

**ADITIVOS MICROBIANOS NO PROCESSO DE
COMPOSTAGEM E NA CAMADA DE
COBERTURA PARA O CULTIVO DO
COGUMELO *Agaricus brasiliensis***

EMERSON TOKUDA MARTOS

2009

EMERSON TOKUDA MARTOS

**ADITIVOS MICROBIANOS NO PROCESSO DE
COMPOSTAGEM E NA CAMADA DE
COBERTURA PARA O CULTIVO DO
COGUMELO *Agaricus brasiliensis***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Microbiologia Agrícola, área de concentração em Biologia de Fungos Filamentosos, para obtenção do título de “Mestre”.

Orientador

Prof. Dr. Eustáquio Souza Dias

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2009

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

Martos, Emerson Tokuda

Aditivos microbianos no processo de compostagem e na camada de cobertura para o cultivo do cogumelo *Agaricus brasiliensis* / Emerson Tokuda Martos. – Lavras: UFLA, 2009.

53 p. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2009.

Orientador: Eustáquio Souza Dias.

Bibliografia.

1. Cogumelo do Sol. 2. Cultivo. 3. Produtividade. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 635.8

**ADITIVOS MICROBIANOS NO PROCESSO DE
COMPOSTAGEM E NA CAMADA DE
COBERTURA PARA O CULTIVO DO
COGUMELO *Agaricus brasiliensis***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Microbiologia Agrícola, área de concentração em Biologia de Fungos Filamentosos, para obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 20 de fevereiro de 2009

Prof. Dr. Eustáquio Souza Dias UFLA

Prof. Dr. Romildo da Silva UFLA

Prof. Dr. Elberis Pereira Botrel UFLA

Prof. Dr. Eustáquio Souza Dias
UFLA
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL

Primeiramente a Deus, por estar presente em todos os momentos de minha vida.

Aos meus pais, José Martos e Kazuko Tokuda Martos.

Aos meus grandes amigos.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, José Martos e Kazuko Tokuda Martos, pela confiança e apoio, durante toda minha vida acadêmica e a meus irmãos Edson Tokuda Martos e Gerson Tokuda Martos, pela amizade e compreensão.

Aos Professores Eustáquio Souza Dias e Romildo da Silva, pelas orientações, críticas e sugestões que permitiram a realização deste trabalho.

Às professoras Rosane Freitas Schwan e Patricia Gomes Cardoso, pela amizade e ensinamentos nas disciplinas necessárias a minha formação.

A todos os professores do departamento de Biologia, pelas ajudas diretas e indiretas, necessárias ao desenvolvimento deste trabalho.

Ao “Mané” e aos motoristas do departamento de transporte, por disponibilizar os veículos e buscar os substratos necessários para a realização dos experimentos.

Ao Paulinho, Magda, Cidinha, Ivani, Carla, Cris por me auxiliarem sempre que necessário.

Aos amigos da Fisiologia Vegetal, Joel, Odorenço, Tanhã, Evaristinho, Celen, Tina, Lena e Barrinha.

Aos amigos, Rômulo, Francisco, Leandro, Pedro, Euziclei, Maiara, Cintia e a todos os demais que me acompanharam durante minha vida acadêmica em Lavras.

À dona Cleonice, Rodrigo, Renato, Romildo Júnior, Irene, David e Renatinha, pela amizade.

A todos os colegas de pós-graduação pelo convívio, e a todos aqueles que colaboraram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Páginas
LISTA DE TABELAS.....	i
LISTA DE FIGURAS.....	ii
RESUMO.....	iii
ABSTRACT.....	v
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	4
2.1 O mercado de <i>Agaricus brasiliensis</i>	4
2.2 Técnicas de cultivo.....	6
2.2.1 Produção do composto (Fases I e II).....	7
2.2.1.1 Microbiota da compostagem.....	12
2.2.1.2 Bactérias presentes na compostagem.....	13
2.2.1.3 Fungos presentes durante a compostagem.....	14
2.2.1.4 Microrganismos assimiladores de amônia.....	15
2.2.2 Inoculação do composto e corrida micelial (Fase III).....	17
2.2.3 Indução da frutificação (Fase IV).....	18
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	22
3.1 Local de realização dos experimentos.....	22
3.2 Metodologia geral de preparo do composto, indução da frutificação e cultivo do cogumelo <i>A. brasiliensis</i>	22
3.2.1 Processo de compostagem.....	22
3.2.2 Preparo do inículo de <i>Agaricus brasiliensis</i>	23
3.2.3 Inoculação co composto com <i>A. brasiliensis</i>	23
3.2.4 Indução da frutificação e colheita dos cogumelos.....	24
3.2.5 Cálculo da eficiência biológica e produtividade.....	25
3.2.6 Determinação do crescimento micelial.....	25
3.3 Descrição dos experimentos.....	25
3.3.1 EXPERIMENTO 1 Inoculação dos microrganismos em diferentes etapas o processo de compostagem.....	25
3.3.2 EXPERIMENTO 2 Efeito da microbiota natural e da inoculação do coquetel bacteriano na camada de cobertura do cogumelo <i>A. brasiliensis</i>	27
3.3.3 Delineamento experimental e análise estatística.....	29
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
4.1 EXPERIMENTO 1 Inoculação dos microrganismos em diferentes etapas no processamento da compostagem.....	30
4.1.1 Umidade no composto colonizado em cada tratamento.....	30
4.1.2 Produtividade e eficiência biológica do cogumelo <i>A. brasiliensis</i> em função da inoculação do composto com <i>S. thermophilum</i> e bactérias.....	31

4.2 EXPERIMENTO 2 Efeito da microbiota natural e da inoculação do coquetel bacteriano na camada de cobertura do cogumelo <i>A. brasiliensis</i>	40
4.2.1 Precocidade de produção dos cogumelos.....	40
4.2.2 Efeito da autoclavagem e inoculação da terra de cobertura sobre a Indução da frutificação do cogumelo <i>A. brasiliensis</i>	41
CONCLUSÕES.....	46
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47

LISTA DE TABELAS

	Páginas
TABELA 01 Teor de umidade do composto colonizado nos diferentes tratamentos de inoculação.....	32
TABELA 02 Resultados de crescimento micelial, produtividade, eficiência biológica e peso médio dos cogumelos produzidos nos diferentes tratamentos de inoculação do composto de cultivo de <i>A. brasiliensis</i> com bactérias.....	33
TABELA 03 Resultados de crescimento micelial, produtividade, eficiência biológica e peso médio dos cogumelos produzidos nos diferentes tratamentos de inoculação do composto de cultivo de <i>A. brasiliensis</i> com <i>S. thermophilum</i>	35
TABELA 04 Precocidade de em dias entre o momento da indução a frutificação e o primeiro cogumelo colhido de cada tratamento da terra de cobertura.....	42
TABELA 05 Resultados de produtividade, eficiência biológica e peso médio dos cogumelos de <i>A. brasiliensis</i> em função dos tratamentos de autoclavagem e inoculação da terra de cobertura com bactérias.....	43

LISTA DE FIGURAS

	Páginas
FIGURA 01 Fluxos de produção do cogumelo <i>A. brasiliensis</i> para os diferentes tratamentos de inoculação do composto com bactérias.....	35
FIGURA 02 Fluxos de produção do cogumelo <i>A. brasiliensis</i> para os diferentes tratamentos de inoculação do composto com <i>S. thermophilum</i>	36
FIGURA 03 Fluxos de produção do cogumelo <i>A. brasiliensis</i> considerando todos os tratamentos de inoculação do composto com bactérias e <i>S. thermophilum</i>	36
FIGURA 04 Fluxos de produção do cogumelo <i>A. brasiliensis</i> , em função dos tratamentos de autoclavagem e inoculação da terra de cobertura.....	42

RESUMO

MARTOS, Emerson Tokuda. **Aditivos microbianos no processo de compostagem e na camada de cobertura para o cultivo do Cogumelo *Agaricus Brasiliensis***. 2009. 53p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

Diferentes espécies de bactérias e uma espécie de fungo foram testadas como inoculantes em diversas etapas do processo de compostagem para a obtenção do substrato de cultivo do cogumelo *Agaricus brasiliensis*. Essas mesmas espécies de bactérias foram utilizadas na inoculação da terra de cobertura para indução da frutificação. Em todos os experimentos foram utilizados bagaço de cana-de-açúcar e capim coast-cross como substrato base, o qual foi suplementado na quarta reviragem com farelo de trigo, uréia, superfosfato simples, calcário e gesso. As medas foram reviradas a cada dois dias durante quatro semanas. Depois, o composto foi pasteurizado com vapor d'água em dois ciclos de 12 horas. Para o experimento de inoculação do composto foi avaliada a utilização de um coquetel bacteriano e, separadamente, do fungo *Scytalidium thermophilum*. O coquetel bacteriano foi composto das espécies *Alcaligenes faecalis*, *Pseudomonas* sp e *Bacillus subtilis*. Os dois inoculantes do composto foram testados em diferentes momentos do processo: i- na suplementação; ii- na pasteurização; iii- após a pasteurização. Como controle, foi utilizada a mesma formulação de composto sem inoculação. Para este experimento foram avaliados: crescimento micelial do *A. brasiliensis* no composto, produtividade, eficiência biológica e peso médio de cogumelos para cada tratamento. No experimento de inoculação da terra de cobertura, foi utilizado apenas o coquetel bacteriano, com os seguintes tratamentos com a terra de cobertura: i- autoclavada e inoculada; ii- autoclavada e não inoculada; iii- não autoclavada e inoculada; iv- não autoclavada e não inoculada.. Foram avaliadas: precocidade de produção, produtividade, eficiência biológica e peso médio dos cogumelos. Os resultados demonstraram que a inoculação do composto com bactérias no momento da pasteurização favoreceu uma maior velocidade de crescimento micelial, resultando numa colonização mais rápida do composto. A produtividade não diferiu estatisticamente entre os tratamentos, entretanto, quando se considerou eficiência biológica, foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos. No experimento de desinfestação da camada de cobertura, a utilização da terra autoclavada, com ou sem inoculação, apresentou os melhores resultados de produtividade e eficiência biológica, ambos com diferenças significativas em relação aos tratamentos que utilizaram terra não autoclavada, com ou sem

inoculação. Esses resultados indicam que a presença da microbiota natural do solo utilizado como terra de cobertura apresentou um efeito antagônico à produção do cogumelo *A. brasiliensis*, de forma que a eliminação desses microrganismos foi mais importante do que a inoculação com as espécies testadas neste trabalho.

* Comitê orientador: Eustáquio Souza Dias – UFLA (Orientador), Romildo da Silva – UFLA (Coorientador).

ABSTRACT

MARTOS, Emerson Tokuda. **Microbial additives in process of composting and casing layer of cultivation to the mushroom *Agaricus brasiliensis***. 2009. 53p. Dissertation (Master in Agronomy) – Federal University of Lavras, Lavras, MG.*

Different species of bacteria and a fungus species were tested as inoculant agents in different moments of the composting process for getting the substrate of cultivation for the edible mushroom *Agaricus brasiliensis*. Besides, the same species of bacteria were also used in the inoculation of the casing layer. In all experiments sugarcane bagasse and coast-cross hay were used as base substrate, and supplemented with wheat bran, urea, superphosphate, limestone and gypsum. The compost was turned every two days for four weeks and then pasteurized with water vapor in two cycles of 12 hours. For compost inoculation the use of a bacterial cocktail was evaluated, separately, from the *Scytalidium thermophilum* fungus. The bacterial cocktail was made up of the species *Alcaligenes faecalis*, *Pseudomonas* sp and *Bacillus subtilis*. The two inoculants of the compost (bacterial and fungal) were tested in different moments of the process: i – in the moment of supplementation; ii – in the moment of pasteurization; iii - after pasteurization. As a control, the same compost formulation was used although with no inoculation treatment. For this experiment the mycelial growth of *A. brasiliensis* in the compost was evaluated as well as productivity, biological efficiency, weight and number of mushrooms for each treatment. In the casing layer experiment the same bacteria were used with the following treatments: i – autoclaved soil and inoculated with bacteria ; ii – autoclaved soil and not inoculated; iii – not autoclaved soil and inoculated with bacteria; iii – not autoclaved soil and and not inoculated. Precocity of production, productivity and biological efficiency were evaluated. The results showed that the compost inoculation with bacteria at the moment of the pasteurization resulted in a higher speed of mycelial growth, resulting in a quicker colonization of the compost. After that, the treatments that showed a higher speed of mycelial growth were: inoculation with bacteria at the moment of supplementation, fungal inoculation at the moment of supplementation and fungal inoculation after pasteurization. The inoculation treatments with bacteria after the pasteurization and with the fungus at the moment of pasteurization showed results statistically identical to that of the control. The results of the

productivity did not differ statistically among the treatments; however, the biological efficiency was significantly different among the treatments. For the experiment of casing layer, the best results of productivity and biological efficiency were obtained with autoclaved soil (inoculated or not inoculated). These results showed that the presence of natural microbiota from the soil used as casing layer had an antagonistic effect on the *A. brasiliensis* mushroom production, so that the elimination of these microorganisms was more important than the inoculation with tested species in this work.

* Guidance Committee: Eustáquio Souza Dias – UFLA (Advisor), Romildo da Silva – UFLA (Co-advisor).

1 INTRODUÇÃO

O consumo de cogumelos no Brasil ainda é muito pequeno quando comparado a outros países. A falta de tradição por parte da população brasileira e o preço, relativamente elevado, contribuem para que o consumo de cogumelos fique restrito a grandes centros urbanos e para a população de maior poder aquisitivo.

