



**CIBELLI PAULA DE CASTRO**

**PRODUTIVIDADE DO COGUMELO *Lentinula edodes* EM  
FUNÇÃO DE LINHAGENS, DO SUBSTRATO DE CULTIVO,  
COMPOSTAGEM E TRATAMENTO TÉRMICO**

**LAVRAS – MG  
2023**

**CIBELLI PAULA DE CASTRO**

**PRODUTIVIDADE DO COGUMELO *Lentinula edodes* EM FUNÇÃO DE  
LINHAGENS, DO SUBSTRATO DE CULTIVO, COMPOSTAGEM E  
TRATAMENTO TÉRMICO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do Título de Doutor.

Prof. Dr. Eustáquio Souza Dias  
Orientador  
Prof. Dr. Diego Cunha Zied  
Coorientador

**LAVRAS-MG**

**2023**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Castro, Cibelli Paula de.

Produtividade do cogumelo *Lentinula edodes* em função de linhagens, substrato de cultivo, compostagem e tratamento térmico / Cibelli Paula de Castro. - 2022.

85 p.: il.

Orientador(a): Eustáquio Souza Dias.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2022.  
Bibliografia.

1. Compostagem. 2. Tratamento térmico. 3. Produtividade. I. Dias, Eustáquio Souza. II. Título.

**CIBELLI PAULA DE CASTRO**

**PRODUTIVIDADE DO COGUMELO *Lentinula edodes* EM FUNÇÃO DE  
LINHAGENS, SUBSTRATO DE CULTIVO, COMPOSTAGEM E TRATAMENTO  
TÉRMICO**

**PRODUCTIVITY OF *Lentinula edodes* MUSHROOM AS A FUNCTION OF  
STRAINS, GROWING SUBSTRATE, COMPOSTING AND HEAT TREATMENT**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do Título de Doutor.

APROVADA em 30 de setembro de 2022.

Prof. Dr. Diego Cunha Zied - UNESP

Prof. Dr. Nelson Barros Colauto - UFBA

Prof. Dra. Meire Cristina Andrade Cassimiro da Silva – FACULDADE GALILEU

Prof. Dr. Félix Golçalves de Siqueira - EMBRAPA AGROENERGIA

Prof. Dr. Eustáquio Souza Dias

Orientador

Prof. Dr. Diego Cunha Zied

Coorientador

**LAVRAS – MG**

**2023**

## AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Este trabalho é sem dúvida uma obra de fé e perseverança ensinados por Cristo. A Ele toda Glória!

Aos meus pais, José Tiago e Maria Fátima: meus heróis! Mesmo com tantas dificuldades durante o doutorado, nunca deixaram de acreditar que esse momento chegaria. À minha irmã Janaína, a maior precursora da minha história e que com certeza é meu exemplo de vida. Ao Thiago, meu irmão querido, que sempre me ajudou durante as dificuldades. Obrigada por tudo!

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Programa de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola por todo apoio e ensinamento, principalmente a Cidinha e a Ivani que sempre me auxiliaram nas pesquisas.

Ao professor Eustáquio, por seu profissionalismo, ética, boa vontade, disponibilidade, serenidade e pelos inestimáveis conhecimentos transmitidos e orientação. Obrigada pelo acolhimento e por ter me incentivado na pesquisa com os cogumelos, desde o começo da minha graduação.

Aos meus sobrinhos Brenda e Zion, Welma, Ricardo, Maria Luísa e Maria Clara, que também são os precursores dessa história.

Ao Paulinho (in memoriam) e a Elisângela, meus queridos parceiros e amigos das infinitas compostagens. Nunca esquecerei o que fizeram por mim.

A todos os colegas do BIOFUNGI - UFLA e CECOG - UNESP, guardarei com muito carinho todos os momentos de aprendizagem, ajuda e amizade.

Ao meu amor Danilo e sua família que chegaram ao final deste trabalho mas que contribuírem grandemente me dando força e muito carinho para a conclusão do mesmo.

A Tati, ao Alex, a Juliana e a Tequilinha, muito obrigada por abrir as portas da casa de vocês durante este período.

Aos meus queridos padrinhos Glória e Sebastião. Eu amo vocês! Obrigada pelo apoio.

A todos os funcionários e secretárias do DBI, meus familiares, amigos e professores.

A Luciene e ao Douglas pelas caronas e pela amizade tão especial.

A todos que contribuíram de forma direta ou indiretamente.

Obrigada!

*Ora, a fé é o firme fundamento das coisas que se esperam,  
e a prova das coisas que não se vêem.*

*Hebreus 11:1*

## RESUMO

O sistema de cultivo axênico do cogumelo Shiitake tem sido predominante e sendo fornecido por empresas especializadas. Em função das dimensões continentais do Brasil, a aquisição desse tipo de substrato é inviável para muitas regiões, em função do elevado custo de transporte. A produção do próprio substrato requer um nível de investimento normalmente inacessível ao pequeno produtor. Neste contexto, duas alternativas merecem ser consideradas: a) Pasteurização severa do substrato, a qual equivale ao sistema axênico e b) compostagem curta do substrato seguida de pasteurização severa. Primeiro, avaliou-se a pasteurização severa do substrato, a qual foi comparada com a combinação pasteurização severa/autoclavagem e apenas autoclavagem, com diferentes tempos de tratamento. Depois, avaliou-se a compostagem, com diferentes formulações, tempo de compostagem e efeito de linhagem. Em função do número de experimentos, os ensaios foram conduzidos, a princípio, em pequenas dornas com capacidade para 15 kg. E ao final, foi conduzido um experimento em maior escala, com 100 kg de substrato (peso seco) para simular as condições em uma escala normal de compostagem. Neste experimento, a compostagem foi conduzida durante 8 dias, porém, avaliando-se o processo com 4, 6 e 8 dias de compostagem. Para cada um desses tempos de compostagem, os blocos foram submetidos a diferentes tratamentos térmicos: a) 12 horas de pasteurização severa a 80°C, b) autoclave 1h, c) autoclave 2h, d) autoclave 3h. Em todos os experimentos, os blocos produzidos foram inoculados com 2% do inóculo de shitake. Após a inoculação, os blocos foram incubados até a completa colonização e formação da capa marrom, em uma sala à temperatura ambiente. Para a frutificação, os blocos foram transferidos para câmara de cultivo com 90%±5 de umidade e temperatura de 18 a 20°C. A pasteurização severa do substrato não compostado mostrou-se eficiente apenas a partir de 24h. A compostagem de 4 dias seguida de pasteurização pode ser realizada desde que o tempo de pasteurização seja de 36 horas seguidas. Tempos inferiores de pasteurização resultaram em elevados índices de contaminação. Os substratos à base de bagaço de cana + serragem e à base somente da serragem, compostados por 6 dias e pasteurizados por 12 horas, apresentaram índice nulo de contaminação e rápido crescimento micelial. A linhagem LECAR foi a mais produtiva em substratos à base de serragem e farelo de trigo compostados. Os dados da compostagem com diferentes níveis de farelo de arroz mostraram que os melhores resultados de produtividade foram obtidos nos tratamentos entre 15 a 20% de farelo de arroz. O mesmo experimento feito com fubá resultou em baixa produção de cogumelos com os níveis escolhidos. Os experimentos com casca de café e soja não chegaram à fase de produção de cogumelos, pois o processo de compostagem não resultou em substrato de boa qualidade e houve um escurecimento anormal e odor desagradável, diferente dos demais experimentos. O farelo de soja ou a casca de café associada à a compostagem só poderia ser possível em níveis abaixo daqueles testados ou em combinação com outro volumoso em vez da utilização da serragem.

Palavras-chave: Pasteurização severa. Índice de contaminação. Produção.

## ABSTRACT

The cultivation of Shiitake mushrooms in axenic system has been predominant and provided by specialized companies. The purchase of this substrate is impracticable for many regions owing to its high transportation cost and also, the production of the substrate itself requires an investment level normally inaccessible for small-scale producers. In this context, two alternatives deserve to be considered: a) severe pasteurization of the substrate and b) short composting followed by severe pasteurization. First, the severe pasteurization of the substrate was evaluated, which was compared with the combination severe pasteurization/autoclaving and only autoclaving, with different times of treatment. Afterwards, the composting process was evaluated with different formulations, composting time, and the strain effect. Due to the number of experiments, the tests were conducted, at first, in small vats with a capacity of 15 kg and at the end, an experiment was conducted on a larger scale with 100 kg of substrate (dry weight) to simulate the conditions on a normal scale of composting. In this experiment, the composting was conducted for 8 days, however, with an evaluation of the process with 4, 6 and 8 days of composting. For each of these times of composting, the blocks were submitted to different heat treatments: a) 12-hour severe pasteurization at 80°C, b) 1-hour autoclaving, c) 2-hour autoclaving, d) 3-hour autoclaving. All blocks were inoculated with 2% of shiitake inoculum. After inoculation, the blocks were incubated until complete colonization and brown film formation in a room at ambient temperature. For fruiting, the blocks were transferred to a cultivation chamber with 90%±5 humidity and a temperature of 18 to 20°C. The severe pasteurization of the non-composted substrate was efficient only after 24 hours. The 4-day composting followed by pasteurization can be done as long as the pasteurization time occurs for 36 hours in a row. Shorter pasteurization times resulted in high levels of contamination. Substrates based on sugarcane bagasse + sawdust, and only sawdust, composted for 6 days and pasteurized for 12 hours, showed zero contamination and rapid mycelial growth. The LECAR strain was the most productive on substrates based on composted sawdust and wheat bran. Data referring to composting with different levels of rice bran showed that the best productivity results were obtained in treatments between 15 and 20% of rice bran. Still, the same experiment realized with cornmeal resulted in low mushroom production with the chosen levels. The experiment with coffee and soybean rusk did not reach a mushroom production stage, because the composting process did not result in good quality substrate. Also, abnormal browning and an unpleasant odor were observed, unlike the other experiments. These results showed that the use of soybean meal or coffee husk associated with the use of composting could only be possible at levels below those tested here or in a combination with another roughage instead of sawdust.

Keywords: Severe pasteurization. Contamination index. Production.

## SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 .....	12
1 INTRODUÇÃO GERAL .....	12
2 REFERENCIAL TEÓRICO .....	14
2.1 Cogumelos Comestíveis.....	14
2.2 <i>Lentinula edodes</i> (shiitake).....	15
2.3 Cultivo de <i>Lentinula edodes</i> .....	16
2.5 Fatores físicos para o cultivo de <i>Lentinula edodes</i> .....	18
2.6 Métodos de esterilização dos substratos de cultivo .....	19
2.7 Compostagem.....	20
REFERÊNCIAS .....	22
CAPÍTULO 2 .....	26
PRODUTIVIDADE DO COGUMELO <i>Lentinula edodes</i> EM FUNÇÃO DO SUBSTRATO DE CULTIVO, COMPOSTAGEM E TRATAMENTO TÉRMICO.....	26
1 INTRODUÇÃO .....	28
2 MATERIAL E MÉTODOS .....	30
2.1 Produção dos inoculantes.....	30
2.2 Uso da pasteurização severa e/ou autoclavagem no controle da contaminação em substrato não compostado .....	30
2.3 Utilização do processo de compostagem e pasteurização a vapor para a produção do substrato de cultivo de <i>Lentinula edodes</i> em sistema fechado.....	31
2.3.1 Formulação dos substratos .....	31
2.3.2 Processo de compostagem e pasteurização.....	31
2.3.3 Efeito da frequência de reviragem do substrato durante o processo de compostagem.....	33
2.3.4 Efeito do tempo de compostagem sem reviragem do substrato .....	34
2.3.5 Efeito de linhagens sobre o crescimento micelial e frutificação de <i>L. edodes</i> em substrato compostado e pasteurizado a vapor.....	34
2.4 Utilização do processo de compostagem e pasteurização a vapor para a produção do substrato de cultivo de <i>Lentinula edodes</i> em sistema aberto, de maior escala.....	35
2.4.1 Compostagem e pasteurização .....	36
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	39
3.1 Uso da pasteurização severa e/ou autoclavagem para o tratamento do substrato não compostado .....	39

3.2 Produtividade de <i>Lentinula edodes</i> em substrato compostado em sistema fechado.....	42
3.2.2 Efeito do tempo de compostagem sobre as características do composto.....	45
3.3 Efeito de linhagens sobre o cultivo do shiitake em substrato compostado.....	51
3.4 Cultivo de <i>shiitake</i> em substrato obtido por compostagem aberta utilizando a formulação S+BC+FT .....	53
3.4.1 Evolução da temperatura.....	54
3.4.2 Índice de contaminação e crescimento micelial .....	54
3.5 Cultivo de <i>shiitake</i> em substrato obtido por compostagem aberta utilizando a formulação S+FT.....	57
4 CONCLUSÕES.....	61
REFERÊNCIAS .....	62
CAPITULO 3 .....	65
EFEITO DO SUBSTRATO COMPOSTADO UTILIZANDO FARELOS E CASCA DE CAFÉ COMO INGREDIENTES NA PRODUTIVIDADE DO COGUMELO <i>Lentinula edodes</i> .....	65
1. INTRODUÇÃO .....	67
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	69
2.1 Preparo do inóculo .....	69
2.2 Formulação dos substratos .....	69
2.3 Compostagem e Pasteurização .....	69
2.4 Colonização do substrato e formação da capa marrom.....	71
2.5 Frutificação e colheita dos cogumelos.....	71
2.6 Imersão dos blocos após o primeiro fluxo .....	71
2.7 Produtividade e eficiência biológica.....	72
2.8 Análise Estatística.....	72
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	73
3.1 Compostagem do substrato à base de serragem suplementada com farelo de arroz.....	73
3.2 Compostagem do substrato à base de serragem suplementada com fubá grosso .....	76
3.3 Compostagem do substrato à base de serragem suplementada com farelo de soja .....	79
3.4 Compostagem do substrato à base de serragem suplementada com casca de café .....	81
4 CONCLUSÕES.....	84
REFERÊNCIAS .....	85

## CAPÍTULO 1

### 1 INTRODUÇÃO GERAL

O cogumelo *Lentinula edodes* (shiitake) é um dos fungos mais cultivados do mundo, com cerca de 22% da produção entre todos os comestíveis (ROYSE *et al.*, 2017). O cultivo de shiitake aumentou recentemente devido ao seu valor gastronômico e nutracêutico (KWON *et al.*, 2018). Como o crescimento e a qualidade dos cogumelos são significativamente afetados pelo meio ambiente, as condições adequadas de cultivo tem sido alvo de muitos estudos (PARK *et al.*, 2001, SEO; KOO, 2009). Entretanto, a tecnologia de produção do substrato de cultivo do shiitake requer investimento e nível tecnológico normalmente fora de alcance do pequeno produtor. Em função disso, é de interesse também buscar métodos alternativos para a produção de substrato que sejam acessíveis aos pequenos produtores de países em desenvolvimento.

