos brasileiros como Cogumelo Rei ou *Ganoderma* Brilhante, pelos japoneses como Reishi ou Mannetake (cogumelo divino), pelos chineses e coreanos como Ling Chih ou Ling Zhi (cogumelo da imortalidade)(URBEN, 2004).

O cultivo de cogumelos em serragem permite resultados

mais rápidos e mais produtivos em relação a produção em troncos, porém exige mais investimentos em equipamentos. Na escolha da serragem dá-se preferência a árvores adultas, e que não possuam compostos tóxicos, devendo ser evitado a utilização de aglomerados, compensados e as de madeiras tratadas com fungicidas, pois as substâncias contidas nestas, podem inibir o crescimento do micélio (COGUMELOS IMPERIAIS, 2007).

Com objetivo de aumentar a disponibilidade de nutrientes no composto a base de serragem, adiciona-se farelos de

cereais, com reflexo no aumento da produtividade dos cogumelos (COGUMELO HOBBY, 2007). Com o incremento de nutrientes, também aumenta a incidência de contaminantes, sendo necessária atenção especial no processo de esterilização do substrato para assegurar que todos os contaminantes sejam eliminados (COGUMELO HOBBY, 2007).

O substrato está sujeito à ocorrência de diversos organismos prejudiciais ao cultivo do cogumelo, como vírus, bactérias e principalmente fungos, os quais podem interferir em várias fases do ciclo de produção (WOOD & SMITH, 1987 citados por PEIL et.al, 1996), assim como nematóides, insetos e ácaros (HAYES, 1978 citado por PEIL et. al, 1996). Assim, uma vez que o substrato está sujeito a contaminações, a presença de fungos saprófitas vem sendo apontada como um dos principais fatores que, frequentemente, ocasionam problemas ao cultivo (SINDEN, 1971; WOOD & SMITH, 1987 citados por PEIL et. al., 1996).

Os fungos contaminantes competidores são aqueles que competem com o cogumelo pelo substrato de cultivo. São geralmente em maior número e podem ser prejudiciais, colonizando todo o substrato, impedindo o desenvolvimento do cogumelo (URBEN, 2004).

URBEN, 1998 citado por URBEN, (2004), observou que a contaminação pode ocorrer nas mais diferentes fases de cultivo de cogumelos, como no isolamento, compostagem, sementeira, crescimento vegetativo do fungo e colheita do carpóforo. Os fungos encontrados são dos gêneros: *Mycotipha* (alto teor de umidade), *Doratomyces* (constituente da microflora do solo), *Verticillium* (parasita), *Fusarium* (presente no ar, grãos, farelo, solo e substrato), *Aspergillus* (contaminante de meios de cultura e substrato), *Rhizopus* (contaminante do ar, presente em todas as etapas de cultivo), *Sepedorium* (contamina o agar, substrato e parasita cogumelos nativos), *Trichoderma* (ocorre no ar, solo, substrato, grãos e meios de cultura; podendo também ser parasita) e *Gliocladium* (ocorre no solo, substrato; pode ser saprofítico ou parasita).

O método mais empregado para eliminar os microorganismos é o calor, por ser eficaz, barato e prático. Do ponto de vista microbiológico, os microorganismos são considerados mortos quando perdem, de forma irreversível, a capacidade de se multiplicar (TRABULSI & ALTERTHUM, 2005). O calor úmido mata os microorganismos principalmente pela coagulação das proteínas, que é causada pela ruptura das pontes de hidrogênio (desnaturação) que mantém as proteínas em sua estrutura tridimensional (TORTORA et al., 2005).

A esterilização confiável com calor úmido requer temperatura acima da água fervente. Essas temperaturas elevadas são mais comumente obtidas por vapor sob pressão, em uma autoclave (TORTORA et al., 2005). O adequado manuseio do autoclave, como temperatura e pressão é que permitem uma eficiente eliminação dos microorganismos (PELCZER et al., 1997). A taxa de destruição de microorganismos durante o processo de autoclavagem é rápida, mas é influenciada pela temperatura

e pela duração do processo, pelo tamanho da autoclave, pela velocidade do fluxo de vapor, pela densidade e tamanho do material e pela colocação do material na câmara. Cuidados devem ser tomados para evitar a formação de bolsas de ar, que inibem a penetração do vapor no material. Em geral as autoclaves operam entre 121° e 132° C por 15 minutos ou mais (MURRAY et al. 2004).

Na produção de cogumelos pela utilização de serragem o tempo de autoclavagem ainda não está totalmente elucidada, pois se o período for insuficiente não irá esterilizar o substrato de forma eficiente, se for muito elevado, pode ocorrer ruptura do recipiente aonde está contido o substrato, além de gasto energético desnecessário. Outro fator que é dúbio é a necessidade de reautoclavagem para eliminação de patógenos que se encontram em estruturas de sobrevivência não atingidas por uma única autoclavagem. Desta forma, este trabalho teve por objetivo avaliar o tempo de autoclavagem, bem como a necessidade de reautoclavagem, sobre o potencial de contaminação de substrato na técnica de produção em serragem de *Ganoderma lucidum*.

MATERIAL E METODOS

O trabalho foi realizado no Laboratório de Bioquímica e Fitossanidade, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Campus Dois Vizinhos, no ano de 2007.

O substrato foi constituído pelos seguintes ingredientes: 4000g de serragem de eucalipto, 1000g de farelo de trigo, 100g gesso agrícola, 8000ml de água. Após homogenizado foi depositado em sacos de polipropileno (resistentes a altas temperaturas), com espessura de 30 micras e com capacidade de 4 Kg, fechado em sua porção superior com algodão hidrofóbico, e então, levado ao autoclave a temperatura de 121°C e pressão de trabalho de 1,2 Kg/cm².