Para aumentar a demanda de cogumelos no Brasil é necessário reduzir o custo de produção. Dentre as várias etapas de produção do cogumelo, a obtenção do composto é uma das mais importantes, pelo fato de afetar diretamente a produtividade e, conseqüentemente, o custo final da produção. A formulação do substrato para o cultivo do *Agaricus brasiliensis*, consiste no uso de resíduos agroindustriais como capins, bagaço de cana-de-açúcar, palhas, sabugo de milho e excremento de animais. A compostagem é um dos processos mais importantes para a produção do substrato de cultivo, pois uma boa formulação e uma fermentação adequada são necessários para uma colonização satisfatória do fungo e uma boa produtividade.

O cultivo do cogumelo *A. brasiliensis* no Brasil é realizado, em grande parte, por produtores que possuem pequena capacidade de investimento e tecnologia. Por isso, esses produtores dependem, na sua maioria, do fornecimento do composto já colonizado de empresas ou outros produtores que possuem infra-estrutura apropriada para produzir o composto. Com isso, o preço do composto colonizado normalmente onera sobremaneira o custo de produção de um pequeno produtor. Considerando que a fungicultura ainda é uma atividade pouco difundida no Brasil, em comparação às olerícolas de modo geral, é também mais difícil a obtenção de crédito para financiar a implantação de uma infra-estrutura adequada, apesar de ser uma atividade que permite a obtenção de um produto de alto valor agregado para o pequeno agricultor.

Portanto, a melhor estratégia para pequenos produtores é a produção do próprio composto, de preferência utilizando infra-estrutura apropriada para a condução do processo de compostagem convencional. Entretanto, uma alternativa para a produção de pequenos volumes de composto é a utilização da compostagem longa seguida de pasteurização a vapor. Essa metodologia dispensa maiores investimentos de capital, tanto para a construção de pátios, câmaras de pasteurização, como de maquinários. Além disso, essa estratégia permite o escalonamento da produção, de forma que o produtor pode planejar a produção para cada semana, de acordo com a demanda, de forma a garantir um suprimento contínuo de cogumelos frescos para restaurantes, supermercados, etc. Outro aspecto extremamente positivo é que o pequeno produtor pode iniciar uma produção em pequena escala e aumentá-la de forma gradativa, conforme a demanda.

Apesar de tantas vantagens, a estratégia da compostagem longa seguida da pasteurização a vapor, apresenta como grande desvantagem a obtenção de um composto de qualidade inferior, quando comparado à metodologia tradicional. Provavelmente, a microbiota presente e a sucessão microbiana durante o processo de compostagem e, em especial, a colonização do composto por microorganismos termofílicos durante a Fase II da compostagem tradicional, são essenciais para a obtenção de um composto de qualidade. Dentre as inúmeras espécies de microrganismos presentes no processo, sabe-se que a presença de microrganismos assimiladores de amônia é essencial para que o composto de cultivo dos cogumelos *Agaricus* apresente baixa concentração de amônia, a qual é limitante para o crescimento do micélio desses cogumelos. Dessa forma, quando se utiliza a compostagem longa seguida de pasteurização a vapor, elimina-se a Fase II, a qual é determinante para que o processo de assimilação de amônia seja efetuada pelos microrganismos assimiladores de amônia responsáveis pelo processo, tais como actinobactérias, bactérias e fungos.

Diante disso, a inoculação do composto com microrganismos assimiladores de amônia pode ser uma estratégia importante para permitir a obtenção de um composto de boa qualidade, mesmo sem a utilização da câmara de pasteurização para a condução da Fase II.

Portanto, este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial de utilização de microrganismos durante a compostagem para a obtenção do substrato de cultivo do cogumelo *Agaricus brasiliensis*. Além disso, avaliou-se neste trabalho o efeito da microbiota presente na terra de cobertura sobre a produtividade do cogumelo, comparada com a terra autoclavada e adição das mesmas espécies de bactérias utilizadas para a inoculação do composto.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 O mercado de *Agaricus brasiliensis*

O consumo do cogumelo *Agaricus brasiliensis* tem sido estimulado por estudos sobre a sua qualidade nutricional, principalmente pela presença de β -glucanas, homo e hetero-glucanas, supostamente responsáveis por algumas propriedades benéficas à saúde humana, como atividade imunomodulatória, antioxidante, antiinflamatória e anticancerígena (Osaki et al., 1994; Ito et al., 1997; Park et al., 2003).

Seu conteúdo em proteínas é relativamente alto, quando comparado com a maioria das olerícolas, alcançando de 1,5% a 6% de sua massa fresca, variando de acordo com as espécies e, ou, linhagem, idade, ambiente e a natureza do substrato de cultivo. Geralmente, cogumelos jovens são mais ricos em proteínas que os mais maduros ou abertos (Braga et al., 1998).

Durante a década de 1990, houve uma grande expansão do seu cultivo no Brasil, estimulada pela grande demanda do mercado japonês, em função da incapacidade daquele país atender à procura com a produção interna, além do importante aspecto econômico, uma vez que o custo de produção no Japão é mais elevado, por causa da mão de obra mais cara. Com isso, além de produtores rurais, pessoas com as mais variadas formações passaram a se interessar pelo cultivo desse cogumelo, atraídas pelas promessas de lucros elevados associados a baixo investimento e pouco trabalho. Além do excesso de otimismo promovido por falsos especialistas na área, induzindo pessoas despreparadas a entrar no ramo da fungicultura, os anos seguintes reservavam uma realidade bem menos promissora.

Em fevereiro de 2006 o Ministério da Saúde, Trabalho e Bem-Estar do Japão solicitou à comissão de segurança alimentar a avaliação da segurança dos produtos que continham *A. brasiliensis*. As análises revelaram a presença de

agaritina no cogumelo, a qual, após a ingestão pode ser transformada em substância considerada carcinogênica. Entretanto, a agaritina é uma substância comum no cogumelo *A. bisporus* (Champignon de Paris), o qual é o cogumelo mais consumido no mundo. Além disso, a concentração encontrada no cogumelo variou entre 112-731 µg/g na matéria seca, valor inferior ao encontrado em *A. bisporus* (1836 µg/g). Foram também analisados três produtos que possuem como principal ingrediente o cogumelo *A. brasiliensis*, sendo detectada a presença da agaritina em dois produtos, com valores de 124 e 1791 µg/g, os quais são ainda menores do que o presente em *A. bisporus* (Nagaoka, 2006). Apesar disso, diante da possibilidade destes produtos possuírem substâncias que possam prejudicar a saúde, o Ministério da Saúde, Trabalho e Bem-Estar do Japão recomendou a retirada daqueles produtos do mercado.

A empresa japonesa Kcompany, receosa do impacto negativo que essas informações poderiam causar sobre a sociedade japonesa, resolveu retirar do mercado todos os produtos contendo o cogumelo *A. brasiliensis*, até que fosse determinado um valor máximo seguro de agaritina que não cause riscos à saúde humana. Estudos posteriores já apontaram que a concentração de agaritina presente neste cogumelo não representa riscos à saúde humana, porém a concentração máxima permitida não foi descrita pelos autores (Nagaoka, 2006), de forma que já no ano de 2007, o mercado japonês iniciou um processo de recuperação do comércio de *A. brasiliensis*.

Apesar dessa boa notícia, o curto período de incertezas foi suficiente para causar um grande impacto negativo sobre a maioria dos produtores brasileiros. Além disso, o Brasil já enfrentava uma grande dificuldade para competir com a China, cuja oferta de cogumelos é favorecida por uma longa tradição de cultivo, associada à mão de obra extremamente barata e uma localização geográfica privilegiada em relação ao Japão. Com isso, iniciou-se

uma crise no mercado do cogumelo *A. brasiliensis* no Brasil, levando a maioria dos produtores brasileiros a abandonar a atividade.

O aspecto extremamente positivo dessa crise foi que também a grande maioria dos falsos especialistas e aproveitadores que contaminaram essa atividade durante a fase de grande crescimento, também abandonassem as suas atividades, permitindo que a atividade se tornasse mais profissional e consciente dos seus riscos, limitações e dificuldades. Atualmente, o pequeno número que manteve-se no mercado, tem conseguido sustentar a sua produção, alguns direcionados à exportação e outros que têm procurado também alternativas de comercialização.

A comercialização do cogumelo fresco em substituição ao Champignon de Paris é mais complicada, porque o mesmo sofre uma oxidação muito mais rápida quando comparada ao mesmo. Produtores do norte de Minas Gerais desenvolveram novas formas de comércio, utilizando conservas ao óleo e alho ou em forma de pickles e também como matéria prima para a produção de xampu e sabonetes, o que tem sido possível num sistema de cooperativa. A criatividade desses produtores demonstra claramente que a exploração do mercado interno pode ser uma importante alternativa, para tornar os produtores brasileiros menos dependentes do mercado externo, de forma a garantir que pequenos produtores possam manter as suas atividades neste ramo que se diferencia pela possibilidade de trabalhar com produtos de alto valor agregado, o que é muito importante para produtores que não disponham de grandes áreas de terra para cultivo.

2.2 Técnicas de cultivo

A produção do cogumelo *A. brasiliensis* é relativamente recente e sua técnica de cultivo foi adaptada a partir da metodologia de cultivo do cogumelo *Agaricus bisporus* (champignon de Paris).

A produtividade do *A. brasiliensis* é muito variável, principalmente devido às diversas variáveis ligadas ao seu cultivo, como tipos de matérias primas utilizadas na compostagem, material utilizado para realizar a cobertura do composto, características genéticas das linhagens do cogumelo, além de sua dependência por temperaturas entre 25 e 28°C, sendo que valores muito inferiores a esses reduzem drasticamente sua produtividade. Atualmente, consideram-se como bons resultados de produtividade valores entre 10 e 15%, considerando a massa de cogumelos frescos em relação à massa de composto colonizado também fresco. De forma grosseira, esses valores correspondem a uma produtividade de 1 a 1,5% de cogumelos desidratados em relação ao composto fresco, que é a referência mais importante para os produtores, uma vez que esse cogumelo é comercializado na forma desidratada quando destinado à exportação.

O sucesso da produção de cogumelos depende em grande parte da qualidade do inoculante (“semente”) e também da correta preparação do substrato de cultivo, de forma a reduzir os riscos de contaminação e favorecer uma rápida colonização do substrato (Muthukrishnan et al., 2000).

As atividades relacionadas diretamente ao cultivo convencional são: compostagem (Fase I); pasteurização e condicionamento do substrato (Fase II); inoculação e incubação (Fase III); cobertura do substrato colonizado com a camada de cobertura (Fase IV); produção dos cogumelos e colheita (Fase V) (Eira, 2003).

2.2.1 Produção do composto (Fases I e II)

Para a Fase I, é realizada uma compostagem curta, controlando a umidade entre 60 a 70%, por um período de duas semanas, com reviragem do composto a cada dois dias para a homogeneização do substrato. As principais matérias primas utilizadas são resíduos agrícolas tais como palha de trigo, palha

de arroz, gramíneas e bagaço de cana-de-açúcar (Eicker, 1995; Eira, 2003). De acordo com Eira & Minhoni (1997), todo o composto para o cultivo de cogumelos tem como regra o componente volumoso e fibroso à base de palhas de capim e outros materiais fibrosos, ricos em carbono e pobres em nitrogênio e fósforo. No cultivo de *Agaricus sp.*, o composto deve ser previamente suplementado com materiais concentrados como fonte de nitrogênio, como farelos, tortas, sulfato de amônio e uréia. O calcário é normalmente utilizado para o controle do pH e o sulfato de cálcio, ou gesso agrícola, para melhorar a textura do composto. No Brasil, é comum ainda a utilização de uma fonte de fósforo, normalmente na forma de superfosfato simples ou fosfato de Araxá.

Sucessivas mudanças físico-químicas ocorrem no composto em função da ação de diversos microrganismos (Tang et al., 2004), resultando na elevação da temperatura, produção de substâncias voláteis, em especial a amônia, e a transformação de compostos complexos em compostos mais simples, graças à ação das enzimas produzidas pelos microrganismos presentes no composto (Golueke, 1992). A elevação da temperatura está relacionada com a atividade microbiana, fazendo com que a microbiota mesófila seja suplantada pelos microrganismos termofílicos em poucos dias de compostagem. Ao mesmo tempo, o processo caracteriza-se também por uma elevada taxa respiratória, a qual resulta em elevado consumo de oxigênio e alta produção de CO₂, fazendo com que o composto apresente no seu interior pontos de anaerobiose ou de microanaerobiose. Considerando que os processos anaeróbicos não são desejáveis no processo de compostagem, visando ao cultivo de cogumelos, recomenda-se que o composto seja revirado a cada dois ou três dias, o que é bastante diferente dos procedimentos comuns na compostagem direcionada à produção de fertilizantes orgânicos, nos quais o composto fica em repouso durante um período de tempo muito maior, antes de ser revirado.

Microrganismos requerem fontes de carbono, macronutrientes (ex: nitrogênio, fósforo, enxofre e potássio) e certos elementos-traço para seu crescimento. Polissacarídeos e açúcares de modo geral são as principais fontes de carbono e de energia para os microrganismos heterotróficos, sendo parte da energia formada utilizada no metabolismo microbiano e o resto liberado na forma de calor, resultando na elevação da temperatura. O nitrogênio é um elemento crítico no processo por ser um dos componentes essenciais na formação de proteínas, ácidos nucleicos, aminoácidos, enzimas e co-enzimas necessárias para o crescimento e funcionalidade da célula. Quando presente em baixa concentração no substrato, o processo de degradação ocorre mais vagorosamente, e, quando está em excesso, ocorre perda de nitrogênio do composto na forma de amônia ou outro composto nitrogenado. Por isso, considera-se como ótima a relação carbono/nitrogênio (C/N) entre 25 a 30 no início do processo (Golueke, 1992).