Os métodos de cultivo do shiitake variam do cultivo em toras ao cultivo em substrato à base de serragem, desde ambientes semicontrolados até aqueles completamente controlados. O cultivo em blocos de substrato à base de serragem, convencionalmente esterilizados em autoclave, tem como vantagens a alta densidade de cultivo, menor trabalho e redução do período de cultivo. Esse tipo de produção conta com instalações que permitem o controle ambiental da temperatura, umidade relativa do ar e teor de CO<sub>2</sub>.

Algumas linhagens são mais rústicas e podem ser cultivadas sem o controle estrito da temperatura (ZIED *et al.*, 2016). A disponibilidade de linhagens rústicas atende à fase de cultivo do cogumelo, entretanto, permanece a questão da tecnologia de produção do substrato de cultivo. Até o momento, os pequenos produtores de shiitake dependem do fornecimento de blocos já colonizados por empresas especializadas, de modo que eles se ocupam apenas da fase de cultivo. A aquisição de blocos colonizados é uma estratégia interessante e viável quando os produtores podem contar com fornecedores no entorno do seu negócio.

Entretanto, na maioria dos casos, isso não ocorre, o que inviabiliza a logística do negócio. Por outro lado, produzir o próprio substrato requer um nível de investimento normalmente inacessível ao pequeno produtor. Neste contexto, duas alternativas merecem ser consideradas: 1- Pasteurização severa do substrato; 2- Compostagem curta seguida de pasteurização.

A compostagem é um processo natural de decomposição realizada por microrganismos, na qual a matéria orgânica no estado sólido e úmido atinge o ponto de maturação ou humificação, ao final de alguns meses de duração do processo. A compostagem clássica, que é

utilizada para a produção de fertilizante orgânico, é caracterizada por uma fase inicial e rápida de um composto cru ou imaturo, seguida da fase de semicura ou bioestabilização, para atingir, finalmente, a terceira fase, a cura ou maturação ou humificação, acompanhada da mineralização de determinados componentes da matéria orgânica. Na compostagem, além do aumento da temperatura, que é importante para a eliminação de patógenos, fatores como pH, aeração e umidade também devem ser monitorados durante todo o processo. Além disso, os substratos utilizados e, conseqüentemente, a microbiota atuante no processo, irão influenciar na formação de um composto de qualidade. Bactérias, fungos e actinobactérias são os principais responsáveis pela transformação da matéria orgânica em húmus. Portanto, a natureza da comunidade microbiana, a população, as espécies e a intensidade da atividade da decomposição dependem das condições físicas favoráveis para seu estabelecimento.

Para o cultivo de cogumelos, a compostagem é utilizada tradicionalmente para a obtenção do substrato de cultivo de algumas espécies. Entretanto, ao contrário da compostagem clássica, para a produção do substrato de cultivo de cogumelos, utiliza-se um período mais curto de compostagem, que varia, normalmente, de 7 a 30 dias, dependendo da espécie de cogumelo a ser cultivada. Para a produção de várias espécies de *Pleurotus*, utiliza-se substrato obtido por compostagem de apenas 7 dias, seguido por um período curto de condicionamento e pasteurização a vapor. Para os cogumelos *Agaricus*, a compostagem dura cerca de 30 dias, somando-se fase I e fase II, as quais incluem também o condicionamento e pasteurização do substrato (VIEIRA; PECCHIA, 2018). Apesar de serem tecnologias já bem estabelecidas, infelizmente, a técnica de compostagem não funciona bem para todas as espécies de cogumelos (DE SIQUEIRA et al., 2011, CHANG; MILES, 2004).

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência da pasteurização severa e a viabilidade de utilização da compostagem para a produção do substrato de cultivo do cogumelo shiitake.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Cogumelos Comestíveis

São conhecidas mais de dez mil espécies de cogumelos, podendo ser considerados comestíveis aqueles que não trazem risco à saúde e atendem aos padrões organolépticos (sabor, aroma, textura, etc), enquanto que os não comestíveis apresentam propriedades alucinógenas e/ou tóxicas que podem ser letais se consumidos ou não apresentam características desejáveis para o consumo (FROUFE *et al.*, 2011). De acordo com Wasser *et al.* (2005), os cogumelos comestíveis possuem diversas propriedades envolvidas na imunoterapia, nutrição e prevenção de doenças tumorais. Os polissacarídeos presentes na parede celular desses fungos, principalmente as betaglucanas, são descritos por melhorarem respostas imunes inatas e antitumorais em animais e humanos.

Somente mil espécies de cogumelos são conhecidas cientificamente como comestíveis. *Lentinula edodes* (Shiitake), *Agaricus bisporus* (Champignon de Paris) e *Pleurotus ostreatus* (Shimeji), destacam-se dentre as espécies mais cultivadas no mundo. Dentre as três espécies, o *Pleurotus ostreatus* var. Florida é a espécie mais cultivada no Brasil (TABELA 1).

Tabela 1 – Porcentagem estimada da produção de cogumelos comestíveis no Brasil.

<b>Principais cogumelos produzidos no Brasil</b>	<b>(%)</b>
<i>Agaricus bisporus</i> (Champignon de Paris)	33%
<i>Pleurotus ostreatus</i> var. Florida	48 %
<i>Lentinula edodes</i> (Shiitake)	13%
<i>Agaricus subrufescens</i>	6%
Outros	6%

Fonte: Edible Mushroom Production in the Americas (SÁNCHEZ *et al.*, 2018).

O principal estado produtor de cogumelos no Brasil é o estado de São Paulo, com destaque para as cidades de Mogi das Cruzes (88,06%), Campinas (10,85%), e Sorocaba (1,09%) (SACOMANI; TONIN, 2016). De acordo com a Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA, 2019), 80% dos produtores nacionais de cogumelos se classificam como médios e pequenos agricultores familiares, sendo responsáveis pela produção de cerca de 12 mil toneladas de cogumelos por ano.

## 2.2 *Lentinula edodes* (shiitake)

*Lentinula edodes* é um cogumelo saprófita, considerado como um fungo de podridão branca, por ter a capacidade de degradar celulose, lignina e outras macromoléculas (ASGHER *et al.*, 2008). Por esse motivo, este fungo pode ser cultivado em vários resíduos agrícolas porque usa os muitos compostos lignocelulósicos (celulose, hemicelulose e lignina) presentes como fonte de carbono e nutrientes. O arsenal enzimático do shiitake inclui lacases, manganês peroxidases e aril-álcool-oxidase, as quais caracterizam este fungo como um degradador eficaz de subprodutos agroindustriais, tais como serragem, bagaço de cana, bainha de palmito, bagaço de mandioca e outros (ROSSI; MONTEIRO; MACHADO, 2001, TONINI *et al.*, 2007).

De acordo com Chang e Miles (2004), o cultivo do shiitake teve início na China, entre 1000 e 1100 DC. Desde então, o shiitake tornou-se o cogumelo mais produzido no mundo, representando 22% da produção mundial, destacando-se a China como maior produtor mundial (ROYSE; DANIEL; BAARS, 2017).

Em termos nutricionais, o cogumelo shiitake é descrito como rico em proteínas, carboidratos, fonte de fibras, vitaminas e minerais. Além disso, possui atividade antioxidante, baixo teor de lipídios e baixo valor calórico (CRAVO, 2014). Por fim, o cogumelo shiitake possui muitos compostos bioativos, de grande potencial farmacológico (KHAN *et al.*, 2018). É importante ressaltar que o elevado valor protéico atribuído aos cogumelos dá-se pelo fato de que a análise nutricional é feita com o alimento desidratado. Entretanto, quando se considera o cogumelo fresco, o teor de proteínas é baixo, em função do elevado teor de água. Portanto, quando se considera o cogumelo seco, como um ingrediente a ser utilizado como suplemento alimentar ou na composição de outros produtos, sim, trata-se de um alimento rico em proteínas. Mas, quando se trata da sua utilização como alimento fresco, o teor de proteína é de 2 a 3%.

Uma das características que difere o shiitake de outras espécies de cogumelos cultivados em substrato axênico é a necessidade de manejo para formação da capa micelial marrom, processo enzimático que caracteriza morfologicamente o substrato de cultivo. A formação da capa marrom é importante no que diz a respeito à proteção contra perda de umidade e contaminações, principalmente por espécies de *Trichoderma*. (DIAS, 2010). Normalmente, após a inoculação, o substrato é completamente colonizado em cerca de 30 dias, entretanto, para a completa formação da capa marrom, o processo dura cerca de 3 meses, contados a partir da inoculação do substrato. Esta é uma das razões que tornam o cultivo do shiitake mais complexo, quando comparado com a maioria das espécies de *Pleurotus*. Além do tempo necessário para a formação da capa marrom e maturação fisiológica do substrato colonizado,

aumenta-se também as chances de contaminação do substrato. Por isso, o cultivo do shiitake demanda um ambiente de cultivo mais controlado.

### 2.3 Cultivo de *Lentinula edodes*

Acredita-se que o cogumelo shiitake foi introduzido no Japão, através da China, cerca de 400 a 500 anos depois de serem cultivados neste país. O cultivo em toras, foi sendo substituído por outros sistemas, tais como garrafas e “toras” artificiais, as quais consistem, na verdade, em substrato à base de serragem acondicionado em sacos de propileno com diâmetro de cerca de 12 cm, com o propósito de imitar o diâmetro das toras naturais (CHANG; MILES, 2004). Posteriormente, iniciou-se em Taiwan o cultivo em bolsas plásticas, o qual disseminou-se para outros países até o momento (CHANG; MILES, 2004). No Brasil, o cultivo de shiitake teve seu início na década de 90 sendo que a técnica mais utilizada neste período foi o cultivo em toras de eucalipto (PASCHOLATI *et al.*, 2014).

O cultivo axênico foi desenvolvido para a utilização do substrato esterilizado em autoclave por algumas horas ou submetido a pasteurização severa por um longo período de tempo. Após a esterilização e subsequente resfriamento, o substrato deve ser inoculado em condições assépticas para evitar problemas de contaminação (MONTINI, 2001). Em ambas as formas de cultivo (cultivo em toras ou cultivo axênico), o fungo passará pelos mesmos estágios de crescimento: inoculação, incubação ou crescimento micelial, indução da frutificação, frutificação e repouso. O cultivo axênico do shiitake apresenta uma série de vantagens, dentre elas o aumento da eficiência biológica e produtividade, quando comparado ao cultivo em toras (EIRA; MONTINI, 1997; FREDERICO *et al.*, 2002). Além disso, apesar do tempo necessário para formação da capa marrom, o cultivo axênico proporciona um início de frutificação muito menor em comparação ao cultivo em toras, além de um ciclo de cultivo também menor (TABELA 2).

Um fator importante a ser observado durante o preparo do substrato para o cultivo de shiitake é a faixa correta de pH, a qual deve ficar entre 4,5 e 5,5 (CHANG; MILES, 2004; PHILIPPOUSSIS *et al.*, 2001). Maciel (2012) relatou que a velocidade de crescimento de *L. edodes* diminuiu com a elevação do pH.

Tabela 2 – Comparação entre os sistemas de cultivo do shiitake, quanto à duração das fases de cultivo.

Fases de cultivo	Duração	
	Cultivo axênico	Toras
Incubação	3 meses	6 meses
Fluxos de Produção	3 a 4 meses	4 a 6
Intervalo entre Fluxos	7 a 14 dias	2 meses

Fonte: Adaptado de Oei (2003) e Pascholati *et al.*, (2014).

#### 2.4 Substratos para o cultivo de *Lentinula edodes*

Quando há utilização de subprodutos provenientes do setor agroindustrial, conseqüentemente há diminuição dos impactos ambientais que estes materiais causam ao serem lançados de forma indiscriminada no meio ambiente, causando vários danos ao mesmo (REZZADORI; BENEDETTI, 2009). Uma das grandes vantagens de se produzir *Lentinula edodes* é o aproveitamento de subprodutos agroindustriais e madeireiros para a confecção dos blocos de cultivo.

Em 1990, foi iniciado em Taiwan o cultivo do shiitake em substrato à base de serragem de eucalipto, como alternativa às toras de mesma espécie e de outras espécies vegetais (HIROMOTO, 1991). No entanto, para que se tenha um substrato com a relação carbono e nitrogênio (C/N) adequada (>100:1), os produtores precisam suplementar a serragem ou palhas com matérias-primas existentes próximas às suas propriedades e que apresentem relação C/N mais estreita (EIRA, 2000). Farelo de soja, farelo de trigo e farelo de arroz são importantes suplementos utilizados na formulação de substratos para shiitake (STAMETS, 2000). ATILA, 2021). Além destes, tem sido comum utilizar também um agente corretivo de pH, sendo o carbonato de cálcio o mais comum. Um fator importante a ser adequado ao produzir o substrato de cultivo é o teor de umidade que, de acordo com Royse *et al.* (2017), deve estar entre 55-60%.

Nos últimos 20 anos, alguns trabalhos têm abordado a substituição da serragem de espécies vegetais por subprodutos da agroindústria. Mahdizadeh *et al.* (2021) obtiveram resultados satisfatórios em blocos axênicos de palha, serragem e farelo de arroz em que várias linhagens de shiitake se mostraram promissoras comercialmente nesses substratos.

O bagaço de cana pode ser um dos substitutos à serragem ou usado em combinação com a mesma, uma vez que este possui composição lignocelulósica adequada, sendo um dos materiais mais utilizados na composição do substrato de cultivo de outras espécies de cogumelos no Brasil. Entretanto, nos últimos anos, o bagaço de cana ganhou muita importância também na produção de energia, como combustível para usinas termelétricas, e para produção de energia nas próprias usinas de açúcar e álcool. No entanto, cerca de 28% desse resíduo é utilizado para diversos fins. Dentre eles, podemos citar caldeiras na citricultura, produção de papel e celulose e uso de ração animal (SILVA *et al.*; 2010). Diante disso, o bagaço de cana, que era doado pelas usinas, passou a ser um importante co-produto no mercado. Atualmente, os produtores de substrato de cultivo de cogumelos pagam por este material.

## 2.5 Fatores físicos para o cultivo de *Lentinula edodes*

Os fatores físicos desempenham um papel fundamental para a produtividade dos cogumelos, influenciando todo o processo de cultivo. Dessa forma, pode-se dizer que condições ótimas para o crescimento, colonização e, conseqüentemente, produtividade, impactam diretamente a viabilidade econômica do cultivo.

A frutificação do shiitake pode ocorrer em temperatura abaixo de 20 °C, mas, a colonização do substrato de cultivo na maioria das linhagens de *Lentinula edodes* funciona bem à temperatura ambiente. Portanto, durante as fases de colonização e formação da capa marrom, utiliza-se temperatura ambiente (25°C) e, para a indução da frutificação, utiliza-se temperatura de 18 a 20 °C. Para uma frutificação eficiente, outros dois fatores são muito importantes: umidade relativa do ar e ventilação, sendo que, para esses dois fatores, não há grandes variações entre as diferentes espécies de cogumelos, com algumas exceções (ATHAYDE *et al.*, 2011).

De modo geral, utiliza-se umidade acima de 80%±5, portanto, abaixo deste valor, pode ocorrer aborto dos primórdios, acarretando na perda de produtividade. Para o fator ventilação, trabalha-se com um teor de CO<sub>2</sub> de 1000 ppm como referência, sendo este, o máximo permitido para a fase de frutificação. Por estes fatores, o produtor precisa fazer um investimento básico para instalar um sistema básico de nebulização e de ventilação no local de produção (FIGUEIRÓ *et al.*, 2011).