O tempo de exposição dos substratos ao autoclave foi o que constituiu os tratamentos, sendo o tratamento 1 (30 min autoclavagem); tratamento 2 (60 min autoclavagem); tratamento 3 (30 min autoclavagem/ intervalo de 24h/ 30 min autoclavagem); tratamento 4 (60 min autoclavagem/ intervalo de 24h/ 60 min autoclavagem), sendo realizada 10 repetições por tratamento, considerando a unidade experimental um saco com substrato.

Após terem sido submetidos a autoclavagem, os sacos contendo os substratos foram mantidos no escuro, na temperatura de 25°C, sendo observado o processo de contaminação diariamente. A avaliação foi realizada após 20 dias da aplicação dos tratamentos, tempo este considerado suficiente para que qualquer contaminação remanente no substrato se tornasse aparente na avaliação visual.

Os resultados obtidos foram submetidos a análise de variância e comparação de médias pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro, com o software SASM Agri (ALTHAUS et al., 2001).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O tempo de autoclavagem é um fator determinante no processo de esterilização do substrato (tabela 1), pois com apenas 30 minutos de autoclavagem não foi suficiente para eliminação completa dos microorganismos contaminantes. Com a elevação do tempo para 60 minutos o processo mostrou-se mais adequado, porém não completamente eficiente. Conforme TORTORA et al., (2005) o calor requer tempo extra para alcançar o centro de materiais sólidos, pois esses materiais não desenvolvem as correntes de convecção de distribuição de calor eficientes que ocorre nos líquidos, para esterilizar a superfície de um sólido.

O melhor resultado, com máxima eficiência foi obtido com 30 minutos de autoclavagem, intervalo 24horas, e posteriormente mais 30 minutos de autoclavagem. Este tratamento de exposição do substrato ao vapor sob pressão em autoclave, durante dois momentos, permitiu a eliminação de microorganismos que se encontravam em estágio de sobrevivência, ou seja, protegidos por estruturas especializadas de resistência, e que no primeiro momento não foram suficientemente eliminadas. Possivelmente, após a primeira autoclavagem esses organismos, através da alta temperatura e pressão, tenham sido estimulados a saírem do processo de sobrevivência, aonde então foram atingidos pela segunda autoclavagem e eliminados de forma eficiente.

Tabela 1. Contaminação de substratos na técnica de produção em serragem de cogumelo *Ganoderma lucidum* em função do tempo de autoclavagem. Dois Vizinhos, 2007.

Tratamentos	Contaminação (%)
30 min. Autoclavagem	75 a*
60 min. Autoclavagem	25 c
30 min. autoclavagem/ intervalo 24h/ 30 min autoclavagem	0 d
60 min. autoclavagem/ intervalo 24h/ 60 min autoclavagem	50 b

* Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

No tratamento com exposição ao calor mais prolongada, ou seja, 60 minutos, e repetida após intervalo de 24h, observou-se um aumento do percentual de contaminação, tal fato em primeiro momento causou estranheza, posteriormente, foi elucidado com a observação de pequenas rupturas ocorridas nas emendas do saco de

polipropileno durante processo de autoclavagem, viabilizando a entrada de contaminantes e indicando incompatibilidade com exposição demasiada a altas temperaturas.

CONCLUSÕES

Conforme resultado observado no presente experimento a técnica de autoclavagem do substrato por 30 minutos, com intervalo de 24 horas e posteriormente mais 30min de autoclavagem a 121oC e pressão de trabalho de 1,2 Kgf/cm² possibilitou completa esterilização do substrato, demonstrando que os microorganismos que resistiram a primeira exposição ao calor, não suportam a uma segunda exposição.

REFERÊNCIAS

- ALTHAUS, R.A.; CANTERI, M.G.; GIGLIOTI, E.A. Tecnologia da informação aplicada ao agronegócio e ciências ambientais: sistema para análise e separação de médias pelos métodos de Duncan, Tukey e Scott-Knott. Anais do X Encontro Anual de Iniciação Científica, Parte 1, Ponta Grossa, p.280-281, 2001.
- COGUMELO HOBBY. Disponível em: <http://paginas.terra.com.br/negocios/cogumelohobby>, acesso: 22 Jul 2007.
- COGUMELOS IMPERIAIS. Disponível em: <http://www.cardoncello.com.br/index>, acesso em: 22 Jul 2007.
- MURRAY P.R., ROSENTHAL K.S., KOBAYASHI G.S., PFALLER M.A., Microbiologia Médica, 4 ed, Guanabara Koogan S.A, Rio de Janeiro, 2004.
- PEIL, R. M.; ROSSETO, E. A.; PIEROBOM, C.R. & ROCHA, M. T., Desinfecção de compostos para cultivo de cogumelo *Agaricus bisporus* (Lange) Imbach, Agrociência, v.2, n 3, 159-164, Set.-Dez., 1996, disponível em: <http://www.ufpel.tche.br/faem/agrociencia/v2n3/artigo05.pdf>, acesso em: 22 Jul 2007.
- PELCZER M. J. J., CHAN E C S, KRIEG N R. Microbiologia: conceitos e aplicações, Vol.1, 2ed, Pearson Education do Brasil, São Paulo, 1997.
- TORTORA G. J., FUNKE B. R., CASE C. L. Microbiologia, 8ed, Artmed, Porto Alegre, 2005.
- TRABULSI L.R., ALTERTHUM F., Microbiologia, 4ed, Editora Atheneu, São Paulo, 2005.
- URBEN, A.F. Produção de cogumelos por meio de tecnologia chinesa modificada. Brasília : EMBRAPA, 2004.187p.