A umidade do composto é outro fator extremamente importante para que o processo de compostagem ocorra de forma eficiente. Se a umidade cair abaixo de níveis críticos, a atividade microbiana decresce e os microrganismos entram em dormência (Golueke, 1992). Por outro lado, o excesso de água pode causar falta de aeração e, conseqüentemente, em condições anaeróbicas a taxa de decomposição diminui e aumenta a fermentação anaeróbica, o que pode ser facilmente detectado pelo odor desagradável de produtos sulfurosos como o H₂S. Além disso, o excesso de água no composto resulta também na lixiviação de nutrientes, na forma de chorume, o que deve ser evitado.

A Fase II, que compreende a pasteurização e o condicionamento do composto, inicia-se no momento em que o mesmo é transferido para a câmara de pasteurização após duas semanas de compostagem. A pasteurização convencional é iniciada quando o composto atinge uma temperatura entre 55 a 58° C, sendo estendida por um período de 6 horas (Chang & Miles, 2004). No

Brasil, considerando as nossas condições de temperaturas mais elevadas, é comum considerar-se temperaturas de até 65° C para a pasteurização, assim como períodos mais prolongados, de até 12 horas. A temperatura do composto eleva-se naturalmente dentro do túnel, em função da atividade microbiana, como acontece também durante a Fase I. Entretanto, dentro da câmara, é possível manter condições mais uniformes, evitando ou minimizando a estratificação em termos de temperatura e aeração, o que é possível com o sistema de ventilação forçada que faz com que o ar atravesse todo o composto, permitindo uma uniformização não somente da aeração, mas também da temperatura.

Além da eliminação de possíveis pragas, doenças e contaminantes, a Fase II tem como função promover a seletividade do composto, a qual é alcançada pela degradação de açúcares solúveis, tornando o substrato pouco favorável para uma gama de microrganismos mesofílicos, e pela eliminação da amônia, a qual é absorvida pelos microrganismos termofílicos e transformada em proteína microbiana (Staunton & Mac Canna, 1989; Chang & Miles, 2004). A eliminação da amônia é essencial porque essa substância é tóxica para os cogumelos *Agaricus*, inibindo completamente o seu crescimento micelial no composto. Além disso, a transformação da amônia em proteína microbiana é importante para a nutrição dos *Agaricus* e, conseqüentemente, para a produção dos seus cogumelos. Para o cultivo de *A. bisporus*, é comum utilizar-se um período de até seis dias para a Fase II, entretanto, para o *A. brasiliensis*, a literatura aponta para um período de 8 a 10 dias (Eira, 2003), enquanto que vários produtores de composto ainda estendem a Fase II por até 15 dias. A princípio, a Fase II deve ser finalizada quando a presença de amônia no composto não é mais detectada pelo olfato humano, o que ocorre quando a concentração está faixa de 10 a 20 ppm de amônia (Flegg et al., 1985). No entanto, faltam estudos no Brasil para definir tanto a duração da Fase II para o *A. brasiliensis* como dos níveis de amônia aceitáveis para esse cogumelo, de forma

que os procedimentos adotados são ainda bastante empíricos. Em países que possuem alta tecnologia para a produção do cogumelo *A. bisporus*, normalmente a Fase II tem duração entre 4-7 dias (Jess et al., 2006; Pardo & Pardo, 2007)

Uma metodologia que demanda pouco investimento é o uso da pasteurização utilizando calor úmido, com a injeção de vapor sobre o composto. Segundo Rinker (1993), a temperatura de pasteurização não deve exceder 59° C e o tempo deve ser de até 6 horas, para não matar microrganismos benéficos como as actinobactérias. Entretanto, no Brasil, utilizam-se temperaturas entre 60 e 65° C por até 12 horas, para garantir a eliminação de pragas e doenças, uma vez que alguns contaminantes, em especial do gênero *Aspergillus*, possuem temperatura ótima de crescimento de 37° C, o que faz com que sejam mais resistentes a temperaturas mais elevadas. Até mesmo as construções convencionais (túneis) são equipadas com caldeiras que possibilitem a injeção de vapor e ar para garantir a utilização de uma temperatura adequada para a pasteurização, caso a atividade microbiana não seja suficiente para isso (Gerrits & Van Griensven, 1990).

A autoclavagem de substratos para o cultivo de *Agaricus* pode ser utilizada, normalmente em trabalhos de pesquisa em condições controladas, quando o material é autoclavado em pequenas porções por 1 hora a 120°C. Entretanto não se trata de uma estratégia apropriada para cultivos comerciais, quando se trabalha com grandes volumes de composto, pois isso demandaria grandes investimentos em autoclaves industriais e alto custo energético. Além disso, o crescimento micelial em compostos autoclavados é normalmente inferior em relação a outras formas de condicionamento (Straatsma et al., 2000).

Outra forma de eliminação de pragas e doenças do composto é a injeção de um fumigante químico como o brometo de metila, entretanto, essa estratégia também esbarra em uma série de desvantagens. O fumigante pode ser empregado somente quando o composto torna-se livre de amônia, o que implica

em uma compostagem longa, além da necessidade de controlar a umidade do composto de forma a permitir uma dispersão efetiva do fumigante e evitar que o mesmo fique retido no excesso de água presente (Hayes & Randle, 1968). O emprego deste produto apresenta como grande vantagem o fato de ser um efetivo fungicida, inseticida e nematicida, além de demandar pouca mão-de-obra e dispensar o uso de estruturas necessárias para o controle e manejo de temperatura exigida pela pasteurização. Mas, por outro lado, a ação do fumigante não é seletiva, de forma que a eliminação dos microrganismos não poupa aqueles que são importantes para a seletividade do composto, e benéficos ao crescimento do cogumelo. Essa condição poderia favorecer, posteriormente, o desenvolvimento de contaminantes agressivos como o *Trichoderma* sp., competindo ou até mesmo eliminando o crescimento micelial dos *Agaricus*. Além disso, a utilização de fumigantes está sujeita a restrições legais, como, por exemplo, o brometo de metila, que está atualmente proibido.

Considerando a seletividade do composto, promovida pela microbiota que se desenvolve durante o processo de compostagem, qualquer estratégia alternativa para sua pasteurização deve levar em conta a presença desses microrganismos, ou para promover o seu desenvolvimento ou pelo menos para mantê-los no composto em níveis mínimos para cumprir principalmente a sua função de manter um equilíbrio da população microbiana, de forma a garantir a proteção do cogumelo contra patógenos e contaminantes.

2.2.1.1 Microbiota da compostagem

Os primeiros decompositores criam um ambiente físico-químico para os organismos secundários que não podem degradar o substrato inicial, uma vez que metabólitos produzidos por um grupo podem ser utilizados por outro (Davis et al., 1992; Golueke, 1992). A elevação da temperatura inicial favorece uma rápida transição da microbiota mesófila para a microbiota termófila, resultando

numa sucessão microbiana que caracteriza o processo de compostagem (Ryckeboer et al., 2003). A microbiota inicial, ao iniciar seu metabolismo, libera calor e, conseqüentemente, aumenta a temperatura, resultando, com isso na inibição de seu próprio desenvolvimento, pela inativação de enzimas e limitação de oxigênio (McKinley & Vestal, 1984). Por outro lado, altas temperaturas ajudam a degradação de matéria orgânica recalcitrante como a lignocelulose (Tuomela et al., 2000) e eliminação de organismos patogênicos e alergênicos (Ryckeboer et al., 2002).

2.2.1.2 Bactérias presentes na compostagem

Grandes quantidades de bactérias podem ser isoladas de diferentes fases da compostagem, sendo os gêneros mais comuns: *Pseudomonas*, *Klebsiella* e *Bacillus* (Nakasaki et al., 1985; Strom, 1985).

Na fase termófila as espécies de *Bacillus* como *B. Subtilis* e *B. circulans*, são as mais comuns, sendo encontradas em mais de 87% das colônias isoladas durante a compostagem nessa fase. Muitas espécies termófilas são isoladas do composto em temperaturas de 65 até 82°C (Beffa et al., 1996). Pela sua presença e predominância, essas bactérias provavelmente desempenham um importante papel na qualidade final do composto.

Também são encontradas na fase termófila, actinobactérias, as quais são abundantes e perceptíveis na superfície do composto. Assim, as actinobactérias são importantes agentes que degradam lignocelulose durante o ápice de temperatura, embora sua habilidade para degradar celulose e lignina não seja tão alta como a dos fungos (Tiquia, 2002). As comunidades de actinobactérias aumentam em diversidade durante o processo de maturação do composto (Peters et al., 2000). Os gêneros de actinobactérias termófilas que já foram isoladas do composto incluem *Nocardia*, *Streptomyces*, *Thermoactinomyces* e *Micromonospora* (Strom, 1985). Esses microrganismos

são apontados também como importantes agentes do condicionamento do composto, provavelmente porque utilizam o excesso de amônia do composto ao final da Fase I, transformando-a em proteína microbiana, a qual será utilizada posteriormente pelo cogumelo para a sua nutrição (Chang & Miles, 2004). Provavelmente, diferentes metabólitos e, em especial, vitaminas produzidos por esses microrganismos, que são importantes para o crescimento micelial e frutificação do fungo, também desempenham papel estratégico para a obtenção de um composto de excelente qualidade para o cultivo do cogumelo.

2.2.1.3 Fungos presentes durante a compostagem

A temperatura, pH, fontes de carbono, nitrogênio e demais nutrientes são importantes fatores que afetam o crescimento dos fungos. A maioria dos fungos é constituída de espécies mesófilas, as quais crescem entre 5 e 37°C, tendo como temperatura ótima entre 25° e 30°C. No entanto, quando os microrganismos iniciam a degradação do composto, ocorre um aumento da temperatura e somente um pequeno grupo de fungos termofílicos permanecerá no processo de sucessão microbiana. Em compostos para cogumelos, fungos termofílicos são responsáveis pela degradação da lignocelulose, gerando produtos de cadeias menores, as quais são necessárias para o crescimento dos fungos comestíveis (Sharma, 1989).

Diferentes espécies de fungos foram isolados a partir do composto para cultivo do *A. bisporus*: *Aspergillus fumigatus*, *Chaetomonium thermophilum*, *Humicola grisea*, *Humicola insolens*, *Humicola lanuginosas*, *Mucor pusilus*, *Talaromyces duponti* e *Scytalidium thermophilum* (Straatsma et al., 1995; Fermor et al., 2000). Dentre esses, o *Scytalidium thermophilum* foi apontado como um dos mais importantes para tornar o composto mais favorável ao crescimento e frutificação do cogumelo *A. bisporus* (Straatsma et al., 1994a e 1994b).

A concentração de nitrogênio é um fator muito importante para o crescimento dos fungos termófilos. Durante o processo de compostagem, não se deseja que todo o conteúdo de lignina e celulose seja degradado pelos microrganismos termófilos, porque esses polímeros serão utilizados pelo cogumelo durante o seu cultivo. Entretanto, é desejável que haja uma quebra parcial dos mesmos para promover o seu próprio crescimento e colonização do substrato, como também para facilitar a nutrição do cogumelo, uma vez que os cogumelos *Agaricus* não são eficientes degradadores de lignina, dependendo normalmente da atuação dos microrganismos termofílicos durante a compostagem para a quebra efetiva dessa substância.

2.2.1.4 Microrganismos assimiladores de amônia

O amoníaco (NH_3) é um produto da degradação biológica de compostos nitrogenados e é o principal componente da liberação de odores durante o processo de compostagem, e também um importante componente do ciclo do nitrogênio no composto. Sua volatilização na compostagem resulta em perda de nitrogênio que poderia ser utilizado pelos microrganismos presentes (McCubbin et al., 2002). Portanto, essa substância constitui-se na maior fonte de nitrogênio para bactérias presentes no composto, cuja assimilação envolve captação de íons e incorporação do material orgânico para a produção da glutamina e glutamato. Normalmente, parte do amoníaco dissolve-se na água formando amônia (solução aquosa de amoníaco) em uma forma ionizada (NH_4^+) em pH neutro e em uma forma não ionizada (NH_3) com pH elevado (Aneja et al., 2001), o que impede a sua volatilização. O amônio assim formado (NH_4^+) e retido na água, por um lado representa menor perda de nitrogênio, mas por outro lado, se persistir até o final da Fase II da compostagem, representa a inibição tanto de *A. bisporus* como de *A. brasiliensis*, devido ao seu efeito extremamente tóxico ao micélio do fungo. Portanto, uma das características mais desejáveis do composto de cultivo desses cogumelos é a ausência de amônia no final da Fase II. Por isso, as Fases I e II

são associadas de forma que a alta concentração de amônio presente no composto ao final da primeira fase seja absorvida e transformada em proteína microbiana durante a Fase II. Desta forma, o nitrogênio é transformado de uma forma tóxica (amônio) para uma forma não tóxica e nutritiva para o cogumelo (proteína microbiana). Dessa importante associação vem a grande importância dos microrganismos assimiladores de amônia.

Muitas espécies de microrganismos são conhecidas por assimilar NH_3 pela glutamina sintetase, porém, detalhes da distribuição e função da assimilação de amônia por microrganismos no processo de compostagem não estão bem claros (Patriarca et al., 2002).