Para a obtenção do primeiro fluxo, normalmente basta a transferência dos blocos para um ambiente com temperatura adequada para indução da frutificação, ou redução da temperatura, quando utiliza-se a mesma estrutura para todas as etapas. Entretanto, para os fluxos

subsequentes, recomenda-se fazer a imersão dos blocos em água de boa qualidade (ROYSE *et al.*, 2017). A imersão cumpre dois papéis básicos: reidratação dos blocos e choque térmico.

A reidratação dos blocos é necessária, uma vez que os mesmos perdem grande quantidade de água para a formação dos cogumelos, bem como pela evaporação. O choque térmico cumpre um papel importante principalmente quando o cultivo é conduzido em ambiente semicontrolado, onde a temperatura oscila naturalmente. Nessas condições, a utilização de água com temperatura abaixo da temperatura ambiente pode ser importante para a indução da frutificação. Neste caso, segue-se o mesmo procedimento utilizado para o cultivo em toras, segundo o qual, a imersão é utilizada como um fator de estresse adicional para o micélio do fungo (SHIOMI *et. al.* 2007).

## 2.6 Métodos de esterilização dos substratos de cultivo

A produção de cogumelos exige substratos livres de contaminantes que possam prejudicar a colonização destes fungos. A esterilização de um substrato é, portanto, um método apropriado para a eliminação dessa microbiota indesejável (KHAN *et al.*, 2018).

O termo “esterilização” significa a destruição ou remoção de todas as formas de vida de um dado material. Na esterilização em autoclave, emprega-se vapor d’água saturado sob pressão à temperatura de 121° C (pressão adicional de 1 atm) por períodos que podem ser desde períodos curtos de 15 a 30 minutos, podendo chegar até várias horas, dependendo do tipo de material e volume. Para a esterilização de substratos de cultivo de cogumelos comestíveis, os recipientes utilizados permitem que o substrato faça trocas gasosas e ao mesmo tempo isola o mesmo de contaminantes do meio externo. São impermeáveis à água, laváveis ou descartáveis. Atualmente os recipientes mais comuns são os sacos descartáveis de polipropileno ou mistura de polipropileno com polietileno de alta densidade (COELHO, 2019).

Segundo Átila (2021), há uma grande preocupação por parte dos produtores com a eliminação de contaminantes, em especial de fungos *Trichoderma*, principal contaminante dos substratos de *L. edodes*. Entretanto, um bom controle dos índices de contaminação requer uma estrutura laboratorial, tanto para a esterilização do substrato, como para a inoculação asséptica do mesmo. Esta estrutura, porém, é inacessível para a maioria dos produtores.

Uma das alternativas ao processo de autoclavagem é a pasteurização severa, a qual requer uma infraestrutura de custo muito menor quando comparado à autoclavagem. Segundo Rosseto, Pierobom e Rocha (1996), a pasteurização ocorre através do calor úmido, que, ao ser injetado, faz com que a temperatura do composto atinja 60°C, durante período de tempo de pelo

menos 6 horas, dependendo do processo e da espécie de cogumelo a ser cultivada. Na produção de shiitake, a pasteurização ainda é um desafio, porém já é uma realidade presente na produção de *Pleurotus spp* e *Agaricus spp*. (MAZIERO; ZADRAZIL, 1994). Morales e Sánchez (2017) testaram o processo de pasteurização acima de 6h a 60°C para a cultivo dos cogumelos *Agrocybe aegerita*, *Auricularia fuscusuccinea*, *Pleurotus djamor*, *P. eryngii*, *P. ostreatus*, *L. edodes* e *Ganoderma lucidum* em grama, sabugo de milho e serragem. Segundo os autores, apenas *L. edodes* e *G. Lucidum* não frutificaram nos substratos pasteurizados.

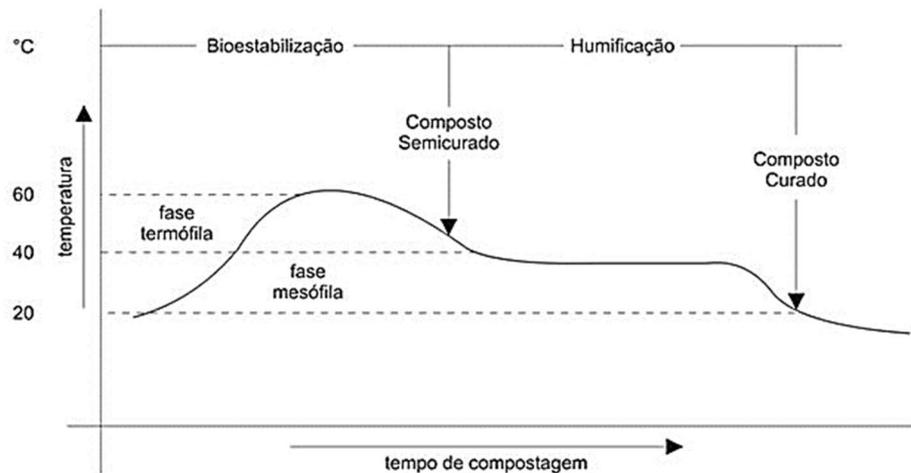
## 2.7 Compostagem

A compostagem é um processo natural de decomposição, durante o qual ocorre uma sucessão de microrganismos benéficos, resultando ao final, em uma estabilidade da matéria orgânica (SOUZA *et al.*, 2014). Durante o processo de compostagem, há uma elevação da temperatura, a qual é responsável por eliminar os microrganismos patogênicos e, desta forma, estabelecer um composto final que poderá ser usado com segurança, seja na agricultura orgânica ou mesmo na produção de algumas espécies de cogumelos (RIBEIRO *et al.*, 2017).

O processo de compostagem é desenvolvido em duas fases distintas (Figura 1), em que na primeira (termofílica) ocorre a degradação ativa e, na segunda (mesofílica) ocorre a maturação (humificação) do material orgânico, ocasião em que é produzido o composto propriamente dito (MATOS *et al.*, 1998; VILLAR *et al.*, 2016).

A compostagem, por ser um processo biológico, é influenciada por vários fatores que irão atuar diretamente sobre os microrganismos envolvidos no processo. A formulação do composto, ou seja, os materiais utilizados na compostagem interferem diretamente na microbiota presente (BERNAL; ALBURQUERQUE; MORAL, 2009; VILLAR *et al.*, 2016). O controle desses fatores, tais como umidade, aeração, temperatura, disponibilidade de nutrientes (relação C/N), pH e tamanho das partículas, são fatores predominantes para o estabelecimento da microbiota, pois otimizam as condições ótimas para o desenvolvimento microbiano e a degradação da matéria orgânica (KUOK; MIMOTO; NAKASAKI, 2012).

Figura 1– Fases da Compostagem



Fonte: D'ALMEIDA; VILHENA (2000).

A formulação de um bom composto deve atender a relação C/N ideal para cada tipo de espécie de cogumelo comestível. Dessa forma, é necessário que se obtenha uma escolha criteriosa dos materiais vegetais, capins e palhas que atendam essa relação. No entanto, em condições naturais destes materiais, se não houver o processo de compostagem, microrganismos como os mesófilos prevalecerão sobre o sistema, consumindo o açúcar do meio e assim impedindo o crescimento dos cogumelos (EIRA, 2000).

Ainda não há relatos de produção de *Lentinula edodes* em substratos compostados, mas a compostagem, seguida de pasteurização e condicionamento (compostagem fase I e fase II), está bem estabelecida e desenvolvida para o cultivo de *Agaricus spp.* e *Pleurotus spp.*, sendo que, para estes últimos, a compostagem é feita em períodos mais curtos (VIEIRA; PECCHIA, 2018).

## REFERÊNCIAS

- APTA: AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS (2016). Disponível em: <http://www.aptaregional.sp.gov.br/noticias/primeiro-censo-paulista-decogumelos-comestiveis-e-medicinais-e-realizado-em-sao-paulo.html>. Acesso em 01 de Julho de 2022.
- ASGHER, M et al. Recent developments in biodegradation of industrial pollutants by white rot fungi and their enzyme system. **Biodegradation**, v. 19, n. 6, p. 771, 2008.
- ATHAYDE, M. B. et al. Influência da temperatura no crescimento micelial de linhagens de *Lentinula edodes* (Berk.) pegler Temperature influence on the mycelial growth of *Lentinula edodes* strains. **Ambiência**, v. 6, n. 3, p. 503-509, 2010.
- ATILA, F. Cultivation and Utilization of Shiitake Mushroom. **Medicinal Plants**. Springer, Cham, p. 383-413, 2021.
- BERNAL, M. P.; ALBURQUERQUE, J. A.; MORAL, R. Composting of animal manures and chemical criteria for compost maturity assessment: a review. **Bioresource Technology**, Essex, v. 100, n. 22, p. 5444-5453, 2009.
- CHANG, SHU-TING; MILES, PHILIP G. **Mushrooms: cultivation, nutritional value, medicinal effect, and environmental impact**. 2.ed. Boca Raton: CRC PRESS, 2004.
- CRAVO, C. L. C. F. **Cogumelos e os seus efeitos nutricionais**. Trabalho de Conclusão de Curso, 19 p., Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2014.
- COELHO, R. P. P. **Produção de cogumelos exóticos em Portugal**. Tese de Doutorado, 165p., Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2019.
- D'ALMEIDA, M. L. O.; VILHENA, A. **Lixo municipal: manual de gerenciamento integrado**. 2. Ed. São Paulo: IPT/CEMPRE, 2000.
- SIQUEIRA, F. G. de. et al. Biological efficiency of *Agaricus brasiliensis* cultivated in compost with nitrogen concentrations. **Horticultura Brasileira**, v. 29, p. 157-161, 2011.
- DIAS, E. S. Mushroom cultivation in Brazil: challenges and potential for growth. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 34, p. 795-803, 2010.
- EIRA, A. F. **Cultivo de cogumelos (compostagem, condução e ambiente)**. Anais da III Reunião Itinerante de Fitossanidade do Instituto Biológico, p. 83-95, 2000.
- EIRA, A. F.; MONTINI, R. M. C. Manual de cultivo do shiitake (*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler). **Botucatu: FEPAF**, 1997.

- FREDERICO, C. E. et al. Produção de Shiitake (*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler em Substratos à Base de Sabugo de Milho. In: XXIV CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 24., 2002, Florianópolis
- FIGUEIRÓ, G.G; GRACIOLLI, L.A. Influência da composição química do substrato no cultivo de *Pleurotus florida*. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, p. 924-930, 2011.
- FROUFE, H. J.; ABREU, R.; FERREIRA, I. C. Valorização de cogumelos silvestres como alimentos funcionais: estudos de química computacional. In: WORKSHOP EM BIOINFORMÁTICA. ESCOLA SUPERIOR AGRÁRIA DE BRAGANÇA, 6., 2011, Bragança.
- HIROMOTO, B.T. Comparative analysis of shiitake culture systems, Mahler, M. (ed.). Proceedings of the 13<sup>th</sup> Mushroom Science. **Science and Cultivation of Edible Fungi**, vol 2. Balkema, Rotterdam, p. 489-496, 1991.
- KHAN, A. A. et al. Biological and pharmaceutical activities of mushroom  $\beta$ -glucan discussed as a potential functional food ingredient. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, v. 16, p. 1-13, 2018.
- KUOK, F.; MIMOTO, H.; NAKASAKI, K. Effects of turning on the microbial consortia and their in situ temperature preferences of microorganisms in a laboratory-scale swine manure composting. **Bioresource Technology**, v. 116, p. 421-427, 2012.
- KWON, H. W.; YUN, Y. H.; KIM, S. H. First report of brown rot caused by *Cryptococcus pseudolongus* on Fruiting Body of Shiitake (*Lentinula edodes*) (Berk.) Pegler in Korea 2. **Korea**, v. 7, p. 8, 2016.
- MACIEL, W. P. **Cultivo de *Lentinula edodes* em diferentes condições de substrato e temperatura**. Dissertação de Mestrado, 35 p., Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.
- MAHDIZADEH, V. et al. Substrate preference of Shiitake *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler strains. **Journal of Crop Protection**, v. 10, n. 1, p. 63-74, 2021.
- MATOS, A. T. D. et al. Compostagem de alguns resíduos orgânicos, utilizando-se águas residuárias da suinocultura como fonte de nitrogênio. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 2, p. 199-203, 1998.
- MAZIERO, R.; ZADRAZIL, F. Effects of different heat pre-treatments of wheat straw on its microbial activity and colonization by different tropical and sub-tropical edible mushrooms. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 10, n. 4, p. 374-380, 1994.
- MONTINI, R. M. C. **Efeito de linhagens e substratos no crescimento miceliano e na produtividade em cultivo axênico de shiitake (*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler)**. Tese de Doutorado (Doutorado em Agronomia), 106 p. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, São Paulo, 2001.

MORALES, V; SÁNCHEZ, J. E. Self-heating pasteurization of substrates for culinary-medicinal mushrooms cultivation in Mexico. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 19, n. 5, 2017.

OEI, P. **Mushroom cultivation: appropriate technology for mushroom growers.**

Backhugs Publishers, Leiden, The Netherlands, 2003.

PASCHOLATI, S. F. et al. **Produção de shiitake em toras de eucalipto.** 52 p., ESALQ/Casa do Produtor Rural, 2014.

PHILIPPOUSSIS, A. et al. Composition and Porosity of Lignocellulosic Substrates Influence Mycelium Growth and Respiration Rates of *Lentinus edodes* (Berk.) Pegler Sing. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 3, n. 2-3, 2001.

REZZADORI, K; BENEDETTI, S. Proposições para valorização de resíduos do processamento do suco de laranja. *In: INTERNATIONAL WORKSHOP ADVANCES IN CLEANER PRODUCTION*, São Paulo, 2009.

RIBEIRO, N. D. Q. et al. Microbial additives in the composting process. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 41, p. 159-168, 2017.

ROSSETO, E.; PIEROBOM, C.; ROCHA, M. T. DESINFESTAÇÃO DE COMPOSTO PARA CULTIVO DE COGUMELO *Agaricus bisporus* (Lange) Imbach. **Current Agricultural Science and Technology**, v. 2, n. 3, 1996.

ROSSI, I. H.; MONTEIRO, A. C.; & MACHADO, J. O. Desenvolvimento micelial de *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler como efeito da profundidade e suplementação do substrato. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, n. 6, p. 887-891, 2001.

ROYSE, D. J.; BAARS, J.; TAN, Q. Current overview of mushroom production in the world. **Edible and medicinal mushrooms: technology and applications**, p. 5-13, 2017.

SACOMANI, F.R; TONIN, F.B. Viabilidade econômica da produção de cogumelo shimeji de um pequeno produtor em Botucatu em micro escala. *In: JORNACITEC*, 6., 2016, Botucatu.