O *Bacillus subtilis* utiliza a glutamina como principal fonte de nitrogênio, entretanto, na ausência da glutamina, o amônio (NH_4^+) pode ser utilizado como fonte alternativa. O uso de amônio envolve adaptações para a síntese de glutamina pela glutamina sintetase a partir do gás amônio e a reciclagem do glutamato pela glutamato sintetase (Detsch & Stülke, 2003). Por isso, o ácido glutâmico e a glutamina desempenham papéis fundamentais na assimilação de amônio, que pode ser incorporado em ácido glutâmico pela rota da glutamato desidrogenase (Kanamori et al., 1987).

Em meio rico em amônio, muitos microrganismos o assimilam pela glutamato desidrogenase, enquanto que em condições de baixas concentrações de amônio ou outras fontes de nitrogênio como nitrato ou nitrogênio molecular, a assimilação pela glutamina sintetase/glutamato sintetase é mais eficiente, em função do menor gasto de energia por esse sistema (Kanamori et al., 1987). Os mesmos autores relataram que muitos microrganismos adaptam a limitação de amônio pela utilização da rota glutamina sintetase/glutamato sintetase e repressão da rota glutamato desidrogenase. Em algumas espécies de *Bacillus*, algumas anomalias são encontradas, como em *Bacillus licheniformis* e *Bacillus megaterium*, que utilizam a rota da glutamato desidrogenase em meio rico em

amônio e a glutamina sintetase/glutamato sintetase durante a limitação de amonio, enquanto que *Bacillus subtilis* assimila amônio pela rota glutamina sintetase/glutamato sintetase até mesmo em meio rico nessa substância.

2.2.2 Inoculação do composto e corrida micelial (Fase III)

A Fase III, que corresponde à inoculação e incubação do substrato, deve ocorrer logo após o final da Fase II, evitando-se que o composto fique armazenado antes da inoculação com o cogumelo, reduzindo assim a possibilidade de contaminação por microrganismos oportunistas. Quando a Fase II é finalizada, o sistema de ventilação deve ser desligado e a câmara aberta para que a temperatura do composto equilibre-se com a temperatura ambiente. Em fazendas de compostagem, onde são produzidas grandes quantidades, o composto é retirado do túnel por meio de um sistema mecanizado, no qual o composto é conduzido em esteiras, sendo a inoculação feita durante esse processo, facilitando a distribuição do inoculante no composto, que pode ser ensacado ou transferido para outra câmara para a etapa de colonização. No Brasil, é comum que o composto seja distribuído em sacolas, mas em países onde o cultivo de *A. bisporus* assume o “status” de uma indústria de cogumelos, o composto é transportado das fazendas de compostagem para as fazendas de cultivo, já colonizado, em caminhões, dos quais o composto é transferido para as prateleiras onde será feito o cultivo em sistema de cama.

No caso do *A. brasiliensis*, utiliza-se na maioria dos casos, um sistema bastante rústico, no qual o composto é retirado da câmara e distribuído em sacolas de lixo com capacidade para 10 kg e inoculado com 100 a 200g de “semente”. Os sacos assim preparados são transferidos para estufas protegidas da incidência direta de luz solar, normalmente construídos em local sombreado, para evitar temperaturas acima de 30° C. Nestas estufas geralmente não há grande necessidade de circulação de ar, uma vez que o fungo tolera

concentrações de CO₂ de até 3000 ppm durante o seu crescimento micelial. Geralmente, um composto de boa qualidade inoculado com linhagem de boas características genéticas apresenta-se completamente colonizado num período de 15 a 20 dias.

2.2.3 Indução da frutificação (Fase IV)

A Fase IV, que consiste na indução da frutificação, é uma das etapas determinantes do sucesso do cultivo de cogumelos, de forma que, um ótimo composto pode apresentar baixa produtividade se não houver um manejo adequado na indução da frutificação. A indução da frutificação pode variar dependendo da espécie de cogumelo. Para espécies como *Lentinula edodes* e algumas do gênero *Pleurotus*, temperaturas menores do que a temperatura de colonização do substrato são essenciais para induzir a formação de primórdios. Para *A. bisporus*, a redução da temperatura é essencial; entretanto, é necessário utilizar também uma camada de cobertura sobre o composto colonizado. Além disso, é importante também um manejo das condições atmosféricas da câmara de cultivo, de forma a reduzir a concentração de CO₂ para níveis iguais ou menores do que 1000 ppm. Para o *A. brasiliensis*, a utilização de uma camada de cobertura é igualmente necessária, assim, como maior ventilação no interior da câmara durante o ciclo de produção, ajustando a temperatura para 25 a 28°C. Temperaturas abaixo de 25° C podem diminuir a velocidade de crescimento dos cogumelos e temperaturas abaixo de 20° C podem inibir a formação de primórdios, reduzindo drasticamente a produção. Por isso, recomenda-se, no Brasil, cultivar esse cogumelo durante o período primavera-verão, pelo menos nas regiões onde o inverno apresenta quedas mais acentuadas da temperatura, a menos que o produtor utilize câmaras de cultivo com ambiente completamente controlado.

Apesar de alguns autores considerarem a cobertura do composto um evento que antecede a indução da frutificação (Rinker, 1993), para os cogumelos *Agaricus*, a cobertura do composto colonizado deve ser considerada como parte do processo de indução da frutificação, uma vez que sem a camada de cobertura, a frutificação praticamente não acontece. Assim que o composto apresenta-se completamente colonizado, o mesmo é coberto com uma camada de, aproximadamente, cinco centímetros de terra de horizonte B (no caso do Brasil) ou turfa de musgo (América do Norte e Europa) (Colauto & Eira, 1998). Segundo os mesmos autores, alguns microrganismos presentes na terra podem prejudicar o cultivo do cogumelo *A. bisporus*, como *Penicillium sp.*, *Aspergillus sp.*, *Trichoderma sp.* e *Pseudomonas tolaasii*. Por isso, é essencial conhecer a procedência da terra, evitando assim a contaminação por vírus ou outros microrganismos indesejáveis. Porém, alguns microrganismos podem apresentar um efeito benéfico para o cultivo do cogumelo. Há relatos de que a formação de corpos de frutificação em *Agaricus bisporus* depende da presença da bactéria *Pseudomonas putida*. O exato mecanismo não foi determinado; porém, foi sugerido que o micélio do fungo produz compostos de auto-inibição que são depois removidos pela bactéria (Rainey et al., 1990). Posteriormente verificou-se também que *Pseudomonas putida* promove o crescimento micelial e formação de corpos de frutificação em *Pleurotus ostreatus* (Cho et al., 2003).

Silva et al. (2007) isolaram diferentes espécies de bactérias da terra de cobertura utilizada para o cultivo do cogumelo *A. brasiliensis*, dentre elas algumas potencialmente patogênicas como algumas dos gênero *Shigella*, *Yersinia* e *Salmonella*. Segundo os autores, mesmo quando a terra foi submetida a diferentes tratamentos de desinfestação como formol ou vapor d'água, essas bactérias foram encontradas. Os autores isolaram algumas espécies do gênero *Pseudomonas*, tais como *P. fluorescens*, *Pseudomonas (Burkholderia) cepacia* e *P. aeruginosa*. Entretanto, a espécie *P. putida*, relatada como importante na

indução da frutificação do cogumelo *A. bisporus*, não foi isolada a partir de nenhum dos solos estudados.

Considerando que não existem estudos sobre a importância das bactérias do solo sobre a indução do cogumelo *A. brasiliensis*, poderia ser muito importante a condução de ensaios com as espécies encontradas normalmente no solo em cultura pura, as quais poderiam ser inoculadas na terra de cobertura. Entretanto, considerando que o solo possui um grande número de espécies e grande população microbiana, isso não é uma tarefa fácil, uma vez que os processos biológicos no solo envolvem interações sinérgicas ou antagônicas de diferentes espécies de microrganismos. Além disso, diferentes fatores físico-químicos poderiam estar também associados, influenciando a indução da formação de primórdios do cogumelo. Talvez por isso, mesmo para a espécie *A. bisporus*, cuja indução da frutificação é influenciada pela presença de *Pseudomonas putida*, não existem relatos em cultivos comerciais acerca da inoculação da camada de cobertura com essa bactéria. Normalmente pressupõe-se que a mesma esteja presente naturalmente na turfa de musgo, que é utilizada na grande maioria dos cultivos comerciais da Europa e América do Norte.

Além do estresse provocado, principalmente com as mudanças das condições de aeração sobre o composto, e que provavelmente desempenha papel fundamental na indução da frutificação, a camada de cobertura desempenha outras funções físicas importantes para o desenvolvimento do corpo de frutificação: uniformizar a superfície, regular a temperatura entre o substrato e o ambiente, reter água para evitar o ressecamento do substrato, fornecer água para o basidiocarpo, permitir trocas gasosas e funcionar como barreira de proteção contra microrganismos competidores ou patogênicos (Colauto, 1998).

Depois que a camada de cobertura encontra-se completamente colonizada, é importante alterar as condições de aeração e temperatura, principalmente

quando se trata do *A. bisporus*, que requer uma redução da temperatura de 25° C para 17 a 19° C, que é assim mantida durante todo o cultivo (Rinker, 1993).

Quando a temperatura é reduzida, o *A. bisporus* apresenta a formação de todos os primórdios praticamente ao mesmo tempo, de forma que a temperatura poderia ser novamente elevada após isso. Entretanto, normalmente, a temperatura é mantida em no máximo 19° C, provavelmente para evitar o surgimento de pragas e doenças que normalmente desenvolvem-se melhor em temperaturas mais elevadas.

Para o *A. brasiliensis*, não é comum a redução da temperatura para a indução dos primórdios. Normalmente mantém-se a mesma temperatura utilizada durante a colonização do substrato e da camada de cobertura, recomendando-se, de modo geral, a manutenção da mesma entre 25 e 28° C. Entretanto, de acordo com Kopytowski Filho et al. (2006), a temperatura deve ser reduzida para 19° C por um período de quatro dias e, então, elevada novamente para 25° C e assim mantida durante o cultivo. Apesar de ser uma informação interessante, não há ainda relatos científicos confirmando que a redução da temperatura apresenta um efeito positivo sobre a indução da frutificação do *A. brasiliensis*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local de realização dos experimentos

O experimento foi realizado no Setor de Microbiologia/Laboratório de Cogumelos Comestíveis do Departamento de Biologia/Universidade Federal de Lavras (UFLA), no período de Junho de 2008 a Janeiro de 2009.

A cidade está localizada na região sul do estado de Minas Gerais, a 21°14'30" LS e 45°10'00" LW. Seu clima é classificado como tropical de altitude; o relevo dominante pode ser caracterizado como ondulado, sendo a altitude média de 900 metros. As temperaturas médias do período de cultivo variaram entre 16 e 28° C (mínima e máxima, respectivamente).

3.2 Metodologia geral de preparo do composto, indução da frutificação e cultivo do cogumelo *A. brasiliensis*

3.2.1 Processo de compostagem

A metodologia de compostagem em todos os experimentos foi a compostagem longa seguida de pasteurização a vapor.

Para seu preparo foi utilizado como matéria prima, bagaço de cana-de-açúcar e feno de capim *coast-cross* na proporção de 1:1 em camadas alternadas, acrescentado água em quantidade suficiente para que o composto atinja umidade entre 65 a 75 %. O composto foi revolvido a cada dois dias, adicionando água sempre que necessário. Na quarta reviragem foi suplementado com 10% de farelo de trigo, 2% de calcário, 2% de gesso agrícola e 1,7% de uréia, tendo como base para o cálculo da suplementação o peso total do substrato base desidratado.

As reviragens foram realizadas normalmente nas segundas, quartas e sextas-feiras por um período de quatro semanas. Depois o composto foi acondicionado em túnel de pasteurização a vapor. O processo foi conduzido em duas etapas de 12 horas, contadas a partir do início de emissão de vapor sob o composto. Após

a primeira etapa, o composto foi retirado e homogeneizado antes de ser submetido à segunda etapa de pasteurização.

3.2.2 Preparo do inóculo de *Agaricus brasiliensis*.

Simultaneamente ao início do processo de compostagem, preparou-se o inoculante do *Agaricus brasiliensis*. Este inóculo foi preparado com a linhagem CS1 da coleção do Laboratório de Cogumelos Comestíveis da UFLA. A cultura foi reativada e mantida em meio de cultura BDA (batata dextrose agar), incubado em câmara BOD a 26° C. Essa cultura foi considerada a matriz primária para o preparo do inoculante do *A. brasiliensis*.

A matriz secundária foi preparada em substrato contendo 90% de arroz em casca e 10% de farelo de trigo, suplementado com 2% de gesso agrícola e 2% de calcário calcítico, tendo como base o peso total da mistura dos ingredientes principais (arroz em casca e farelo de trigo).

Primeiramente o arroz foi pré-cozido em água fervente por 20 minutos, como pré-tratamento de desinfestação e para absorver umidade. Paralelamente o farelo de trigo foi umedecido com mesmo volume em água e autoclavado por 30 minutos. Em seguida, foram misturados e acrescentados os suplementos, sendo então acondicionados em frascos com capacidade de 200 mL, tampados com algodão e autoclavados por 1 hora duas vezes com intervalo de 24 horas. Os frascos, após atingirem temperatura ambiente, foram inoculados em câmara de fluxo laminar com fragmentos do meio BDA colonizados por *A. brasiliensis*.