SÁNCHEZ, J. E.; ZIED, D.; ALBERTÓ, E. Edible mushroom production in the Americas. *In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON MUSHROOM BIOLOGY AND MUSHROOM PRODUCTS*, 9., 2018, Shanghai, China.

SEO, D. S.; KOO, C. D. **Effect of temperature to rooting of *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler in surface cultivation.** Journal of Korean Forest Society. 2009.

SHIOMI, H. F. et al. Thermal and mechanical shocks affecting the first flush of production of *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler on *Eucalyptus saligna* logs. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 200-203, 2007.

SOUZA, T. P. et al. Analysis of thermophilic fungal populations during phase II of composting for the cultivation of *Agaricus subrufescens*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.30, p. 2419-2425, 2014

STAMETS, P. **Growing gourmet and medicinal mushrooms**. 3. ed. Berkeley: Ten Speed Press, 2000.

TONINI, R. C. G. et al. Utilização de bainha mediana de palmito (*Euterpe edulis*) Mart. Arecaceae como substrato de frutificação para o cultivo axênico de *Lentinula edodes* (Berck.) Pegler. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. S2, p. 204-206, 2007.

VIEIRA, F. R.; PECCHIA, J. A. An exploration into the bacterial community under different pasteurization conditions during substrate preparation (composting–phase II) for *Agaricus bisporus* cultivation. **Microbial ecology**, v. 75, n. 2, p. 318-330, 2018.

VILLAR, I.; ALVES, D.; GARRIDO, J.; MATO, S. Evolution of microbial dynamics during the maturation phase of the composting of different types of waste. **Waste Management**, v. 54, p. 83-92, 2016.

WASSER, S. P. Shiitake (*Lentinus edodes*) (Berck.) Pegler. **Encyclopedia of dietary supplements**, University of Haifa, Haifa, Israel, p. 653-664, 2005.

ZIED, D. C. et al. Selection of strains for shiitake production in axenic substrate. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 32, n. 10, p. 1-6, 2016.

## CAPÍTULO 2

### PRODUTIVIDADE DO COGUMELO *Lentinula edodes* EM FUNÇÃO DO SUBSTRATO DE CULTIVO, COMPOSTAGEM E TRATAMENTO TÉRMICO

#### RESUMO

Produzir o próprio substrato de shiitake requer um nível de investimento normalmente inacessível ao pequeno produtor. Neste contexto, duas alternativas merecem ser consideradas: a pasteurização severa do substrato e a compostagem curta seguida de pasteurização. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar o índice de contaminação e a produtividade de shiitake em uma série de ensaios de compostagem e tratamentos térmicos para a escolha de um método de menor custo para a produção do substrato de cultivo deste fungo. Em primeiro momento, realizou-se uma pasteurização severa sem compostagem do substrato, avaliando o tempo de pasteurização em comparação com a autoclavagem. Os tratamentos foram: a- autoclavagem; b- pasteurização de 12 horas seguida de autoclavagem; c- apenas 12 horas de pasteurização; d- pasteurização de 24 horas, seguida de autoclavagem; e- apenas 24 horas de pasteurização; f- pasteurização de 36 horas, seguida de autoclavagem; apenas 36 horas de pasteurização. No segundo experimento, avaliou-se o tempo de compostagem e o tempo de pasteurização, utilizando dois substratos: a- bagaço de cana + serragem + farelo de trigo; e b- serragem + farelo de trigo. Neste experimento foram 3 tempos de compostagem (4, 5 e 6 dias) e 3 tempos de pasteurização (12, 24 e 36 horas). O terceiro experimento ocorreu com o propósito de avaliar o efeito de linhagem para o substrato à base de serragem compostado por 4 dias e pasteurizado por 36 horas. Por último, foi avaliada a corrida micelial do fungo e o índice de contaminação no substrato à base de bagaço de cana e serragem com 3 tempos de compostagem (4, 6 e 8 dias) e 4 tratamentos térmicos (pasteurização de 12 h; autoclavagem de 1, 2 e 3 h). Para tratamento de pasteurização, considerou-se o início do processo quando a temperatura no interior do bloco atingiu 80°C. Para os tratamentos de autoclavagem, utilizou-se o procedimento convencional (121°C/1 atm). Os processos de inoculação, colonização, formação da capa marrom e frutificação seguiram os procedimentos convencionais recomendados para o cultivo deste cogumelo. Como resultados, a pasteurização severa de 24h do substrato não compostado apresentou-se eficiente quanto ao índice de contaminação. Entretanto, para o sistema de compostagem de 4 dias, foi necessária uma pasteurização de 36 horas para o bom controle dos contaminantes. Por outro lado, para o processo de compostagem por 6 dias, a pasteurização de 12 horas foi tão ou mais eficiente do que a autoclavagem no controle da contaminação. Portanto, a pasteurização severa de 24h para o substrato não compostado e a pasteurização severa de 12h para o substrato compostado mostraram-se promissoras para a produção do substrato de cultivo do shiitake. Observou-se ainda um efeito de linhagem para o substrato compostado, o que indica que algumas linhagens podem ser mais produtivas que outras neste tipo de substrato. Entretanto, os dados não foram conclusivos.

Palavras-Chave: Pasteurização severa. Substrato compostado. Shiitake.

## ABSTRACT

Producing the own shiitake substrate requires a level of investment normally inaccessible to small producers. In this context, two alternatives deserve to be considered: severe pasteurization of the substrate and short composting followed by pasteurization. Thus, the aim of this research was to evaluate the contamination index and productivity of shiitake in a series of composting tests and thermal treatments to choose a lower cost method for the production of the cultivation substrate of this fungus. At first a severe pasteurization was carried out without the composting substrate, evaluating the pasteurization time in comparison with autoclaving. The treatments were: a- autoclaving; b- 12-hour pasteurization followed by autoclaving; c- only 12- hour pasteurization; d- 24-hour pasteurization; and e- only 36-hour pasteurization. In the second experiment, the composting time and the pasteurization time were evaluated, using two substrates: a- sugarcane bagasse + sawdust + wheat bran; and b- sawdust + wheat bran. In this experiment, three composting periods (4, 5 and 6 days) and three pasteurization periods (12, 24 and 36 hours) were tested. The third experiment was carried out with the purpose of evaluating the strain effect for the sawdust-based substrate composted for 4 days and pasteurized for 36 hours. Lastly, the mycelial run of the fungus and the contamination index in the substrate based on sugarcane and sawdust were evaluated with 3 composting periods (4, 6 and 8 days) and 4 thermal treatments (12-hour pasteurization; autoclaving of 1, 2 and 3 hours). For the pasteurization treatment, the beginning of the process was considered when the temperature inside the block reached 80°C. For autoclaving treatments, the conventional procedure was used (121°C/1 atm). The inoculation, colonization, brown film formation and fruiting processes followed the conventional procedures recommended for the cultivation for this mushroom. As a result, the 24-hour severe pasteurization of the non-composted substrate was efficient in terms of the contamination index. However, for the 4-day composting system, a 36-hour pasteurization was necessary for the good control of contaminants. On the other hand, for the 6-day composting process, 12-hour pasteurization was as efficient as autoclaving in contamination controlling. Therefore, the 24-hour severe pasteurization for the non-composted substrate and the 12-hour severe pasteurization for the composted substrate showed to be promising for the production of the shiitake cultivation substrate. A strain effect was also observed for the composted substrate, which indicates that some strain might be more productive than others in this type of substrate.

Keywords: Severe pasteurization. Thermophilic microorganisms. Temperature.

## 1 INTRODUÇÃO

O cogumelo shiitake está entre as três espécies mais cultivadas no Brasil e apresenta grande potencial de crescimento no mercado brasileiro. É um dos fungos mais cultivados no mundo, com cerca de 22% da produção entre todos os cogumelos comestíveis, graças às suas propriedades gastronômicas e medicinais (ROYSE *et al.*, 2017; KWON, *et al.*, 2018).

*Lentinula edodes* já foi muito cultivado em toras de madeira, principalmente de eucalipto e castanheira, porém, com o tempo, o cultivo migrou para o sistema de cultivo axênico, utilizando a serragem como ingrediente principal. Nos últimos 20 anos, alguns trabalhos têm abordado a substituição parcial ou total da serragem por subprodutos da agroindústria. Mahdizadeh *et al.* (2021) obtiveram resultados satisfatórios em blocos axênicos de palha, serragem e farelo de arroz com várias linhagens de shiitake. O bagaço de cana é um material utilizado tradicionalmente no cultivo de cogumelos no Brasil e pode ser também uma boa alternativa para o cultivo de shiitake. De acordo com a CONAB (2022), até o final de 2022, o Brasil produzirá 572.874,9 mil toneladas de cana de açúcar. Grande parte deste montante já tem vários tipos de utilização, principalmente como combustível nas usinas de álcool e cachaça, dentre outros. Apesar disso, o bagaço de cana continua sendo um dos principais ingredientes utilizados para a produção do substrato de cultivo de cogumelos no país.

Em geral, o desenvolvimento da fungicultura no Brasil ainda depende de investimentos tecnológicos, tanto no âmbito das condições sociais como nos aspectos geográficos dos produtores. Entretanto, o cultivo deste cogumelo tem como um dos grandes gargalos a logística para o fornecimento do substrato de cultivo, uma vez que poucas empresas prestam este serviço no país. Neste contexto, uma das alternativas para produtores em regiões mais distantes é a produção do seu próprio substrato para o cultivo do shiitake. Entretanto, esta opção enfrenta o desafio do investimento necessário para a infraestrutura, principalmente, de esterilização do substrato.

Uma alternativa amplamente conhecida para a produção do substrato de cultivo é a pasteurização severa do substrato não compostado. Esta estratégia conta com a grande vantagem de economia de tempo e mão-de-obra, uma vez que basta preparar o substrato e submeter ao tratamento térmico. Em função disso, esta estratégia deve servir de referência para quaisquer estudos alternativos para a produção do substrato de cultivo do shiitake. Evidentemente, deve-se considerar a necessidade de se avaliar o tempo necessário para o controle total da contaminação, o que pode variar muito em função da qualidade do material utilizado na formulação do substrato.

Outra alternativa amplamente utilizada, é a utilização do processo de compostagem curta, seguida de pasteurização a vapor, tradicionalmente utilizado para o cultivo dos cogumelos ostra. Entretanto, o grande desafio para este sistema é o fato de que o *Lentinula edodes* não cresce bem em substratos compostados. Chang & Miles (2004) relataram a importância de se trabalhar com substratos fermentados por microrganismos termofílicos, uma vez que a presença desses microrganismos poderia tornar o substrato menos sujeito a contaminantes e mais seletivo para o cogumelo, como ocorre com espécies de *Pleurotus* e *Agaricus*. Entretanto, desde então, não se encontrou nenhum estudo relatando a tentativa de avançar nesta área de estudo. Isto mostra, evidentemente, o desafio de se cultivar o shiitake em substratos compostados. *L. edodes* é uma espécie saprófita, sendo considerado um fungo de podridão branca por ter a capacidade de degradar celulose, lignina e outras macromoléculas (ASGHER *et al.*, 2008). Mas, além disso, observa-se que este fungo age também como um decompositor primário, de modo que não cresce bem em substratos que tenham passado por uma fermentação prévia. Portanto, além de se buscar uma tecnologia alternativa para a produção do substrato de cultivo de shiitake, o presente trabalho relata a primeira tentativa de cultivo deste cogumelo em substrato fermentado, buscando compreender também o efeito da presença de outros microrganismos neste substrato sobre o crescimento de *L. edodes*.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Produção dos inoculantes

Foram utilizadas linhagens de *Lentinula edodes* pertencentes à Micoteca do Laboratório de Cogumelos Comestíveis da Universidade Federal de Lavras, local onde foram realizados todos os experimentos. As culturas de *L. edodes* (linhagem LECAR), foram reativadas em meio de cultura BDA a 25° C. Para o preparo do *Spawn*, foi utilizado substrato à base de arroz com casca, enriquecido com 2% de farelo de trigo e 2% de calcário calcítico. O substrato foi acondicionado em frascos de vidro, com capacidade para 400g cada. Para a proteção dos frascos, foram utilizadas tampas furadas e vedadas com fita *micropore* para permitir trocas gasosas. Os frascos foram autoclavados por 2 horas, a 121 °C. Depois de 24h, foram inoculados com 4 discos de 5 mm de diâmetro das colônias cultivadas em BDA. Os frascos foram incubados à temperatura de 25 °C±3°C, até a sua completa colonização. Após a colonização, os frascos foram mantidos em câmara fria até a sua utilização.

### 2.2 Uso da pasteurização severa e/ou autoclavagem no controle da contaminação em substrato não compostado

Os substratos foram preparados de acordo com Zied *et al.* (2016), com pequenas modificações: serragem (70%), farelo de arroz (10%), farelo de trigo (10%), fubá (5%), calcário calcítico (5%), 65% de umidade. Após o preparo, o substrato foi acondicionado em sacos de polietileno de alta densidade (PEAD) com filtro para troca gasosa (2 kg/saco), seguindo-se os procedimentos padrões. Os tratamentos térmicos foram conduzidos em diferentes tratamentos, conforme descrito na Tabela 1.

Para cada tratamento foram utilizadas 10 repetições, sendo cada bloco considerado como uma repetição. Para os tratamentos de pasteurização, considerou-se para início do processo, quando a temperatura no interior do bloco atingiu 80°C. Para isto, 5 blocos receberam sensores para permitir o monitoramento da temperatura.

Para o processo de esterilização em autoclave, utilizou-se o procedimento convencional a uma temperatura de 121°C a 1 atm, em dois períodos de 2 h, com um intervalo de 24h para o segundo período de autoclavagem. Após resfriamento do substrato, os sacos foram inoculados com 2% de *Spawn*, utilizando a linhagem LeCAR.

Tabela 1 – Tratamentos térmicos avaliados para desinfestação ou esterilização do substrato de cultivo do cogumelo shiitake.

Tratamentos	Pasteurização (h)	Autoclavagem (h)
Controle	-	2 + 2 (intervalo de 24h)
T1	12	-
T2	12	2
T3	24	-
T4	24	2
T5	36	-
T6	36	2

Fonte: Do autor (2022).

## 2.3 Utilização do processo de compostagem e pasteurização a vapor para a produção do substrato de cultivo de *Lentinula edodes* em sistema fechado

### 2.3.1 Formulação dos substratos

Duas formulações foram utilizadas para o ensaio de compostagem, sendo uma utilizando serragem como ingrediente principal, conforme descrito anteriormente, e a outra utilizando serragem (35%) e bagaço de cana (35%). Os suplementos utilizados seguiram exatamente as mesmas proporções nas duas formulações.

### 2.3.2 Processo de compostagem e pasteurização

Todos os experimentos foram conduzidos em bombonas de 50 L, que denominamos como sistema fechado, com o propósito de permitir a elevação da temperatura, uma vez que, em função do elevado número de experimentos, foi necessário trabalhar com volumes menores do que normalmente utilizado em experimentos de compostagem. Posteriormente, os ensaios foram validados em volume maior de compostagem. As bombonas utilizadas apresentam capacidade para cerca de 12 kg de substrato seco. Em todos os experimentos, a umidade do substrato foi ajustada para um valor teórico de 65%. Os ingredientes e a água foram misturados em betoneira durante 5 minutos para uniformização do material. Após a mistura, os substratos foram transferidos para as bombonas e protegidas para evitar a entrada de moscas (FIGURA 1).