3.2.3 Inoculação do composto com *A. brasiliensis*

Após o término da pasteurização do composto, esperou-se 24 horas para o mesmo atingir a temperatura ambiente, sendo então retirado do túnel, homogeneizado e acondicionado em sacolas plásticas com capacidade para 10 kg de composto e inoculado com aproximadamente 3% do inoculante sobre o

composto e misturados. As sacolas foram fechadas e incubadas em temperatura ambiente. No momento que ocorreu a completa colonização das sacolas, aproximadamente 30 dias após a inoculação, foram retiradas amostras aleatórias do composto, que foram depois pesadas e levadas para estufa de ventilação forçada a 65°C para determinar o teor de umidade do substrato colonizado, com objetivo de calcular posteriormente a eficiência biológica de cada tratamento.

3.2.4 Indução da frutificação e colheita dos cogumelos

Para indução da frutificação, 4 kg do composto colonizado foram acomodados em vasos de polietileno de 20L. Após o nivelamento do composto, o mesmo foi coberto com cinco centímetros da camada de cobertura previamente preparada. A terra utilizada para a cobertura do composto foi o Latossolo Vermelho distroférico de horizonte B adicionado de 20% (v/v) de carvão vegetal moído, com pH ajustado para 7,0. O ajuste do pH foi feito adicionando-se calcário calcítico, com base na análise do solo, no momento do acréscimo do carvão vegetal e incubação por 15 dias.

Os vasos assim preparados foram incubados na sala de cultivo de cogumelos à temperatura ambiente e a camada de cobertura foi mantida úmida durante todo o período de cultivo, com regas periódicas. A partir do momento em que a camada de cobertura tornou-se completamente colonizada, o exaustor da casa de cultivo foi ligado por um período de aproximadamente duas horas pela manhã e ao final da tarde, para garantir maior aeração do ambiente. O piso foi molhado quatro vezes ao dia com objetivo de manter a umidade relativa do ar acima de 70%.

A colheita iniciou-se aproximadamente 25 dias após a indução da frutificação. Os cogumelos foram colhidos sempre que apresentaram tamanho máximo e antes de iniciar a abertura do píleo, quando as paredes laterais do mesmo apresentavam-se paralelas ao estipe. O excesso de terra de cada

cogumelo foi removido com auxílio de um pincel antes que fosse feita a pesagem.

3.2.5 Cálculo da eficiência biológica e produtividade

Foram retiradas amostras aleatórias do composto colonizado de cada tratamento em três repetições de aproximadamente 200 gramas, acomodadas em sacos de papel, pesadas e levadas à estufa de ventilação forçada à temperatura de 65°C até a obtenção de peso constante. A eficiência biológica de cada tratamento foi determinada considerando a massa de cogumelos frescos colhidos pelo peso do composto desidratado, em percentagem ($EB = [massa \text{ de cogumelos frescos} / massa \text{ de composto desidratado}] \times 100$). A produtividade foi calculada de forma semelhante porém, considerando-se a produção de cogumelos frescos por composto úmido ($P = [massa \text{ de cogumelos frescos} / massa \text{ de composto úmido}] \times 100$).

3.2.6 Determinação do crescimento micelial

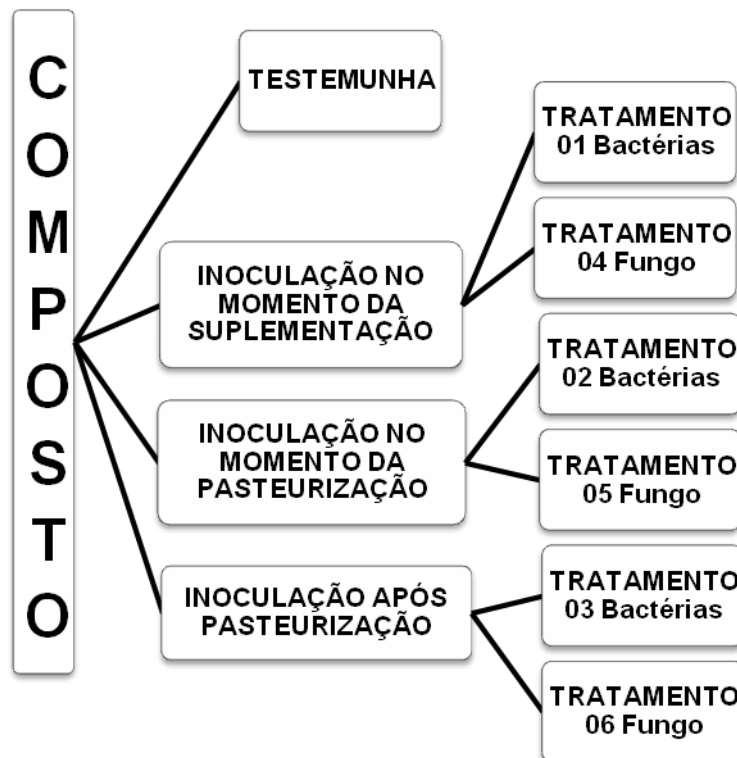
Para a determinação do crescimento micelial, foram utilizados dois quilos do composto para cada tratamento, acomodados em sacos plásticos transparentes e inoculados com o *A. brasiliensis* somente na superfície superior do composto. Após 16 dias, foi avaliado o crescimento micelial em cm/dia, tomando-se 6 medidas em pontos equidistantes em cada saco, as quais foram convertidas em uma média.

3.3 Descrição dos experimentos

3.3.1 EXPERIMENTO 1 Inoculação dos microrganismos em diferentes etapas do processo de compostagem.

Para o experimento de inoculação do composto foram utilizados dois tipos de inoculantes microbianos. O primeiro inoculante foi constituído de

apenas uma espécie de fungo (*Scytalidium thermophilum*) e o segundo foi constituído de duas espécies de bactérias (*Alcaligenes faecalis* *Pseudomonas* sp e *Bacillus subtilis*). Os tratamentos consistiram na inoculação dos coquetéis microbianos separadamente em diferentes etapas da compostagem, ficando assim estabelecidos os tratamentos:



Todas as pilhas de composto foram montadas no mesmo dia, de forma a se utilizar as mesmas matérias-primas, com o intuito de minimizar variações na composição da mesma.

O fungo *Scytalidium thermophilum* foi reativado em ágar aveia a 40°C, para multiplicação do inóculo. Os esporos produzidos foram ressuspensos com adição de água nas placas colonizadas e raspagem da cultura com uma lâmina de vidro estéril. A concentração de esporos na suspensão foi determinada por

contagem em câmara de Neubauer. Em seguida foi preparada uma diluição em 20L de água de forma que, após a distribuição no composto, fosse obtida uma concentração final de 10^6 esporos por grama de composto desidratado.

As bactérias foram reativadas em caldo nutriente e depois cultivadas em ágar nutriente, para a obtenção de culturas puras e realização do teste de coloração de Gram. Para se determinar o tempo de incubação para a obtenção da massa de células necessárias e o volume de cada cultura para cada tratamento foi obtida a curva de crescimento de cada espécie de bactéria em frascos “Side Arm” com leituras em colorímetro a 540nm.

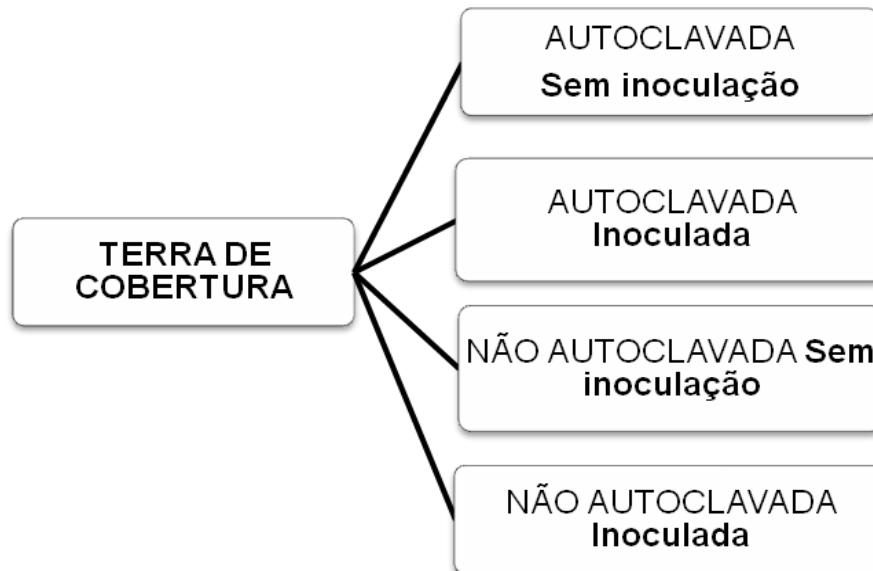
As culturas de bactérias foram diluídas em 20 litros de água, de forma a obter-se uma concentração de 10^6 células por grama de composto desidratado para cada espécie de bactéria e então, distribuídas uniformemente na superfície do composto, utilizando um regador.

3.3.2 EXPERIMENTO 2 Desinfestação e inoculação da camada de cobertura com as bactérias *Alcaligenes faecalis* e *Bacillus subtilis*

Neste experimento, o composto colonizado foi primeiramente fragmentado e homogeneizado, e depois acomodado em vasos de polietileno de 20L, para receber posteriormente a camada de cobertura, preparada conforme descrito no item 3.2.4.

Os tratamentos consistiram na inoculação das mesmas espécies de bactérias utilizadas no experimento I (*Alcaligenes faecalis* e *Bacillus subtilis*) na camada de cobertura, no momento em que a mesma foi disposta sobre o composto. Para isto, utilizou-se o material de cobertura autoclavado por duas horas a 121° C duas vezes, com intervalo de 24 horas e também o mesmo material não autoclavado. Como controles, foram utilizados os mesmos materiais (autoclavado e não autoclavado) sem a inoculação com as bactérias. Com isso foi possível comparar o efeito da inoculação com as bactérias em terra

autoclavada e não autoclavada, bem como observar o efeito da autoclavagem da terra de cobertura sobre a frutificação do cogumelo *A. brasiliensis*. Desta forma, os tratamentos da terra de cobertura ficaram assim estabelecidos:



As culturas bacterianas foram preparadas conforme descrito anteriormente, utilizando-se também 10^6 células por grama de solo desidratado. O inóculo foi diluído em dois litros de água e a inoculação realizada com auxílio de um regador. A inoculação ocorreu logo após a disposição da camada de cobertura sobre o composto. Os vasos não tratados foram irrigados somente com água, no mesmo volume (2L).

3.3.3 Delineamento experimental e análise estatística

Para cada tratamento de inoculação do composto foram utilizadas oito repetições para avaliação da produtividade e eficiência biológica, sendo cada parcela constituída por três vasos, com um total de 56 parcelas experimentais, em delineamento de blocos casualizados, submetidos ao teste de Scott-Knot a 5% de probabilidade. Para o experimento de avaliação do crescimento micelial, foram utilizadas 14 repetições, em blocos casualizados, sendo cada saco considerado uma repetição.

Para o tratamento de inoculação na camada de cobertura foram utilizadas quatro repetições para avaliação da produtividade e eficiência biológica, sendo cada parcela constituída por três vasos, com um total de 16 parcelas, submetidas ao teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. As análises de variância e os testes de média foram realizados com o auxílio do programa computacional SISVAR (Ferreira, 2000).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 EXPERIMENTO 1 Inoculação dos microrganismos em diferentes etapas do processamento de compostagem

4.1.1 Umidade no composto colonizado em cada tratamento

A umidade do composto ao final do processo variou para alguns tratamentos, conforme descrito na tabela 1. Durante as reviragens do composto, sempre que necessário, adicionou-se água para manter a umidade do mesmo entre 65 e 70%. Apesar da tentativa de se manter a mesma umidade para todos os tratamentos, na prática isso é muito difícil, uma vez que não é possível avaliar a umidade de forma precisa e determinar a quantidade de água exata a ser adicionada. Por isso é natural que haja uma variação no teor de umidade entre os tratamentos.

Em função dessas variações, é extremamente importante que a produção de cogumelos seja expressa em termos de eficiência biológica, que é determinada em função do peso do composto desidratado. Apesar da produtividade parecer mais interessante e facilmente compreendida pelos produtores, a eficiência biológica é defendida como melhor parâmetro científico de avaliação, exatamente pelo fato de considerar a produção de cogumelos em função do peso do composto desidratado, o que permite comparar a eficiência de conversão do substrato para diferentes tratamentos. Quando se utiliza produtividade, os dados podem ser de mais difícil interpretação, uma vez que os substratos obtidos podem apresentar diferentes teores de umidade, como foi observado no presente trabalho, e, conseqüentemente, diferentes teores de matéria seca.

TABELA 1 Teor de umidade do composto colonizado nos diferentes tratamentos de inoculação.

Tratamentos de inoculação*	Umidade
T1 – Bactérias na suplementação	69,23%.
T2 – Bactérias na pasteurização	75,20%.
T3 – Bactérias após pasteurização	67,27%.
T4 – Fungo na suplementação	64,00%.
T5 – Fungo na pasteurização	67,16%.
T6 – Fungo após pasteurização	71,43%
Testemunha	64,29%.

4.1.2 Produtividade e eficiência biológica do cogumelo *A. brasiliensis* em função da inoculação do composto com bactérias e *S. thermophilum*

Os resultados de crescimento micelial, produtividade, eficiência biológica e peso médio dos cogumelos colhidos nos diferentes tratamentos de inoculação do composto de cultivo do cogumelo *A. brasiliensis* com o coquetel bacteriano, apresentaram diferença significativa em relação à testemunha pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade (Tabela 2).

Considerando os resultados de crescimento micelial, o tratamento T2 (inoculação no momento da pasteurização) foi superior aos demais, seguido pelo tratamento T1 (inoculação no momento da suplementação).