Após a montagem dos blocos, estes foram colocados em uma caixa de 1000 L (Figura 2), onde para cada ensaio, os blocos foram dispostos de forma aleatória. Para o controle de temperatura, foram utilizados 5 sensores no interior dos blocos em diferentes posições da caixa (base, topo, meio, lateral direita, lateral esquerda), sendo o tempo de início da pasteurização contado quando a temperatura atingiu 80°C nos 5 blocos amostrados. Para este ensaio, utilizou-se o tempo de 36 h de pasteurização. Como controle, foi utilizada também a autoclavagem, conforme descrito anteriormente.

Após a pasteurização e autoclavagem, os blocos foram retirados e mantidos a temperatura ambiente até o seu resfriamento abaixo de 30°C. Os blocos foram inoculados conforme descrito anteriormente, em condições assépticas.

Figura 1 – Bombonas utilizadas para a produção do substrato de cultivo de *Lentinula edodes* em sistema fechado.



Fonte: Do autor (2022).

Após a montagem dos blocos, estes foram colocados em uma caixa de 1000 L (Figura 2), onde para cada ensaio, os blocos foram dispostos de forma aleatória. Para o controle de temperatura, foram utilizados 5 sensores no interior dos blocos em diferentes posições da caixa (base, topo, meio, lateral direita, lateral esquerda), sendo o tempo de início da pasteurização contado quando a temperatura atingiu 80°C nos 5 blocos amostrados. Para este ensaio, utilizou-se o tempo de 36 h de pasteurização. Como controle, foi utilizada também a autoclavagem, conforme descrito anteriormente. Após a pasteurização e autoclavagem, os blocos foram retirados e mantidos a temperatura ambiente até o seu resfriamento abaixo de 30°C. Os blocos foram inoculados, em condições assépticas, com cerca de 20g de inóculo, o qual foi disposto na parte superior do substrato, com parte caindo pelas laterais.

Figura 2 – Equipamentos utilizados para pasteurização.



Legenda: A figura superior mostra uma das autoclaves, de onde sai a mangueira que conduz o vapor para a caixa água, mostrada na figura inferior.  
Fonte: Do autor (2022).

### 2.3.3 Efeito da frequência de reviragem do substrato durante o processo de compostagem

Este ensaio foi conduzido com o propósito de avaliar o efeito da reviragem do substrato, uma vez que o período de compostagem é muito curto. Em ensaios preliminares, definiu-se que a compostagem deve ser inferior igual ou inferior a 6 dias, uma vez que, ao exceder este tempo, a colonização do substrato por *L. edodes* não foi bem sucedida. Desta forma, definiu-se a princípio pelo tempo de 4 dias de compostagem, definindo-se o dia de início como o dia 0 (zero) e o dia de término como o dia 4. Os seguintes tratamentos foram avaliados: T1- Reviragem diária, T2- Apenas uma reviragem no dia 2, T3- Nenhuma reviragem. Utilizou-se a formulação a base de serragem suplementada com farelos e calcário, seguindo-se todos os procedimentos,

conforme descrito anteriormente, para o preparo do substrato. Amostras foram obtidas em diferentes camadas de cada tratamento (camada superior, camada intermediária e camada inferior) para posterior análise de pH nos dias 0 e 4. A temperatura foi também aferida nas mesmas camadas no 4º dia do processo.

Ao final do processo de compostagem, o substrato foi misturado em betoneira por 5 minutos para a uniformização do material. O substrato foi acondicionado em sacos de PEAD com filtro para troca gasosa (2 kg/saco). Os sacos foram pasteurizados a 80°C por 36h e, após o resfriamento, inoculados conforme descrito anteriormente.

### **2.3.4 Efeito do tempo de compostagem sem reviragem do substrato**

Este ensaio seguiu o mesmo procedimento do ensaio conduzido para avaliar o efeito da frequência de reviragem, com intuito de avaliar o efeito do tempo de compostagem sem fazer a reviragem. Ensaio preliminares demonstraram que tempos inferiores a 4 dias e superiores a 6 dias não apresentaram boa colonização ou contaminaram muito. Por isso, neste ensaio foram testados os seguintes tratamentos: T1- 4 dias de compostagem, T2- 5 dias de compostagem, T3- 6 dias de compostagem. Ao final de cada tratamento, parte dos blocos foi destinada à pasteurização (80°C/36h) e outra parte foi destinada à autoclavagem (121°C/4h), com 8 repetições. Todos os demais procedimentos foram conduzidos, conforme descrito anteriormente.

### **2.3.5 Efeito de linhagens sobre o crescimento micelial e frutificação de *L. edodes* em substrato compostado e pasteurizado a vapor**

Este experimento foi realizado com o objetivo de avaliar a produtividade de diferentes linhagens de *L. edodes* em substrato compostado a base de serragem e farelos, com 4 dias de compostagem, sem reviragem e 36 h de pasteurização. Para este ensaio foram testadas as linhagens pertencentes à coleção de culturas do Laboratório de Cogumelos Comestíveis, denominadas LECAR, EIRA, ATIBAIA, CAMBUÍ e LE6. Todos os demais procedimentos foram conduzidos, conforme descrito anteriormente.

## 2.4 Utilização do processo de compostagem e pasteurização a vapor para a produção do substrato de cultivo de *Lentinula edodes* em sistema aberto, de maior escala

Este experimento teve o objetivo de validar os ensaios anteriores, nos quais utilizou-se pequenos volumes de substrato durante a compostagem. Para estes ensaios, em vez de se utilizar apenas 12 kg de substrato seco, cada formulação contou com 150 kg de substrato seco, permitindo simular as condições de compostagem em escala normal. Para isto, foram testadas duas formulações, uma à base de serragem como principal ingrediente e outra com a inclusão de bagaço de cana, utilizada em igual proporção da serragem, conforme descrito também anteriormente, exceto que a suplementação foi feita apenas com 20% de farelo de trigo e 4% de calcário. Por essa razão o bagaço utilizado para este experimento foi primeiro triturado em máquina para preparo de silagem e depois moído em um triturador TN-4 elétrico, da marca Nogueira com rotação de 3,300 RPM, até que a maior parte do material atingisse uma granulometria próxima à granulometria da serragem. Uma amostra foi retirada e passada por diferentes peneiras granulométricas para avaliar e comparar com a granulometria da serragem. Conforme os dados apresentados na Tabela 2, 39% do bagaço de cana apresentou fragmentos com tamanho superior a 2,38 mm, chegando até 10 mm de tamanho, porém, 61% do material apresentou granulometria próxima à da serragem.

Tabela 2 – Análise granulométrica do bagaço de cana, após a trituração, em comparação com a serragem de eucalipto.

Abertura da peneira		Proporção de cada granulometria	
		Material	
+Mesh	mm	Bagaço de cana	Serragem
8	2,38	39%	2,15%
16	1,19	37%	7,50%
28	0,59	18,50%	16,17%
35	0,42	3,45%	19,75
65	0,21	0,75%	36,25%
≥200	≤0,074	1,30%	18,18%

Fonte: Do autor (2022).

### 2.4.1 Compostagem e pasteurização

Para as duas formulações de composto, o material foi previamente umedecido para apresentar cerca de 65% de umidade. Para isso, a água foi adicionada aos poucos e, à cada etapa, uma amostra da mistura foi tirada e apertada entre os dedos para aferir a umidade. Após isso, os suplementos (farelo de trigo e calcário) foram adicionados e a umidade novamente aferida, adicionando água quando necessário. Por fim, foi montada a pilha de compostagem, utilizando-se uma estrutura de madeira, cujas medidas apresentavam 1 m x 1 x 1m (largura x comprimento x altura) (Figura 3). A compostagem foi conduzida por até 8 dias, sendo feitas as reviragens nos dias 2, 4 e 6. Em cada reviragem, a temperatura foi aferida e amostras foram retiradas para análise do Ph e teor de umidade. Quando necessário, a umidade foi corrigida na reviragem subsequente, adicionando-se água de acordo com o resultado preliminar. Nos dias 4 e 6 da compostagem, uma parte de cada substrato foi utilizada para preparar blocos de 1,5 e 2 kg para os substratos à base de serragem + bagaço e serragem, respectivamente. Após 8 dias, a compostagem foi encerrada e o material restante foi utilizado para o preparo de novos blocos. De todos os blocos produzidos de cada tratamento de formulação foram separadas unidades para os tratamentos térmicos, conforme descrito na tabela 3, com 6 repetições. O modelo de pasteurização neste experimento foi o mesmo representado anteriormente na compostagem em sistema fechado.

Após o resfriamento do substrato, os blocos foram inoculados conforme descrito anteriormente e incubados a temperatura ambiente para colonização do substrato e formação da capa marrom. Durante este período, avaliou-se o índice de contaminação dos blocos e a velocidade de colonização do substrato, a qual foi definida pelo número de dias necessários para a completa colonização do substrato.

Para indução da frutificação, os blocos de substrato colonizado foram retirados de dentro dos sacos de PEAD e transferidos para sala à temperatura de 18 a 20°C e umidade relativa do ar de 90%±5. Após o início da frutificação, a colheita dos cogumelos ocorreu diariamente. Os cogumelos foram coletados e levados ao laboratório para pesagem e registro dos dados.

Após cada fluxo de produção, os blocos foram transferidos para sala a temperatura ambiente e mantidos em repouso por 15 dias. Após este período os blocos foram completamente imersos em água à temperatura de 18 a 20° C por 24h, com o objetivo de garantir a reidratação do substrato. Após a imersão, os blocos foram novamente transferidos para o ambiente adequado para a frutificação.

Figura 3 – Estrutura e composto final para a produção de 37hitake em sistema aberto.



Fonte: Do autor (2022).

Tabela 3 – Tempo de pasteurização e compostagem dos substratos obtidos por compostagem usando as formulações à base de serragem ou serragem + bagaço de cana.

Tempo de compostagem	Pasteurização	Autoclavagem
4 dias	12 h	-
	24 h	-
	36 h	-
	-	1 h
	-	2 h
	-	3 h
6 dias	12 h	-
	24 h	-
	36 h	-
	-	1 h
	-	2 h
	-	3 h
8 dias	12 h	-
	24 h	-
	36 h	-
	-	1 h
	-	2 h
	-	3 h

Legenda: Autoclavagem (121° C); Pasteurização (80°C).

Fonte: Do autor (2022).

Figura 4 – Frutificação de *Lentinula edodes* em bloco compostado.



Fonte: Do autor (2022).

A produção dos cogumelos foi expressa por meio da produtividade (P) e eficiência biológica (EB), de acordo com as equações abaixo, conforme DIAS et al., (2003).

$$P (\%) = \frac{\text{Massa fresca de cogumelos (g)}}{\text{Massa úmida do substrato inicial (g)} \times 100}$$

$$EB (\%) = \frac{\text{Massa fresca de cogumelos (g)}}{\text{Massa seca do substrato inicial (g)} \times 100}$$

Os resultados foram agrupados e submetidos à análise de variância pelo teste F e, quando significativos, ao teste de Skott Knott para a comparação entre as médias. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2011).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Uso da pasteurização severa e/ou autoclavagem para o tratamento do substrato não compostado

Os resultados referentes aos índices de contaminação dos blocos estão representados na Tabela 4. De todos os tratamentos avaliados, apenas o tratamento com 12h de pasteurização a 80° C apresentou contaminação de todos os blocos. Para os demais, exceto para Pasteurização 24h + autoclave 2h, observou-se um índice de 10% de contaminação, até mesmo para o tratamento de autoclavagem, o que qual foi utilizado como controle e considerado como o mais efetivo. Portanto, os resultados demonstram que, para o substrato não compostado, deve-se utilizar pelo menos 24h de pasteurização para o controle da contaminação no substrato de cultivo de *L. edodes*.

Tabela 4 – Índice de contaminação dos blocos em função dos tratamentos térmicos.

Tratamento térmico	Índice de contaminação (%)
Pasteurização 24h + autoclave 2h	0
Controle- Autoclave 2h + 2h	10
Pasteurização 12h + autoclave 2h	10
Pasteurização 24h	10
Pasteurização 36h	10
Pasteurização 36h + autoclave 2h	10
Pasteurização 12h	100

Fonte: Do autor (2022).

Além do controle da contaminação, é importante observar também a capacidade do fungo colonizar o substrato. Para o presente trabalho, avaliou-se o tempo necessário para a completa colonização do bloco de substrato. Observou-se que a autoclavagem apresentou um efeito positivo sobre a colonização do substrato, uma vez que todos os tratamentos que incluíram a autoclavagem proporcionaram colonização mais rápida quando comparados aos tratamentos que receberam apenas a pasteurização (TABELA 5). Para os tratamentos de 24 e 36h de pasteurização, a colonização dos blocos completou-se com 13 dias de atraso, em relação aos blocos que receberam o tratamento de autoclavagem. É possível que o processo de

autoclavagem tenha contribuído para quebrar pelo menos parte da lignina presente no substrato. A explosão a vapor tem sido um dos métodos mais utilizados para promover a quebra da lignina em materiais lignocelulolíticos, com o propósito de tornar a celulose mais acessível para outros processos, dentre eles, a fermentação para a produção de etanol de segunda geração (Obame *et al.*, 2019; He *et al.*, 2020). Portanto, ainda que o processo de autoclavagem seja mais ameno do que o processo de explosão a vapor, é possível que a temperatura e a pressão utilizados (121° C/1 atm) tenha contribuído para uma quebra parcial da lignina. Com isso, o fungo pode ter um acesso mais rápido à celulose presente no substrato e assim ter crescido de forma mais rápida nos blocos autoclavados. Considerando que *L. edodes* é um fungo capaz de degradar lignina, a colonização do bloco aconteceu também nos blocos que foram apenas pasteurizados, porém, de forma mais lenta.

Tabela 5 –Tempo de corrida micelial, formação da capa marrom e produção de cogumelos nos blocos em função dos tratamentos térmicos.

Tratamentos	IC (%)	TCM	TFCM	P (%)	EB (%)
Past. 24h + autoclave 2h	0	32	94 dias	24,33 a	38,18 a
Controle	10	32	94 dias	9,66 b	14,87 b
Past. 12h + autoclave 2h	10	32	94 dias	29,84 a	45,91 a
Past. 24h	10	45	115 dias	24,82 a	47,71 a
Past. 36h	10	45	115 dias	31,01 a	39,80 a
Past. 36h + autoclave 2h	10	32	94 dias	25,87 a	31,19 a
Past. 12h	100	-	-	-	-

Legenda: IC: índice de contaminação; TCM: tempo de corrida micelial; TFCM: tempo de formação da capa marrom; P: produtividade; EB: eficiência biológica; Controle: autoclavado por 2 + 2 horas. Letras iguais nas colunas não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Skott Knott a 5% de probabilidade.

Fonte: Do autor (2022).

Segundo Royse (2009), um tempo de corrida micelial de 18 a 23 dias garante melhores resultados finais, entretanto, um tempo de 30 dias para a completa colonização dos blocos é considerada satisfatória. Uma das opções para reduzir o tempo de corrida micelial é misturar o inóculo em todo o substrato de forma uniforme. Para este trabalho, o inóculo foi colocado apenas na parte superior do substrato, em função do tamanho do saco e da quantidade de substrato utilizado (2,4kg/saco).

Naturalmente, o tempo para completar a formação da capa marrom também foi maior para os tratamentos de pasteurização apenas. A formação da capa marrom é um processo da maior importância, sendo considerada chave para a boa produtividade do bloco. Segundo Sousa *et al.* (2019), linhagens que apresentam formação muito tardia da capa marrom são menos produtivas. Este processo inicia-se após a finalização da corrida micelial, que resulta no escurecimento e formação de uma capa coriácea que protege o bloco contra o ressecamento, cumprindo, a grosso modo, o papel da casca do tronco, quando comparado ao cultivo em toras. Zied *et al.* (2016) relataram, em um estudo de seleção de linhagens de shiitake para o cultivo axênico, uma linhagem que não formou a capa marrom e também não produziu cogumelos.

Apesar da formação mais tardia da capa marrom nos tratamentos apenas pasteurizados, não se observou nenhum efeito negativo sobre a produção de cogumelos. Surpreendentemente, os menores valores de produtividade e eficiência foram obtidos no tratamento de autoclavagem apenas (controle). Na verdade, trata-se de um resultado difícil de explicar, uma vez que este tem sido o procedimento utilizado comercialmente, com ótimos resultados. Sabe-se que os experimentos com cogumelos apresentam elevado coeficiente de variação, o que faz com que, às vezes, não se observe diferença estatística entre os tratamentos. Isso foi observado entre os tratamentos de pasteurização quando comparados com a associação de pasteurização e autoclave. Entretanto, mesmo com elevado coeficiente de variação, os blocos apenas autoclavados foram significativamente inferiores aos tratamentos de pasteurização e autoclavagem ou apenas de pasteurização, em termos de produtividade e eficiência biológica, em função de algum fator desconhecido. Apesar disso, os resultados deixaram claro que a pasteurização a 80° C funcionou muito bem, tanto no controle da contaminação como na produção de cogumelos. Como pontos negativos destaca-se a maior demora na corrida micelial e na formação da capa marrom, além, é claro, da necessidade de estender o processo por, no mínimo, 24h.

Com respeito à eficiência biológica, observou-se que os maiores valores não coincidiram com os maiores valores de produtividade. É comum observar que um tratamento apresente a melhor produtividade, enquanto outro tratamento apresenta maior eficiência biológica. Isso pode ocorrer em função das diferenças no teor de umidade do substrato em cada tratamento. Apesar disso, tanto para produtividade como para eficiência biológica, as diferenças não foram significativas.

Coelho (2019), utilizando substrato à base de borra de café, observou que a colonização de *Pleurotus ostreatus* no substrato submetido à pasteurização foi semelhante àquela obtida no substrato esterilizado. Entretanto, para *P. citrinopileatus*, a colonização do fungo foi muito

melhor no substrato esterilizado, em comparação ao substrato pasteurizado. Isso mostra que espécies diferentes podem responder de modo diferente aos tratamentos térmicos. Possivelmente, para algumas espécies, a sobrevivência de, pelo menos, parte da microbiota no substrato, pode favorecer a colonização pelo fungo, enquanto que, para outras espécies ocorre o contrário. Apesar disso, mesmo a colonização sendo mais lenta, a eficiência biológica tendeu a ser a mesma para as duas espécies de *Pleurotus* entre os dois tratamentos térmicos.

### **3.2 Produtividade de *Lentinula edodes* em substrato compostado em sistema fechado**

#### **3.2.1 Efeito de reviragem sobre as características e qualidade do composto**

Os dados de pH, temperatura e teor de matéria seca dos substratos estão descritos na Tabela 6. Os dados referem-se aos tratamentos de reviragem nas diferentes camadas do composto, ao final de 4 dias de compostagem no substrato de serragem e farelos.

De modo geral, observou-se uma diminuição nos valores de pH em todas as camadas, entretanto, para o substrato revirado todos os dias, o pH manteve-se mais constante, caindo de 7,5 para 7,0 entre as camadas superior e inferior, respectivamente. Para os outros dois tratamentos, observou-se uma variação mais ampla de pH, indicando uma tendência de maior acidificação na camada mais profunda do substrato quando o mesmo não foi revirado. Apesar disso, o pH levemente ácido não constitui um problema, uma vez que *L. edodes* cresce melhor em pH entre 4,5 e 5,5 (PHILIPPOUSSIS *et al.*, 2001; MILES; CHANG, 2004). Maciel *et al.* (2012) relataram que a velocidade de crescimento de *L. edodes* diminuiu com a elevação do pH. Já Andrade (2012) observou baixa produtividade de shiitake produzido em toras tratadas com cal hidratada, relatando que este método pode causar o desbalanceamento de carbono, nitrogênio e fósforo, causando assim problemas no crescimento das hifas.

Não se observou grande elevação da temperatura durante o processo de compostagem. Ao final de 4 dias de compostagem, a maior temperatura foi observada na camada superior do substrato revirado diariamente (49,9°C). Mesmo para este tratamento, a temperatura caiu drasticamente nas camadas inferiores, inclusive na camada intermediária. A serragem é conhecida por não ser um substrato adequado para o processo termofílico de compostagem, provavelmente devido ao elevado conteúdo de compostos fenólicos (SANTOS *et al.*, 2011; SANTOS *et al.*, 2012). Apesar disso, chama a atenção o fato de a temperatura cair nas camadas inferiores, quando se espera que a mesma seja mantida ou até maior quando comparada à

camada superior. Provavelmente, este fato pode ser explicado pela aeração limitada no sistema utilizado, uma vez que o processo foi conduzido dentro de bombonas.

Tabela 6 – Dados de pH, temperatura, peso seco e umidade do substrato de cultivo do shiitake submetido a 4 dias de compostagem em sistema fechado, em função do número de reviragens.

Camadas	Reviragens Diárias	Uma reviragem	Nenhuma reviragem
pH			
Superior	7,5	7,5	6,9
Intermediária	7,2	6	6,9
Inferior	7,0	5,9	5,6
Temperatura (°C)			
Superior	49,9	40,9	46,7
Intermediária	35,4	28,6	38
Inferior	26,2	25	24,9
Peso seco (%)			
Superior	46,56	42,43	44,55
Intermediária	36,37	38,89	47,62
Inferior	41,67	40,68	41,35
Teor de umidade (%)			
Superior	53,44	57,57	55,45
Intermediária	63,63	61,11	52,38
Inferior	58,33	59,32	58,65

Fonte: Do autor (2022).

De acordo com os dados de temperatura coletados, o tratamento 3 (sem reviragens), apresentou valores mais próximos aos observados por Vieira e Pecchia (2018). Entretanto, para uma maior seletividade do composto de cultivo, espera-se que ocorra antes uma etapa termofílica, a qual é essencial para a eliminação de patógenos e para garantir maior estabilidade microbiana, de modo a prevenir o surgimento de contaminantes durante a colonização do substrato. Por outro lado, é amplamente conhecido que várias espécies de cogumelos, dentre eles, *L. edodes*, não desenvolvem bem em substratos compostados (CHANG; MILES, 2004), dada a sua natureza como decompositores primários. Portanto, a escolha do tempo de 4 dias de compostagem para os próximos experimentos, baseou-se em experimentos preliminares e por esta premissa de ser um degradador primário. Apesar disso, outro experimento foi conduzido

mais adiante com diferentes tempos de compostagem para avaliar a produção de cogumelos, porém, em maior escala e em sistema convencional, em vez de bombonas.

Observou-se uma tendência de acúmulo de umidade apenas no substrato não revirado, o que já era esperado. Apesar disso, o teor de umidade neste tratamento ainda manteve-se dentro dos limites desejáveis de umidade (55 e 60%), conforme descrito por Royse *et al.*, (2017). Entretanto, ao se trabalhar com o valor de 65% de umidade, pode ser muito importante fazer, pelo menos, uma reviragem durante o processo, para evitar anaerobiose na camada inferior do substrato. A reviragem do substrato é particularmente importante quando se trabalha com volumes maiores de substrato.

Uma observação importante no tratamento sem reviragem foi a ocorrência de uma intensa colonização por um fungo zigomiceto na parte superior do substrato (Figura 5). Fungos mesófilos costumam ocorrer durante as primeiras etapas da compostagem nas regiões mais externas, uma vez que estas costumam ser mais frias. Entretanto, essa ocorrência intensa costuma desaparecer ao longo do processo, provavelmente em função do esgotamento dos açúcares prontamente solúveis. Além deste contexto, o surgimento deste zigomiceto provavelmente foi favorecido pela falta de reviragens e também pelo fato de o substrato ter sido mantido coberto durante todo o tempo, o que favoreceu maior umidade na superfície do substrato. Esta é mais uma razão para que sejam feitas reviragens do substrato durante o processo de compostagem, em especial no caso de volumes maiores de substrato.

Não foram observadas diferenças significativas de colonização entre os substratos, em função das reviragens. Em outras palavras, a princípio, revirar o substrato durante a compostagem parece não afetar a qualidade do mesmo, para o tempo de compostagem de apenas 4 dias. Considera-se que a reviragem do substrato ao longo da compostagem seja importante para favorecer a aeração do substrato e promover maior homogeneidade. Este tipo de manejo é considerado essencial para o processo de compostagem, uma vez que trabalha-se com grandes volumes e longos períodos de tempo. Para o presente trabalho, o fato de trabalhar-se com um período muito curto de compostagem (4 dias), pode tornar possível eliminar a reviragem do composto. Entretanto, isso deverá ser validado futuramente para volumes maiores de composto. Neste contexto, conduzir a compostagem sem a necessidade de reviragem poderá significar uma enorme economia de mão de obra.

Em função dos resultados obtidos até aqui, optou-se por conduzir os próximos ensaios subsequentes sem fazer a reviragem do substrato.

Figura 5 – Espécie fúngica encontrada no tratamento sem reviragens



Fonte: Do autor (2022).

### 3.2.2 Efeito do tempo de compostagem sobre as características do composto

Não se observou grandes variações de pH e temperatura em função do tempo de compostagem para as duas formulações de substrato (Tabela 7), exceto para a formulação S+F, com 6 dias de compostagem, a qual apresentou o pH mais baixo. A formulação com bagaço de cana foi incluída neste experimento com a expectativa de que ocorresse uma elevação da temperatura, uma vez que a utilização apenas de serragem como ingrediente principal, normalmente não favorece a elevação da temperatura. Entretanto, mesmo com a adição do bagaço de cana, não se observou a elevação esperada da temperatura. É possível que a condução do processo dentro das bombonas tenha restringido a aeração e, conseqüentemente, limitado o crescimento dos microrganismos termofílicos.

O teor de umidade inicial dos substratos foi ajustado, para conter 65%. Para a formulação BC+S+F observou-se pequena variação em relação ao valor proposto inicialmente. Entretanto, para a formulação S+F, apenas o tratamento para o tempo de 6 dias de compostagem apresentou valor de umidade próximo ao valor teórico proposto, ao passo que os tratamentos de 4 e 5 dias ficaram com teor de umidade abaixo de 60%. Provavelmente, isso ocorreu porque o bagaço de cana tem maior capacidade de absorção de água e em função de que a umidade foi sendo aferida, à medida que se adicionava água, apertando uma pequena porção do substrato entre os dedos. Como a serragem absorve menos água, provavelmente, essa formulação permitiu a liberação de água entre os dedos quando o teor de umidade ainda estava abaixo do desejado.

Tabela 7 – Parâmetros físicos das compostagens em função da formulação dos substratos e tempo de compostagem em sistema fechado.

Dias de compostagem	S+BC+F	S+F
pH		
4	6,36	6,35
5	6,66	6,45
6	6,57	5,14
Temperatura (°C)		
4	45,4	46,7
5	46,5	49,6
6	46,1	49,2
Umidade (%)		
4	67,4	55,0
5	66,45	58,0
6	65,5	62,5

Legenda: S: serragem; BC: bagaço de cana; F: farelos.

Fonte: Do autor (2022).

Problemas de contaminação foram observados apenas para os tratamentos de 5 e 6 dias de compostagem (Tabela 8). O maior índice de contaminação foi observado no substrato com 6 dias de compostagem e, curiosamente, nos blocos autoclavados. Esses resultados indicam que o substrato obtido nesses tratamentos apresentou uma população microbiana que não foi inteiramente eliminada nem mesmo com a autoclavagem. Como se sabe, a eficiência do processo de autoclavagem depende não apenas do tempo e do volume, mas também da população microbiana presente na amostra. Além disso, os resultados indicam que a pasteurização teve um desempenho melhor. Provavelmente, isso ocorreu porque o tempo de pasteurização foi muito longo (36h) e, apesar da temperatura inferior (80° C), o processo de eliminação dos contaminantes tenha sido favorecido pelo longo período de tempo nesta temperatura.

Diferenças significativas foram observadas no tempo de colonização do substrato em função do tempo de compostagem e da formulação (TABELA 8). Para a formulação S+F, o substrato com 6 dias de compostagem autoclavado apresentou a colonização mais lenta, com 46,6 dias para completar a colonização do substrato, seguido pelo substrato com 4 dias de compostagem, com 40 dias. Para os demais tratamentos dentro dessa formulação, as diferenças

não foram significativas. Para a formulação S+BC+F, o melhor tempo de corrida micelial foi observado no substrato com 4 dias de compostagem pasteurizado, com 30,8 dias para completar a colonização do substrato. De igual forma, os demais tratamentos para esta formulação não apresentaram diferenças significativas.

Tabela 8 – Efeito do tempo de compostagem e tratamento térmico sobre a colonização do substrato.

TC	TT	IC (%)		CM (dias)	
		S+F	S+BC+F	S+F	S+BC+F
4 dias	A	0	0	40,0 bB	40,8 aB
4 dias	P	0	0	34,8 cC	30,8 bC
5 dias	A	20	20	31,1 cC	40,2 aB
5 dias	P	0	0	36,0 cC	39,2 aC
6 dias	A	20	60	33,4 cC	39,2 aB
6 dias	P	0	0	46,6 aA	37,0 aB

Legenda: TC: tempo de compostagem; TT: tratamento térmico; IC (%): índice de contaminação; CM: corrida micelial; A: autoclavagem a 121° C/4h; P: pasteurização a 80° C /36h; S: substrato à base de serragem e farelos; F: farelos; BC: bagaço de cana. Letras minúsculas iguais na mesma coluna e maiúsculas iguais na mesma linha não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Skott Knott, a 5% de probabilidade.

Fonte: Do autor (2022).

Segundo Royse (2009), um tempo de corrida micelial de 18 a 23 dias em condições adequadas garante crescimento ótimo e melhores resultados finais. Neste experimento, os dias de fechamento micelial ultrapassaram o estabelecido pelo autor. Apesar disso, o tempo necessário para completar a colonização depende também, além da qualidade do substrato, do volume do mesmo, quantidade de inóculo e eficiência de distribuição do mesmo no substrato.