As diferenças de produtividade entre os tratamentos não foram significativas. Entretanto, quando a produção foi comparada em termos de

eficiência biológica, os tratamentos T1 e T2 foram superiores ao tratamento T3 e à testemunha (Tabela 2).

Os resultados de crescimento micelial e eficiência biológica indicam que a inoculação das bactérias deve ser feita no momento da suplementação ou antes da pasteurização do composto. Considerando que não houve diferença significativa entre os resultados de eficiência biológica entre T1 e T2, pode ser que a inoculação no momento da suplementação seja a mais indicada, pelo fato de se poder combinar a inoculação e a suplementação, economizando assim mão-de-obra e tempo. É preciso considerar, entretanto, que a velocidade de crescimento micelial foi significativamente superior no tratamento T2, o que pode significar maior velocidade de colonização do composto.

TABELA 2 Resultados de crescimento micelial, produtividade, eficiência biológica e peso médio dos cogumelos produzidos nos diferentes tratamentos de inoculação do composto de cultivo de *A. brasiliensis* com bactérias. T1- momento da suplementação; T2- momento da pasteurização; T3- após a pasteurização. EB- Eficiência biológica.

TRATAMENTOS ¹	crescimento micelial (mm/dia)	produtividade (%)	EB (%)	Peso (g)
T2	1,25 A	7,90 A	31,86 A	31,40 A
T1	0,79 B	8,29 A	26,96 A	29,71 A
T3	0,52 C	6,36 A	19,61 B	26,62 A
Testemunha	0,47 C	7,49 A	20,97 B	29,98 A
CV	27,41 %	29,92 %	30,32 %	26,60 %

¹As médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si a nível de 5% de probabilidade de acordo com o teste de Scott-Knott.

A importância da presença de bactérias introduzidas ou naturalmente presentes no composto de cultivo de cogumelos vem sendo relatada há bastante tempo. Reddy & Patrick (1990) estudaram o efeito de bactérias associadas ao

composto de *Agaricus bisporus* e verificaram que algumas bactérias como a *Pseudomonas putida*, associadas ao fungo, estimulam o desenvolvimento do micélio do cogumelo.

Para os tratamentos que receberam inoculação com o fungo *S. thermophilum*, observou-se uma diferença significativa apenas para o crescimento micelial do *A. brasiliensis* no composto (Tabela 3). Os tratamentos T4 (inoculação no momento da suplementação) e T6 (inoculação após a pasteurização) apresentaram maior velocidade de crescimento micelial quando comparados ao tratamento T5 e à testemunha. A menor velocidade de crescimento micelial no composto inoculado com *S. thermophilum* no momento da pasteurização (T5) pode estar relacionada à eliminação dos propágulos do fungo pela pasteurização a vapor, que é considerada um processo severo de pasteurização, o qual atinge temperaturas acima de 80°C. É possível que a inoculação, no momento da suplementação do composto, permita o crescimento do fungo no composto, aumentando a sua população de tal forma que a pasteurização não consiga eliminar totalmente, permitindo assim que o fungo permaneça até o final. Da mesma forma, com a inoculação após a pasteurização, o fungo inoculado pode trazer também algum benefício para o crescimento micelial do *A. brasiliensis*. Entretanto, sendo um fungo termofílico, o crescimento do *S. thermophilum* passaria a ser limitado em função da temperatura de incubação do composto ser menor do que a temperatura ótima para o seu crescimento.

TABELA 3 Resultados de crescimento micelial, produtividade, eficiência biológica e peso médio dos cogumelos produzidos nos diferentes tratamentos de inoculação do composto de cultivo de *A. brasiliensis* com *S. thermophilum*. T4- momento da suplementação; T5- momento da pasteurização; T6- após a pasteurização. EB- Eficiência biológica.

TRATAMENTOS ¹	crescimento micelial (mm/dia)	produtividade (%)	EB (%)	Peso (%)
T4	0,95 A	7,85 A	21,91 A	25,48 A
T6	0,81 A	5,55 A	18,97 A	26,82 A
T5	0,46 B	7,65 A	23,31 A	28,68 A
Testemunha	0,47 B	7,49 A	20,97 A	29,98 A
CV	27,41%	31,91 %	30,82 %	19,17 %

¹As médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si a nível de 5% de probabilidade de acordo com o teste de Scott-Knott.

Siqueira (2006) avaliou a utilização do *S. thermophilum* e o coquetel bacteriano durante a compostagem para cultivo do *A. brasiliensis*. Entretanto, ele fez a inoculação quatro vezes durante o processo (na suplementação, na pasteurização, entre as duas etapas de pasteurização e após pasteurização). Provavelmente, essa inoculação, em várias etapas da compostagem, permitiu que os microrganismos inoculados permanecessem no composto até o final da compostagem e pasteurização do composto. Além da maior velocidade de crescimento micelial, o autor observou também maior produtividade e maior eficiência biológica em relação ao composto não inoculado.

Os resultados obtidos por Siqueira (2006) demonstraram claramente o efeito positivo da inoculação do composto com microrganismos. Entretanto, o autor não testou se a inoculação do composto poderia ser feita em apenas uma etapa em vez de quatro. O ideal seria que se fizesse apenas uma etapa de

inoculação de forma a facilitar o trabalho e reduzir os custos para o produtor, que teria que adquirir o coquetel microbiano de laboratórios especializados.

Por isso, neste trabalho foi testada a inoculação dos microrganismos em diferentes etapas, com o objetivo de se estabelecer um único momento de inoculação. Era esperado que uma inoculação mais precoce permitisse uma maior ação das bactérias, mas, por outro lado, não se sabia também se as elevadas temperaturas do início da compostagem, que chegam a mais de 70° C e da pasteurização a vapor, que chegam a mais de 80° C, poderiam eliminar grande parte da população bacteriana inoculada. Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que a inoculação de bactérias na suplementação ou na pasteurização poderão ser utilizados sem comprometer a eficiência biológica do composto.

No trabalho realizado por Siqueira (2006), além da maior velocidade de crescimento micelial, observou-se que a inoculação do composto com *S. thermophilum* apresentou o mesmo efeito observado na inoculação com bactérias. Entretanto, é importante ressaltar novamente que o autor inoculou o fungo quatro vezes, assim como foi feito com as bactérias. Isso pode ser uma indicação de que o isolado de *S. thermophilum* seja mais sensível que as bactérias às elevadas temperaturas observadas durante a compostagem e a pasteurização do que as bactérias utilizadas neste trabalho. Desta forma, pode ser que a inoculação do *S. thermophilum* deva ser feita em pelo menos duas etapas durante o processo de compostagem, ou utilizar uma maior concentração de esporos do que a foi utilizada neste trabalho, de forma a intensificar o crescimento do fungo antes da pasteurização.

Embora não tenham sido observadas diferenças significativas nos resultados de produtividade e eficiência biológica com a inoculação do composto com o *S. thermophilum*, a maior velocidade de crescimento micelial nos tratamentos T4 e T6 indicam a possibilidade de obtenção do composto

colonizado em menor tempo, o que favorece a redução do tempo necessário para completar a cadeia de produção. Além disso, essa diferença no crescimento micelial é também um indicativo de um efeito positivo da utilização do *S. thermophilum* como aditivo no processo de compostagem.

Vijay et al. (1999), inoculando diferentes fungos termófilos no processo de compostagem para a produção de *A. bisporus*, alegou que a inoculação com o fungo *S. thermophilum* torna o substrato mais produtivo, o que não ocorreu no presente estudo com o *A. brasiliensis*. Além disso, segundo os autores, com a inoculação do composto com o *S. thermophilum*, ocorre menor perda de nitrogênio na forma de amônia no decorrer da compostagem e o composto sofre menor aquecimento, quando comparado com o composto sem inoculação.

Segundo Peters et al. (2000), a qualidade do composto está diretamente ligada à composição e sucessão das comunidades microbianas durante o processo de compostagem. O presente trabalho abordou um número bastante reduzido de espécies microbianas, quando provavelmente um maior número de espécies bacterianas, incluindo actinobactérias, além de fungos, podem apresentar grande potencial como aditivos no processo de compostagem para o cultivo de cogumelos. Por isso, novos estudos deverão ser conduzidos para avaliar a combinação de diferentes bactérias, actinobactérias e *S. thermophilum*, além da necessidade de se definir as concentrações ideais desses microrganismos no momento da inoculação. Além da combinação de diferentes espécies, estudos de sucessão microbiana deverão ser também conduzidos para conhecer quais espécies dominam o processo, persistindo até o final, e quais poderiam apresentar maior potencial de utilização. Para isso serão necessários ensaios de inoculação com cada espécie separadamente.

A produtividade média obtida neste trabalho (5,5 a 7,5%) foi inferior à obtida por Siqueira (2006) (10,0 %), provavelmente em função das temperaturas mais baixas observadas durante o experimento. Além da câmara de cultivo não

contar com sistema de aquecimento, o período de cultivo foi marcado por muita chuva, que resultou em quedas seguidas de temperatura, tornando-se difícil manter a temperatura de 25° C, considerada ideal para o cultivo deste cogumelo. Um forte indicador desse problema foi a demora para o início da frutificação. Normalmente a indução da frutificação pode ser feita em meados de agosto/setembro, quando a temperatura média durante o dia já está acima de 20° C. Entretanto, o clima apresentou muitas oscilações nesse período, o que comprometeu de certa forma a produtividade. Esse efeito ficou evidenciado no deslocamento dos picos de produção para o período de 60 a 90 dias após o início da frutificação (Figuras 1 e 2), quando, em condições normais, a produção chega a um franco declínio.

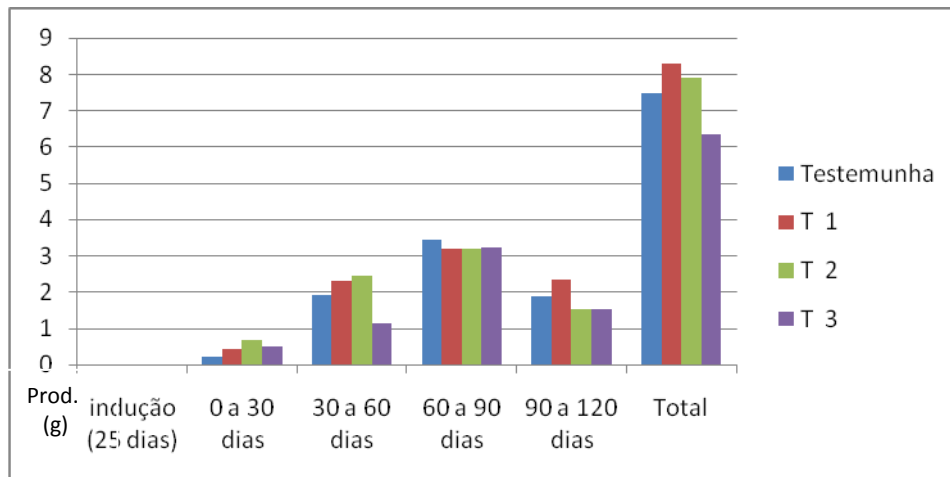


FIGURA 1 Fluxos de produção do cogumelo *A. brasiliensis* para os diferentes tratamentos de inoculação do composto com bactérias. T1- Inoculação na suplementação; T2- Inoculação na pasteurização; T3- Inoculação após a pasteurização.

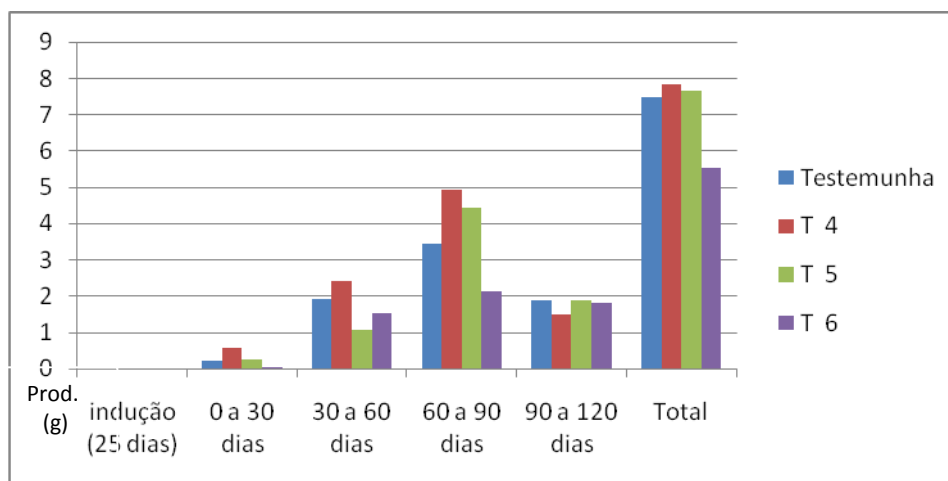


FIGURA 2 Fluxos de produção do cogumelo *A. brasiliensis* para os diferentes tratamentos de inoculação do composto com *S.thermophilum*. T4- Inoculação na suplementação; T5- Inoculação na pasteurização; T6- Inoculação após a pasteurização.

Outra dificuldade observada nos experimentos de cultivo de cogumelos em substrato obtido por compostagem é o alto coeficiente de variação encontrado nas análises estatísticas. Um coeficiente de variação elevado dificulta a obtenção de diferenças significativas entre os tratamentos, mesmo quando as diferenças entre as médias sejam numericamente altas. Esse problema está associado à elevada heterogeneidade do composto, porque mesmo com as reviragens periódicas durante a compostagem, é impossível garantir uma uniformidade de todas as características físicas, químicas e biológicas do composto. Durante a Fase I, são feitas reviragens periódicas do composto, numa tentativa de amenizar ou minimizar o efeito de estratificação, uma vez que há grandes diferenças de atividade microbiana nas várias posições dos materiais nas pilhas. As camadas mais externas são normalmente mais secas, frias e aeradas, enquanto que camadas intermediárias apresentam-se mais úmidas e com temperatura e aeração intermediárias. A região mais interna tende a ser a mais quente e com maior restrição de oxigênio. Essas diferenças fazem com que

microrganismos diferentes cresçam de forma diferenciada no composto, fazendo com que os processos de degradação e produção de metabólitos também sejam diferenciados. Com a reviragem periódica, procura-se ao menos fazer uma redistribuição do substrato nessas camadas, fazendo com que, ao final do processo todo o material tenha sido submetido aos mesmos processos microbianos.

Com o desenvolvimento da Fase II da compostagem, passou-se a considerar que a fase final da compostagem seria realizada em condições mais controladas. Entretanto, esse controle depende muito da infraestrutura utilizada para a condução da Fase II. Nos países onde a produção do composto de cultivo atingiu um “status” de atividade industrial, a infraestrutura dos túneis para a condução da Fase II permitem um bom controle do fluxo de ar, temperatura e umidade. Apesar disso, mesmo nesses países, a heterogeneidade do composto tem sido apontada como a principal causa de índices elevados de coeficiente de variação ou erro padrão (Peil et al., 1996; Straatsma et al., 2000). Mesmo para cogumelos cultivados em substratos axênicos, o alto coeficiente de variação pode ser atribuído à heterogeneidade do composto (Salmones et al., 2004).

No Brasil, as estruturas normalmente utilizadas para a condução da Fase II são na sua maioria bastante simples, em função do custo de construção, não contando normalmente com controles computadorizados. Nessas condições é provável que mesmo dentro do túnel ocorra ainda certo grau de estratificação, tanto no sentido vertical como no sentido horizontal, em função de possíveis diferenças de intensidade de ventilação, de resistência do composto, etc. Por isso, na condução dos experimentos, o composto é sempre misturado, ao ser retirado do túnel no final da Fase II, com o objetivo de se alcançar certa uniformidade. Entretanto, mesmo com esse cuidado, é provável que o composto final obtido ainda apresente certa heterogeneidade.

Em experimentos futuros, será utilizada uma estratégia adicional para reduzir essa heterogeneidade do composto. Após a colonização, os blocos de composto serão quebrados e todos misturados, antes de se montar as repetições, de forma que, pelo menos dentro de cada tratamento, haja uma maior uniformidade possível.

4.2 EXPERIMENTO 2 Efeito da microbiota natural e da inoculação do coquetel bacteriano na camada de cobertura do cogumelo *A. brasiliensis*

4.2.1 Precocidade na produção dos cogumelos

Os resultados de precocidade na produção dos cogumelos estão demonstrados na Tabela 5, e apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott. De modo geral, observou-se que o início de frutificação do cogumelo foi bastante tardio, considerando-se que normalmente a mesma ocorre entre 20 e 30 dias após a cobertura do composto. Conforme discutido anteriormente, essa frutificação tardia provavelmente está associada também às baixas temperaturas observadas durante o cultivo, em função das chuvas intensas durante o período dos experimentos.

Apesar disso, observou-se um efeito positivo da inoculação da terra não autoclavada, cujo tratamento produziu o primeiro cogumelo cerca de 16 dias mais cedo, quando comparado ao tratamento com a terra não autoclavada e não inoculada. Da mesma forma, observou-se que no tratamento de inoculação da terra autoclavada a frutificação iniciou-se cerca de 14 dias antes do tratamento com terra autoclavada e não inoculada.

É muito importante observar que a autoclavagem da terra de cobertura apresentou um efeito significativo sobre o início da frutificação, tornando o processo cerca de 21 dias mais tardio em relação à terra não autoclavada.

Entretanto, quando a terra autoclavada foi inoculada com as bactérias, o tempo médio necessário para o início da frutificação foi estatisticamente semelhante ao da terra não autoclavada (Tabela 5). Esses resultados constituem um forte indício de que a microbiota presente na terra de cobertura é importante no processo de indução da frutificação e que a sua utilização pode ser importante para tornar o ciclo de produção mais precoce.

TABELA 4 Precocidade de em dias entre o momento da indução a frutificação e o primeiro cogumelo colhido de cada tratamento da terra de cobertura.

Tratamentos ¹	Dias
Não autoclavada inoculada	38,50 A
Não autoclavada	55,25 B
Autoclavada e inoculada	62,00 B
Autoclavada	76,25 C
CV	15,97%

¹As médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si a nível de 5% de probabilidade de acordo com o teste de Scott-Knott.

4.2.2 Efeito da autoclavagem e inoculação da terra de cobertura sobre a produtividade, eficiência biológica e peso médio dos cogumelos *A. brasiliensis*

Os resultados de produtividade, eficiência biológica e peso médio dos cogumelos estão descritos na tabela 6, com diferenças significativas entre os tratamentos a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott. Ao contrário do efeito observado sobre o início da frutificação, a utilização da terra autoclavada apresentou um efeito positivo sobre a produção total de cogumelos, com um aumento de pelo menos 50% em relação aos tratamentos que utilizaram terra não autoclavada. Neste caso, a inoculação da terra com as bactérias não apresentou nenhum efeito sobre a produtividade do cogumelo, tanto no tratamento com a

terra autoclavada como no tratamento com terra não autoclavada.

Considerando apenas os resultados de produtividade e eficiência biológica, poderia-se concluir que o tratamento de desinfestação da terra de cobertura é mais importante do que a inoculação da mesma com as espécies testadas neste trabalho. Os resultados sugerem que a presença da microbiota natural do solo utilizado neste ensaio favoreceu a uma maior produtividade do cogumelo, o que poderia sugerir que um tratamento de desinfestação da terra de cobertura é muito importante para o processo.

Entretanto, deve-se considerar que um dos fatores mais importantes no cultivo comercial de cogumelos é a duração do ciclo de produção. Por isso, os resultados obtidos neste trabalho são paradoxais, porque, por um lado, indicam uma maior produtividade com a terra desinfestada, porém, por outro lado, apontam para um início de frutificação muito mais tardio, tornando o ciclo de produção tão longo que inviabilizaria o cultivo comercial.

Conforme pode-se observar na figura 4, quando a terra não autoclavada foi inoculada com as bactérias, o pico de produção ocorreu já no primeiro fluxo, enquanto que, com a terra não autoclavada e não inoculada, o pico de produção ocorreu no segundo fluxo de produção. Com a terra autoclavada, os picos de produção foram observados apenas no terceiro fluxo, mesmo com a inoculação com as bactérias, ainda que o início da frutificação tenha sido mais precoce conforme discutido anteriormente (Tabela 5). Esses resultados indicam que a inoculação da camada de cobertura com bactérias pode ser uma estratégia muito interessante para o cultivo do cogumelo *A. brasiliensis*.

TABELA 5 Resultados de produtividade, eficiência biológica e peso médio dos cogumelos de *A. brasiliensis* em função dos tratamentos de autoclavagem e inoculação da terra de cobertura com bactérias.

TRATAMENTOS ¹	Produtividade	EB	Peso
Terra autoclavada sem inoculação	12,79 A	40,48 A	29,33 A
Terra autoclavada e inoculada	12,53 A	39,66 A	31,81 A
Terra não autoclavada inoculada	8,50 B	26,91 B	31,18 A
Terra não autoclavada sem inoculação	7,32 B	23,16 B	28,94 A
CV	26,37 %	26,37 %	14,80 %

¹Médias seguidas de mesma letra na coluna, não diferem estatisticamente entre si a 5% de probabilidade de acordo com o teste de Scott-Knott. ²CV. 26,37, ³CV. 26,37, ⁴CV. 14,80.

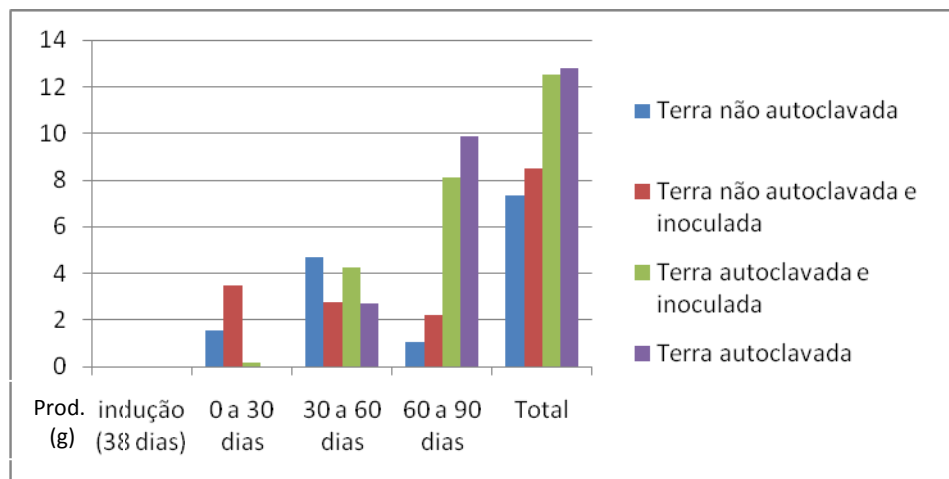


FIGURA 3 Fluxos de produção do cogumelo *A. brasiliensis*, em função dos tratamentos de autoclavagem e inoculação da terra de cobertura.

Silva et al. (2007) relataram o isolamento de bactérias a partir de diferentes tipos de solos utilizados como camada de cobertura, para o cultivo do *A. brasiliensis*, e avaliaram também o efeito de diferentes tratamentos de desinfestação da terra sobre a frutificação do cogumelo. Os autores testaram os tratamentos de pasteurização com vapor d'água e com formol, sendo este último o procedimento mais comumente utilizado no Brasil para o tratamento da terra

de cobertura. Entretanto, segundo os autores, as diferenças observadas entre os tratamentos não foram significativas, de forma que o teste com terra não desinfestada apresentou os mesmos resultados dos tratamentos de desinfestação. No presente trabalho, foi utilizado um tratamento muito mais drástico, que é a autoclavagem que, dependendo do tempo de tratamento e do volume de material autoclavado, pode-se chegar à quase esterilização do solo. Segundo Silva et al. (2007), os tratamentos com formol ou vapor não eliminaram a comunidade bacteriana presente no solo, ao contrário do que ocorreu com a terra autoclavada, a partir da qual não houve sucesso no isolamento de microrganismos..

Ahlawat (1999) inoculou *Alcaligenes faecalis* na terra de cobertura do cogumelo *A. bisporus* e obteve maior precocidade na frutificação. Segundo o autor, a microbiota presente na terra de cobertura estimula a precocidade da produção de cogumelos, porém pode reduzir a produtividade no final do cultivo. Os resultados obtidos neste trabalho parecem confirmar o efeito sobre a precocidade, porém, não sobre a produtividade. Entretanto, essas informações não podem ser conclusivas, uma vez que o universo de microrganismos presentes no solo é muito grande. Portanto, pode ser possível que uma combinação adequada de microrganismos pode apresentar um efeito positivo tanto sobre a precocidade como sobre a produtividade dos cogumelos.

Segundo Reddy & Patrick (1990), algumas bactérias isoladas diretamente da superfície do micélio presente na terra de cobertura estimulam a iniciação de corpos de frutificação em *Agaricus bisporus*, porém bactérias isoladas do composto colonizado não interferem na formação de basidiocarpo. Noble et al. (2003) relataram que a população bacteriana presente na terra de cobertura para o cultivo de *A. bisporus* varia de acordo com o material utilizado para a cobertura do composto. De acordo com Miller et al. (1995) a população de *Pseudomonas sp.* na turfa está entre 14 a 41% da população total de bactérias nesse material. Considerando que *Pseudomonas putida* é apontada como um dos

fatores biológicos importantes para a frutificação do *A. bisporus*, pode ser que essa elevada população de *Pseudomonas sp.* na turfa, a torne um dos melhores materiais de cobertura para o cultivo daquele cogumelo. Por outro lado, segundo Fermor et al. (2000), a vermiculita não permite o crescimento de *Pseudomonas sp* e outros gêneros de bactérias como *Bacillus* e *Alcaligenes* que também são apontados como estimuladores da frutificação de *A. bisporus*. Segundo os autores, talvez seja essa a razão pela qual a vermiculita não se mostrou um bom material de cobertura, ao contrário da turfa.

Ahlawat (1999), em experimento in vitro, avaliou o efeito de culturas vivas e mortas das bactérias *B. megaterium* e *A. faecalis* e concluiu que o *A. bisporus* apresentou maior crescimento micelial no meio com células bacterianas mortas, indicando que o fungo se beneficia dos metabólitos liberados pelas bactérias. Entretanto, para *Pseudomonas putida*, as evidências apontaram para uma ação efetiva da bactéria que atua na degradação de uma substância inibitória produzida pelo próprio micélio de *A. bisporus* (Rainey et al., 1990).

Portanto, a importância da comunidade microbiana sobre a indução da frutificação dos cogumelos em geral e, em especial, do *A. brasiliensis*, ainda merece uma exploração mais profunda e, na verdade, diferentes espécies de bactérias podem atuar de diferentes maneiras ou contribuindo com diferentes fatores de crescimento ou de inibição. Conseqüentemente, são necessários estudos mais profundos sobre a microbiota presente nos diferentes tipos de solos utilizados como material de cobertura, de forma a permitir a identificação das espécies mais importantes para o processo de frutificação do cogumelo. Além disso, estudos sobre a dinâmica e o equilíbrio populacional dessas espécies deverão ser conduzidos em experimentos futuros.