No presente trabalho, todos os blocos formaram capa marrom no período estabelecido. A formação da capa marrom é o evento que antecede a formação dos primórdios e, posteriormente, a frutificação. Em geral, os produtores abrem os blocos com 90 dias em média. A formação da capa marrom é considerada chave para a boa produtividade do bloco, visto que já foi observado que linhagens que apresentam formação tardia da capa marrom, ou não a produzem, são menos produtivas ou falham em produzir cogumelos (ZIED *et al.*, 2016; SOUSA *et al.*, 2019).

Tabela 9 – Efeito do tempo de compostagem e tratamento térmico sobre a colonização do substrato e produção de cogumelos em duas formulações de substrato.

TC	TT	P (%)		EB (%)	
		S+F	S+BC+F	S+F	S+BC+F
4 dias	A	11,1 a	13,0 a	24,6 b	30,6 a
4 dias	P	14,0 a	11,8 a	31,2 a	27,9 b
5 dias	A	17,4 a	7,8 b	41,4 a	21,3 b
5 dias	P	12,5 a	12,5 a	29,8 a	34,4 a
6 dias	A	8,1 b	6,8 b	21,4 b	19,9 b
6 dias	P	8,7 b	8,4 b	22,8 b	24,6 b

Legenda: TC: tempo de compostagem; TT: tratamento térmico; IC (%): índice de contaminação; CM: corrida micelial; A: autoclavagem 121° C/4h; P: pasteurização 80° C /36h; S: substrato à base de serragem e farelos; F: farelos; BC: bagaço de cana; P (%): produtividade; EB (%): eficiência biológica. Letras minúsculas iguais na mesma coluna e maiúsculas iguais na mesma linha não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Skott Knott, a 5% de probabilidade.

Fonte: Do autor (2022).

A maior produção de cogumelos foi obtida no substrato S+F compostado por 5 dias e autoclavado, com uma média de 435g de cogumelos frescos por bloco. Entretanto, em termos de produtividade, estatisticamente, este tratamento foi similar aos substratos compostados por 4 dias, tanto autoclavado como pasteurizado (Tabela 9). Para a formulação S+BC+F, a maior produção foi obtida no substrato compostado por 4 dias e autoclavado, o qual não diferiu estatisticamente dos tratamentos de 4 e 5 dias de compostagem, ambos pasteurizados. Quanto à eficiência biológica, os melhores resultados foram obtidos nos tratamentos de 4 e 5 dias, autoclavados e pasteurizados, respectivamente. Para S+F, a produtividade apresentou valor numérico superior ao apresentado por S+BC+F, mas, para eficiência biológica, houve uma inversão, ou seja, S+BC+F apresentou maior eficiência biológica do que S+F. Esse tipo de comportamento só é encontrado quando a umidade dos substratos apresenta diferenças significativas entre si. E, conforme discutido anteriormente, o substrato S+F apresentou umidade sempre inferior àquela encontrada no substrato S+BC+F. Apesar de que a produtividade seja um parâmetro de melhor visualização dos resultados de produção de cogumelos e, portanto, mais interessante para o produtor de cogumelos, a eficiência biológica é um parâmetro que representa melhor a real conversão do substrato em cogumelos e, portanto,

trata-se de um parâmetro mais adequado, uma vez que elimina a subjetividade provocada pelas diferenças de umidade entre os substratos testados.

Um fato importante a ser mencionado é que os blocos do substrato BC+S+F começaram a se desmanchar durante a segunda imersão em água, no segundo fluxo de produção. Provavelmente isso ocorreu pelo fato de ter sido usado bagaço de cana apenas triturado em vez de moído, comprometendo a devida compactação do bloco, em função do tamanho dos fragmentos de bagaço de cana. Portanto, a baixa compactação impediu uma colonização densa o suficiente para manter a integridade dos blocos, como ocorre nos blocos do substrato S+F. Portanto, recomenda-se a utilização de bagaço de cana moído, em vez do bagaço apenas triturado, para este tipo de formulação. Este aspecto será abordado mais adiante neste trabalho.

Em função do problema acima relatado, é provável que a produção de cogumelos no substrato contendo bagaço de cana seria maior do que o que foi observado, em especial para o tratamento de 5 dias de compostagem submetido a autoclavagem. Possivelmente, se os blocos não tivessem se desmanchado, poder-se-ia ter obtido produção de cogumelos similar entre as duas formulações. Esses resultados significam que é viável a inclusão do bagaço de cana na formulação do substrato de cultivo do shiitake, substituindo parte da serragem, desde que o bagaço de cana seja moído até a obtenção de fragmentos menores do que 1cm.

Além disso, os resultados obtidos até aqui permitiram concluir que o processo de compostagem pode ser conduzido por pelo menos 5 dias e que a pasteurização por 36h proporcionou resultados de produção similares ao processo de autoclavagem. Entretanto, essas condições ainda precisariam ser validadas nas condições de compostagem em maior volume e em condições de melhor aeração da pilha de compostagem.

Não há relatos de materiais compostados para a produção de shiitake (CHANG; MILES, 2004), ainda que haja relatos da compostagem de serragem para a produção de fertilizante orgânico (PEDROSA *et al.*, 2013). A compostagem é utilizada quase que obrigatoriamente para a produção do substrato de cultivo dos cogumelos *Agaricus* (*A. bisporus*, *A. bitorquis* e *A. subrufescens* (CHANG; WASSER, 2017), estando diretamente associada a estas espécies de cogumelos. Para espécies de *Pleurotus*, vários processos podem ser utilizados para o seu cultivo, tais como o substrato esterilizado em autoclave (SILVA *et al.*, 2014; SIQUEIRA *et al.*, 2011) mas, também, usando a compostagem e pasteurização a vapor (CASTRO *et al.*, 2004; SIQUEIRA *et al.*, 2012). Isso nos mostra que os sistemas de compostagem e pasteurização influenciam na produção, dependendo da espécie do cogumelo. Entretanto, para o cultivo do shiitake, não existem relatos sobre a utilização de substratos fermentados, mas apenas do uso de toras e do substrato à base de serragem ou outros materiais esterilizados por autoclavagem

(CHANG; WASSER, 2017). Em função disso, Chang e Miles (2004) expressaram a importância do estudo da utilização de microrganismos termofílicos para a produção do substrato de cultivo do shiitake. Entretanto, desde então, não se tem conhecimento de qualquer trabalho com esta abordagem. A ausência de trabalhos com esta abordagem indica a dificuldade de se cultivar shiitake em substratos fermentados. Portanto, até onde se sabe, este é o primeiro trabalho com a utilização de substratos fermentados para o cultivo do shiitake.

Uma das principais vantagens do processo de compostagem, em especial durante a fase de condicionamento, é a presença de uma comunidade microbiana termofílica ou semi-termofílica, a qual torna o substrato de cultivo mais seletivo para a espécie de cogumelo a ser cultivada. Neste contexto, após a pasteurização do substrato, promove-se um processo de condicionamento a uma temperatura mais branda (45 a 50° C) para favorecer o crescimento desses microrganismos (CHANG; WASSER, 2017; VIEIRA; PECHIA, 2018). Entretanto, para o presente trabalho, observou-se que a pasteurização a 60° C não resultou em um bom substrato para o shiitake. Além dos problemas de contaminação, observou-se que o micélio de *L. edodes* não crescia bem, antes mesmo da contaminação se estabelecer no substrato. Depois elevou-se a temperatura de pasteurização para 70° C, entretanto, continuou ocorrendo o problema de inibição do crescimento micelial, ainda que este tenha sido melhor do que no substrato pasteurizado a 60° C. Em função disso, elevou-se a temperatura de pasteurização para 80° C, além de se observar a necessidade de se estender a pasteurização além de 12h. Para os experimentos seguintes, optou-se por utilizar 36h de pasteurização, para não se correr riscos de contaminação. O tempo de tratamento térmico foi novamente avaliado no experimento final de validação do processo, cujos resultados serão discutidos mais adiante. A partir do momento que passou-se a utilizar a temperatura de 80° C, observou-se que até a coloração do substrato ficou diferente, além de observar-se boa colonização pelo fungo.

O cultivo comercial de shiitake no Brasil é feito exclusivamente em substrato à base de serragem de eucalipto. Entretanto, sabe-se que é possível fazer o cultivo deste cogumelo em substratos à base de outros materiais lignocelulósicos, tais como palha de trigo e bagaço de cana, os quais variam nos resultados de eficiência biológica (DELPECH; OLIVIER, 1990; MATA; HERNANDEZ, 2003; MATA; HERNANDEZ, 2004). Entretanto, em todos esses trabalhos, o substrato utilizado foi esterilizado em autoclave ou pasteurizado sem fazer compostagem.

Conforme pode ser observado na tabela 10, o tempo de compostagem de 6 dias apresentou um nítido efeito negativo sobre a produção dos cogumelos, independente da formulação utilizada ou do tipo de tratamento térmico. Um ponto importante foi que no substrato compostado por 6 dias, a colonização ocorreu normalmente. Apenas para S+F

pasteurizado, o tempo de corrida micelial foi maior do que os demais tratamentos. E, com respeito à formação da capa marrom, o processo completou-se em todos os tratamentos. Portanto, aparentemente, todos os tratamentos pareciam aptos para produzir cogumelos, mas a eficiência biológica foi diferente entre eles. Entretanto, é importante ressaltar que estes ensaios foram conduzidos dentro de bombonas, onde a aeração ficou muito limitada. Daí a necessidade de se fazer uma validação desses resultados em condições normais de compostagem.

Conforme discutido anteriormente, o processo de pasteurização a 80°C por 36h foi tão eficiente quanto a autoclavagem no controle da contaminação. De modo geral, pode-se dizer também que a pasteurização foi igualmente eficiente para a produção de cogumelos. Mas, deve-se ressaltar que o melhor resultado de produção de cogumelos foi obtido no tempo de 5 dias de compostagem e autoclavado, com 17,4% de produtividade e 41,4% de eficiência biológica para a formulação S+F. Exceto para este tratamento, a formulação S+BC+F tendeu a apresentar produção similar à formulação anterior. O único resultado muito discrepante foi para o tratamento com 5 dias de compostagem autoclavado,

Mata e Hernandez (2003) encontraram EB de 24,8 a 55,6% na produção de shiitake cultivado em palha de trigo pasteurizada. Royse *et al.* (2017) relataram EB de 71% a 89% em substrato à base de serragem de carvalho, enquanto que no substrato combinando serragem de carvalho com palha de trigo, a EB variou de 86% a 108%. De igual forma, Mata e Salmones (2003) relataram EB superior a 100% quando utilizaram bagaço de cana na formulação do substrato de shiitake. Esses resultados demonstram, portanto, a viabilidade de se utilizar outros ingredientes além da serragem como substrato base para o cultivo deste cogumelo.

### **3.3 Efeito de linhagens sobre o cultivo do shiitake em substrato compostado**

Conforme observado nos ensaios anteriores, não se observou elevação acentuada da temperatura neste experimento, a qual apresentou uma média de 38,1 °C, com pH de 5,8 e umidade de 63%. Na tabela 10 estão apresentados os dados de produtividade de cinco linhagens de *Lentinula edodes*. As linhagens de maior produtividade e eficiência biológica foram LECAR, LE6 e CAMBUÍ, as quais foram superiores estatisticamente às linhagens ATIBAIA e EIRA. Entretanto, os valores de produção foram inferiores aos melhores resultados obtidos no ensaio anterior. Este experimento foi conduzido durante um período seco, com ausência de chuva durante todo o período de frutificação. Mesmo mantendo a umidade relativa do ar em torno de 90%, percebia-se que a frutificação não era intensa. Portanto, pode ser que o fungo tenha mecanismos que o façam “perceber” as condições ambientais naturais. Isso corrobora o relato

de produtores que a chegada do período chuvoso provoca uma explosão de frutificação depois de um período de inverno seco. Além disso, segundo Athayde *et al.* (2010), o fator clima pode afetar a produção do shiitake, o que pode ser também influenciado pelo tipo de linhagem.

Em função dos baixos valores de produção das linhagens testadas, será importante, no futuro, realizar novos ensaios para avaliar se linhagens diferentes podem se comportar de forma diferente na presença de substrato que passou pelo processo de compostagem. Assim como linhagens diferentes apresentam comportamento diferente quando submetidas ao cultivo axênico em comparação ao cultivo em toras, pode ser também que algumas linhagens sejam mais adaptadas a substratos compostados.

Tabela 10 – Produtividade e eficiência biológica de shiitake em substrato compostado à base de serragem e farelos, em função da linhagem.

Linhagens	Produtividade	Eficiência Biológica
LECAR	10,76 a	28,35 a
LE6	10,58 a	27,88 a
CAMBUÍ	9,54 a	25,14 a
ATIBAIA	8,43 b	18,35 b
EIRA	6,68 b	18,07 b

Legenda: Compostagem durante 4 dias no sistema fechado com 70% serragem, 10% farelo de arroz, 10% farelo de trigo, 5% fubá, 5% calcário. Pasteurização a 80°C por 36h. Média de blocos por tratamento: 5. Letras iguais nas barras não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Skott Knott a 5% de probabilidade.

Fonte: Do autor (2022).

Andrade *et al.* (2008) observou que o substrato utilizado pode interferir no estágio e desenvolvimento do basidioma de *L. edodes*. A figura 6 demonstra a diferença entre as linhagens Atibaia e LECAR, ambas diferentes estatisticamente quanto a produção. Embora a linhagem Atibaia apresente estipe e píleo robustos, a sua produtividade foi menor quando comparada com as três primeiras linhagens. Além da produtividade, a morfologia do basidioma pode ser muito importante, dependendo do nicho de mercado. Por isso, será importante confirmar futuramente a qualidade dos cogumelos produzidos no substrato compostado. Naturalmente, variações são encontradas em função das diferenças genéticas entre as linhagens. Mas, será importante verificar se a introdução de mais uma variável, que é o substrato compostado e se este não estará favorecendo alterações morfológicas nos cogumelos produzidos.

Figura 6 – Comparação morfológica entre duas linhagens de *Lentinula edodes* cultivadas em substrato obtido por compostagem.



Legenda: Substrato: serragem suplementada com 10% farelo de arroz, 10% farelo de trigo, 5% fubá e 5% calcário, em sistema fechado por 4 dias. A: Linhagem LECAR; B: Linhagem Atibaia.

Fonte: Do autor (2022).