4 CONCLUSÕES

O coquetel bacteriano, utilizado como aditivo no processo de compostagem para o cultivo do cogumelo *A. brasiliensis*, pode ser adicionado no momento da suplementação do composto.

O *S. thermophilum* deve ser adicionado em mais de um momento durante a compostagem ou em maior concentração de esporos.

A microbiota natural do solo utilizado como camada de cobertura apresentou efeito negativo sobre a produtividade do cogumelo. Entretanto, a eliminação completa dessa microbiota pode retardar muito o início da frutificação, tornando o ciclo de produção extremamente longo.

5 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHLAWAT, O. P.; VERMA, R.N. *Alcaligenes faecalis* – a potent bacterial inoculant for improving yield and quality of *Agaricus bisporus* strain U₃. In: INTERNATIONAL CONFERENCE OF MUSHROOM BIOLOGY AND MUSHROOM PRODUCTS, 3., 1999, Taiwan. **Proceedings...** Taiwan: [s.n.], 1999. 15p.
- ANEJA, V.P.; BUNTON, B.; WALKER, J.T.; MALIK, B.P. Measurement and analysis of atmospheric ammonia emissions from anaerobic lagoons. **Atmospheric Environment**, Oxford, n. 35., n. 11, p. 1949-1958, 2001.
- BEFFA, T.; BLANC, M.; ARAGNO, M. Obligately and facultatively autotrophic, sulfur and hydrogen-oxidizing thermophilic bacteria isolated from hot composts. **Archives Microbiology**, New York, v. 165, n. 1, p. 34-40, Jan. 1996.
- BRAGA, G. C.; EIRA, A. F.; CELSO, P. G.; COLAUTO, N. B. **Manual de cultivo de *Agaricus blazei* Murr. cogumelo-do-sol**. Botucatu: Fundação de Estudos e Pesquisas Agrícolas e Florestais, 1998. 44 p.
- CHANG, S.; MILES, P. G. **Mushrooms: cultivation, nutritional value, medicinal effect and environmental impact**. 2. ed. Boca Raton: CRC, 2004. 451 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.; 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.
- DAVIS, C.L.; DONKIN, C.J.; HINCH, S.A.; GERMISHUIZEN, P. The microbiology of pine bark composting: an electron-microscope and physiological study. **Bioresource Technology**, n. 40, n. 3, p.195-204, 1992.
- DETSCH, C.; STÜLKE, J. Ammonium utilization in *Bacillus subtilis*: transport and regulatory functions of NrgA and NrgB. **Microbiology**, Reading, v. 149, n. 11, p. 3289–3297, Nov. 2003.

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

EIRA, A.F. da; MINHONI, M.T.A. **Manual teórico-prático do cultivo de cogumelos comestíveis.** 2.ed. Botucatu: Fundação de Estudos e Pesquisas Agrícolas e Florestais, 1997. 115p.

EICKER, A. The South African experience in growing *Pleurotus* spp. In: ELLIOTT, T.J. (Ed.). **Science and cultivation of edible fungi.** Rotterdam: Balkema, 1995. v. 2, p. 869-875.

FERMOR, T.; LINCOLN, S.; NOBLE, R.; DOBROVIN-PENNINGTON, A. Microbiological properties of casing. In: GRIENSVEN, L.J.L.D. van, (Ed.). **Science and cultivation of edible fungi.** Rotterdam: Balkema. 2000. p 447–454.

FLEGG, P. B.; SPENCER, D. M.; WOOD, D. A. **The biology and technology of the cultivated mushroom.** Chichester: J.Wiley, 1985. 177 p.

GERRITS, J. P. G.; GRIENSVEN, L. J. L. D. van. New developments in indoor composting (tunnel process). **Mushroom Journal**, v. 205, n. 1, p. 21-29, 1990.

GOLUEKE, C.G. Bacteriology of composting. **Biocycle**, Emmaus, v. 33, n. 1, p. 55-57, Jan. 1992.

HAYES, W. A.; RANDLE, P. E. The use of water soluble carbohydrates and methyl bromide in the preparation of mushroom composts. **Mushroom Growers Bulletin**, London, n. 218, p. 3-16, 1968.

HERRERA, O.M. **Produção, economicidade e parâmetros energéticos do cogumelo *Agaricus blazei*:** um enfoque na cadeia produtiva. Botucatu: UNESP, 2001. 183p.

- ITO, H.; SHIMURA, K.; KAWADE, M. Antitumor effects of a new polysaccharide protein complex (ATOM) prepared from *Agaricus blazei* (Iwade strain 101) “Himematsutake” and its mechanisms in tumor-bearing mice. **Anticancer Research**, Athens, v. 17, n.1A, p. 277-284, Jan./Feb. 1997.
- JESS, S.; MURCHIE, A. K.; BINGHAM, J. F.W. Potential sources of sciarid and phorid infestations and implications for centralized phases I and II mushroom compost production: **Crop Protection**, Oxford, v. 26, n.4, p. 455–464, Apr. 2007.
- KANAMORI, K.; RICHARD, L.; WEISS, R. J. D. Ammonia Assimilation in *Bacillus polymyxa*. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 262, n. 23, p. 11038-11045, Aug. 1987.
- KOPYTOWSKI FILHO, J.; MINHONI, M.T.A.; ESTRADA, A.E.R. *Agaricus blazei*: “The Almond Portobello” cultivation and commercialization. **Mushroom News**, Baltimore, v. 54, p. 22-28, 2006.
- MAIER, A.; RIEDLINGER, J.; FIEDLER, H. P.; HAMPP, R. Actinomycetales bacteria from a spruce stand: characterization and effects on growth of root symbiotic and plant parasitic soil fungi in dual culture. **Mycological Progress**, Heidelberg, v. 3, n. 2, p. 129–136, May 2004.
- MCCUBBIN, D.R.; APELBERG, B.J.; ROE, S.; DIVITA, F. J. R. Livestock ammonia management and particulate-related health benefits. **Environmental Science Technology**, Washington, v. 36, n.6, p. 1141–1146, Mar. 2002.
- MCKINLEY, V.L.; VESTAL, J.R. Biokinetic analyses of adaption and succession: microbial activity in composting municipal sewage sludge. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 47, n. 5, p. 933-941, 1984.
- MILLER, N.; GILLESPIE, J.B.; DOYLE, O.P.E. The involvement of microbiological components of peat based casing material in fructification of *Agaricus bisporus*. In: ELLIOTT, J. (Ed.). **Science and cultivation of edible fungi**. Rotterdam: Balkema, 1995. p. 313–321.
- MUTHUKRISHNAN, N.; VENUGOPAL, M.S.; JANARTHANAN, R. Recycling spent larval food of *Corcyra cephalonica* Stainton for preparing spawn and sporophore of *Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Singer. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Dordrecht, v. 16, n. 3, p. 265-270, Apr. 2000.

NAGAOKA, M. H.; NAGAOKA, H.; KONDO, K.; AKIYAMA, H.; MAITANI, T. Measurement of a Genotoxic Hydrazine, Agaritine, and Its Derivatives by HPLC with Fluorescence Derivatization in the *Agaricus* Mushroom and Its Products. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 54, n. 6, p. 922-924, June 2006.

NAKASAKI, K.; SASAKI, M.; SHODA, M.; KUBOTA, H. Characteristic of mesophilic bacteria isolates isolated during thermophilic composting of sewage sludge. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 49, n. 1, p. 42-45, 1985.

NOBLE, R.; FERMOR, T. R.; LINCOLN, S.; DOBROVIN-PENNINGTON, A.; EVERED, C.; MEAD, A. Primordia initiation of mushroom (*Agaricus bisporus*) strains on axenic casing materials. **Mycologia**, New York, v. 95, n. 4, p. 620-629, July/Aug. 2003.

OSAKI, Y.; KATO, T.; YAMAMOTO, K.; OKUBO, J.; MIYAZAKI, T. Antimutagenic and bactericidal substances in the fruit body of a Basidiomycete *Agaricus blazei*, Jun-17. **Yakugaku Zasshi**, Kyoto, v. 114, n. 5, p. 342-350, May 1994.

PARDO, A.; PERONA, M. A.; PARDO, J. Indoor composting of vine by-products to produce substrates for mushroom cultivation. **Spanish Journal of Agricultural Research**, Madrid, v. 5, n. 3, p. 417-424, Sept. 2007.

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

PATRIARCA, E.J.; TATE, R.; IACCARINO, M. Key role of bacterial NH₄⁺ metabolism in rhizobium-plant symbiosis. **Microbiology Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 66, n. 2, p. 203-222, June 2002.

PEIL, R.; ROSSETO, E.; PIEROBOM, C.; 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.

PETERS, S.; KOSCHINSKY, S.; SCHWIEGER, F.; TEBBE, C. C. Succession of microbial communities during hot composting as detected by PCR–single-strand-conformation polymorphism-based genetic profiles of small-subunit rRNA genes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 3, p. 930-936, Mar. 2000.

RAINEY, 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**, Cambridge, v. 94, n. 2, p. 191–195, Mar. 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.

RINKER, D.L. **Commercial mushroom production**. Toronto: Horticultural Research Institute of Ontario Vineland Station, 1993. (Publication, 350).

RYCKEBOER, J.; MERGAERT, J.; COOSEMANS, J.; DEPRINS, K.; SWINGS, J. Microbiological aspects of biowaste during composting in a monitored compost bin. **Journal Applied Microbiology**, Oxford, v. 94, n. 1, p. 127-137, 2003.

RYCKEBOER, J.; COPS, S.; COOSEMANS, J. The fate of plant pathogens and seeds during anaerobic digestion and aerobic composting of source separated household wastes. **Compost Science & Utilization**, Emmaus, v. 10, n. 3, p.204-216, 2002.

SALMONES, D.; MATA, G.; WALISZEWSKI, K. Comparative culturing of *Pleurotus* spp. on coffee pulp and wheat straw: biomass production and substrate biodegradation. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 96, n. 5, p. 537–544, Mar. 2005.

SILVA, V. A.; DIAS, E. S.; VALE, R. H. P.; SILVA, R. S.; MOREIRA, G. F. Isolamento e identificação de bactérias Presentes nos solos de cobertura utilizados no cultivo do cogumelo *Agaricus blazei* MURRIL. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 5, p. 1364-1373, set./out. 2007.

SIQUEIRA, F. G. **Efeito do teor de nitrogênio, inoculantes e métodos de compostagem para o cultivo de *Agaricus blazei***. 2006. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

STAUNTON, W. P.; MAC CANNA, C. **Mushroom production in plastic bags and tunnels**. Dublin: Kinsealy Research Centre, 1989. 32p.

STRAATSMA, G.; GERRITS J. P. G.; THISSEN, J. T. N. M.; AMSING, J. G. M.; LOEFFEN, H.; GRIENSVEN L. J. L. D. van. Adjustment of the composting process for mushroom cultivation based on initial substrate composition. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 72, n. 1, p. 67-74, Mar. 2000.

STRAATSMA, G.; OLIJNSMA, T. W.; GERRITS, J. P. G.; AUGUSTIJN, M.P.A.M.; OP den CAMP, H.J. Microbial interactions in composts: comercial aspects. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 73, p. 1019-1024, 1995. Suppl.

STRAATSMA, G.; SAMSON, R. A.; OLIJNSMA, T. W.; GERRITS, J. P. G.; OP DEN CAMP, H. J. M.; GRIENSVEN, L. J. L. D. van. Ecology of thermophilic fungi in mushroom compost, with emphasis on *Scytalidium thermophilum* and growth stimulation of *Agaricus bisporus* mycelium. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 60, n. 2, p. 454-458, Feb. 1994a.

STRAATSMA, G.; OLIJNSMA, T. W.; GERRITS, J. P. G.; AMSING, J. G. M.; OP DEN CAMP, H. J. M.; GRIENSVEN, L. J. L. D. van. Inoculation of *Scytalidium thermophilum* in button mushroom compost and its effect on yield. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 60, n. 9, p. 3049-3054, Sept. 1994b.

SHARMA, H.S.S. Economic importance of thermophilous fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 31, n. 1, p. 1-10, July, 1989.

STROM, P.F. Effect of temperature on bacterial species diversity in thermophilic solid-waste composting. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 50, n. 4, p. 899-905, 1985.

TANG, J. C.; KANAMORI, T.; INOUE, Y.; YASUTA, T.; YOSHIDA, S.; KATAYAMA, A. Changes in the microbial community structure during thermophilic composting of manure as detected by the quinone profile method. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 39, n. 2, p. 1999-2006, Feb. 2004.

TIQUIA, S.M. Evolution of extracellular enzyme activities during manure composting. **Journal Applied Microbiology**, Oxford, v. 92, n. 4, p. 764-775, 2002

TUOMELA, M.; VIKMAN, M.; HATAKKA, A.; ITÄVAARA, M.
Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. **Bioresource
Technology**, Oxford, v. 72, n. 2, p. 169-183, Apr. 2000.

VIJAY, B.; SHARMA, S.R.; VERMA, R. N.; LAKHANPAL, T.N. Role of
thermophilic fungi in compost production for White Button mushroom (*Agaricus
bisporus*). In: INTERNATIONAL CONFERENCE OF MUSHROOM
BIOLOGY AND MUSHROOM PRODUCTS, 3., 1999, Taiwan.
Proceedings... Taiwan: [s.n.], 1999. 23p.