### 3.4 Cultivo de *shiitake* em substrato obtido por compostagem aberta utilizando a formulação S+BC+FT

Este experimento foi conduzido com o propósito de se validar os dados obtidos anteriormente, utilizando a compostagem em pequeníssima escala. Para aqueles experimentos, foi necessário trabalhar com volumes muito pequenos, uma vez que seria inviável realizar muitos ensaios utilizando volumes maiores. Em função disso, os ensaios foram conduzidos dentro de bombonas, com o propósito de acomodar o material utilizado, considerando que não possível montar as pilhas de compostagem, como normalmente se faz. Entretanto, já se sabia desde o início que este modelo poderia afetar a aeração do substrato e, conseqüentemente, a atividade microbiana e, por fim, a temperatura durante o processo de compostagem. Portanto, para este experimento, utilizou-se um volume suficiente de material para permitir uma pilha de composto, de forma a favorecer a evolução natural da temperatura. Além disso, optou-se também pela formulação S+BC+F por se considerar que a inclusão do bagaço de cana poderia favorecer a elevação da temperatura, mesmo que isso não tenha sido confirmado no ensaio de compostagem fechada nas bombonas. Com respeito ao tempo de compostagem, o processo foi conduzido durante 8 dias, com reviragem a cada dois dias, sendo que amostras foram retiradas aos 4, 6 e 8 dias de compostagem para a montagem dos blocos para subsequente tratamento térmico (pasteurização e/ou autoclavagem).

### 3.4.1 Evolução da temperatura

Conforme se esperava, a temperatura da compostagem subiu de forma significativa neste sistema, ao contrário do que se observou no processo conduzido dentro de bombonas. Conforme pode ser observado na figura 13, a temperatura subiu acima de 50 graus nos 4 primeiros dias de compostagem e foi superior a 60 graus a partir dos 6 dias de compostagem, atingindo o pico de 64°C aos 8 dias de compostagem. Estes resultados confirmaram, portanto, que a utilização de maior volume e a maior aeração do substrato foram determinantes para permitir melhores condições para a evolução da microbiota termofílica do composto.

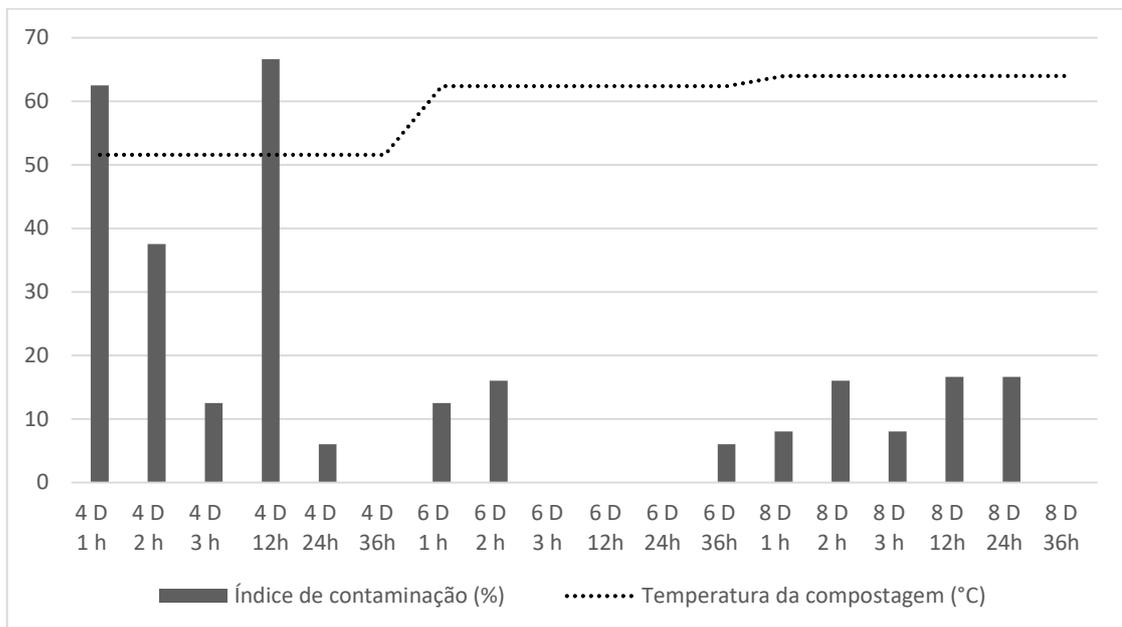
### 3.4.2 Índice de contaminação e crescimento micelial

Os resultados de contaminação dos blocos em função dos tempos de compostagem e do tipo e tempo do tratamento térmico estão descritos na figura 7. Os maiores índices de contaminação foram observados nos blocos preparados com o substrato compostado até os 4 dias. Mesmo com o tratamento de autoclavagem, observou-se elevado índice de contaminação com os tempos de 1 e 2h. Mesmo com 3h de autoclavagem, observou-se um índice superior a 10% de contaminação. No caso da pasteurização, observou-se um índice de 66,6% de contaminação para o tempo de 12h e inferior a 10% para o tempo de 24h. Apenas com 36h de pasteurização é que se obteve um índice zero de contaminação para o substrato compostado por 4 dias. Estes dados sugerem que, com este tempo de compostagem, o substrato ainda manteve uma população mesofílica muito elevada, o que requer um tempo maior para a sua eliminação.

A partir dos 6 dias de compostagem, os índices de contaminação caíram drasticamente. Para os tratamentos de autoclavagem de 1 e 2h, os índices de contaminação ainda foram superiores a 10%, entretanto, não se observou nenhuma contaminação para 3h de autoclavagem. Mais interessante ainda foi que também não se observou nenhuma contaminação para a pasteurização de 12 e 24h. Curiosamente, para o tratamento de 36h observou-se um índice de 6% de contaminação, o que pode estar associado a fatores externos de contaminação e não à eficácia em si do processo. Mais curioso ainda foi observar que, para o substrato com 8 dias de compostagem, todos os tratamentos apresentaram contaminação, exceto para o tratamento de 36h de pasteurização. A temperatura após os 8 dias de compostagem elevou-se um pouco mais em comparação aos 6 dias de compostagem, quando passou de 62,4 para 64 °C. Trata-se de uma temperatura que favorece o crescimento dos microrganismos termofílicos, o que pode ser considerado benéfico para a qualidade do composto. Entretanto, não foi conduzido o processo

de condicionamento para tornar o composto mais seletivo para o cogumelo, mesmo porque não se sabe qual seria o efeito deste processo para o crescimento de *L. edodes*. De qualquer forma, é difícil explicar os maiores índices de contaminação nos substratos com 8 dias de compostagem, em relação aos substratos com apenas 6 dias de compostagem.

Figura 7– Índice de contaminação e temperatura do substrato de bagaço de cana, serragem e farelo de trigo em vários dias de compostagem e tratamento térmico.



Legenda: 1 h, 2 h e 3 h: Autoclavado. 12 h, 24 h e 36 h: Pasteurizado. 4 D: 4 dias de compostagem. 6 D: 6 dias de compostagem. 8 D: 8 dias de compostagem. 10 blocos para cada tratamento.

Fonte: Do autor (2022).

O sistema aberto de compostagem usando a formulação S+BC+FT favoreceu o aumento da temperatura de forma evidente, quando comparado ao sistema fechado nas bombonas. O pH do composto apresentou variação de 5,4 até 5,9 até o final do processo. Esses valores são baixos quando comparados com compostagens mais longas, porém, estão dentro da faixa considerada ideal para a produção de shiitake (PHILIPPOUSSIS *et al.*, 2001; CHANG; MILES, 2004). A umidade do substrato foi de 62%, 64 % e a 67% nos dias 4, 6 e 8 dias de compostagem. Em todas as reviragens, ocorridas no segundo, quarto e sexto dia, adicionou-se água com o propósito de atingir a umidade em torno de 65%. Por isso, observou-se uma umidade crescente do 4º ao 8º dia de compostagem. Possivelmente, a presença do bagaço de cana nesta formulação foi importante para alcançar a umidade desejada sem que houvesse o acúmulo de água na camada inferior da pilha de compostagem. Além disso, é possível que o bagaço de cana tenha favorecido também a elevação da temperatura. Esses fatores, provavelmente, foram importantes

para garantir uma melhor qualidade do composto, uma vez que valores adequados de pH, temperatura e umidade são importantes fatores para o sucesso do processo (RIBEIRO *et.al.*, 2017). Evidentemente, a qualidade final do composto tem que ser confirmada por uma boa colonização e, principalmente, por uma boa produção de cogumelos.

Os dados de corrida micelial estão representados na Tabela 11. Observou-se que, dos blocos que não contaminaram, o substrato compostado por 4 dias apresentou boa colonização, tanto para os tratamentos de autoclavagem como de pasteurização, comparando-se ao substrato compostado por 6 dias, levando de 36 a 37 dias para fechar a corrida micelial. Entretanto, conforme discutido anteriormente, o tempo de 4 dias de compostagem não pode ser considerado adequado em função dos elevados índices de contaminação observados. Por outro lado, o substrato compostado por 6 dias também apresentou alguns dos melhores resultados de corrida micelial, tanto para o tratamento de autoclavagem (1, 2 e 3h), como para o tratamento de pasteurização de 12h. E, neste caso, cabe ressaltar que, para o tempo de 6 dias de compostagem, foram observados os menores índices de contaminação. Portanto, o melhor tratamento, considerando-se a simplicidade do método, eficiência na colonização dos blocos e dados nulos de contaminação, é o tratamento com 6 dias de compostagem e 12 h de pasteurização.

Para o substrato com 8 dias de colonização, não se observou colonização do substrato. Isso significa que, mesmo onde não ocorreu contaminação, o micélio de *L. edodes* não encontrou condições favoráveis de crescimento. Isso indica fortemente que o favorecimento do processo de compostagem, com a elevação da população termofílica não significa necessariamente que esta população favoreça a colonização do substrato por *L. edodes*. Mesmo que esses microrganismos tenham sido eliminados pelo tratamento térmico (pasteurização ou autoclave), a presença dessa biomassa e, conseqüentemente, de vários metabólitos ainda presentes, apresenta um efeito inibitório para o crescimento do fungo. Nos ensaios anteriores, conduzidos em bombonas, observou-se que o tempo de compostagem de 5 dias apresentou os melhores resultados. Neste ensaio, em compostagem aberta, o tempo de 5 dias não foi avaliado, entretanto, ficou claro que o processo não pode se estender além de 6 dias de compostagem, pelo menos para esta formulação contendo bagaço de cana.

Tabela 11 – Efeito do tempo sobre a colonização do substrato em compostagem de bagaço de cana e farelo de trigo em sistema aberto.

TC (dias)	TT	T (h)	CM
4	P	12	36 a1
6	A	1	36 a1
6	A	3	36 a1
6	P	12	36 a1
6	A	2	37 a1
4	A	1	37 a1
4	A	2	37 a1
6	P	24	40 a3
4	A	3	40 a3
4	P	24	43 a4
4	P	36	43 a4
6	P	36	49 a5
8	A	1	nc
8	A	2	nc
8	A	3	nc
8	P	12	nc
8	P	24	nc
8	P	3	nc

Legenda: TC- tempo de compostagem; TT- tratamento térmico. T- tempo; CM- tempo de corrida micelial; nc- não colonizou. Letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Skott Knott, a 5% de probabilidade.

Fonte: do autor (2022).

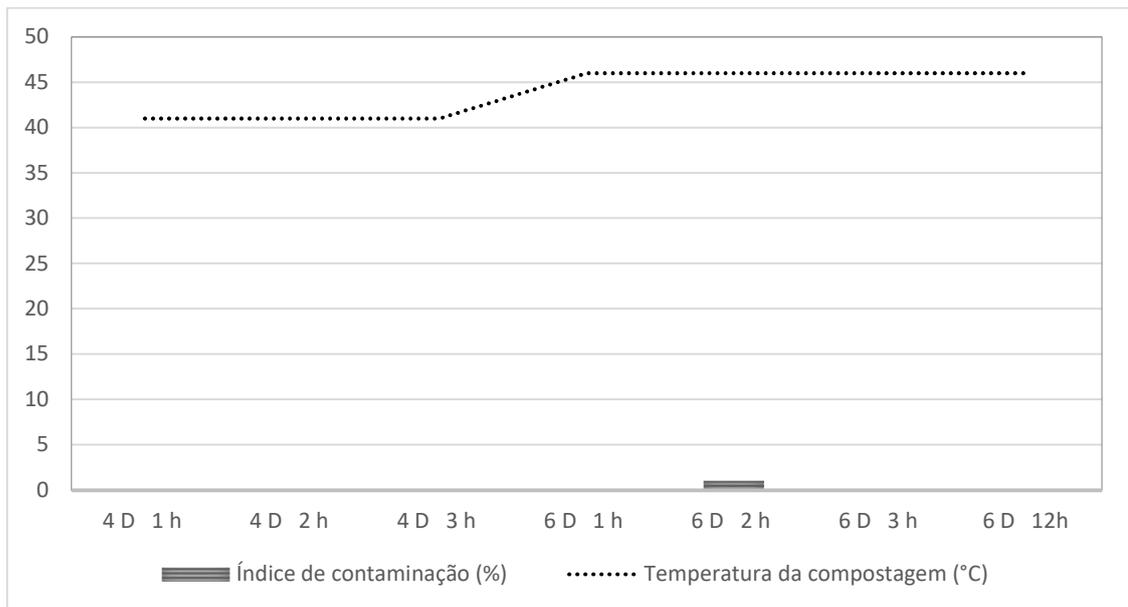
### 3.5 Cultivo de *shiitake* em substrato obtido por compostagem aberta utilizando a formulação S+FT.

Para a formulação S+FT, optou-se por realizar apenas os tratamentos que resultaram nos melhores resultados obtidos com a formulação S+BC+FT. Por isso, a compostagem foi conduzida somente até os 6 dias e, para este tempo de compostagem, optou-se por utilizar para a pasteurização, apenas o tempo de 12h, que foi o melhor tratamento no experimento anterior. Além disso, nos ensaios anteriores, no sistema de compostagem fechada em bombonas, observou-se que tempo mais prolongado de compostagem não favoreceu a produção de cogumelos. Semelhantemente, para o tempo de 4 dias de compostagem, não se realizou nenhum tratamento de pasteurização, uma vez que, para a formulação S+BC+FT, apenas o tratamento de 36h foi efetivo no controle da contaminação.

Os resultados de temperatura e de contaminação nos substratos com 4 e 6 dias de compostagem e os diferentes tratamentos térmicos estão demonstrados na figura 8. Ao contrário

do que se observou para a formulação S+BC+FT, praticamente não se observou contaminação nos blocos com o substrato S+FT. O único tratamento que apresentou contaminação foi o substrato com 6 dias de compostagem e 2h de autoclavagem, com um índice de contaminação de apenas 2%. Conforme esperado, a temperatura do composto sem o bagaço de cana não subiu como observado na formulação com bagaço. Entretanto, no sistema aberto com maior volume, a temperatura chegou a 41°C aos 4 dias e a 46°C aos 6 dias de compostagem, valores superiores àqueles observados na compostagem fechada em bombonas. Esses resultados demonstram, portanto, que a compostagem convencional, em maior volume, de fato, apresenta condições mais favoráveis ao desenvolvimento dos microrganismos termofílicos, mesmo para a formulação sem bagaço de cana. Evidentemente, é importante observar também a capacidade de colonização do substrato por *L. edodes*.

Figura 8 – Temperatura do substrato S+FT durante 6 dias de compostagem e índice de contaminação em função do tempo de compostagem e do tratamento térmico.



Legenda: 1 h, 2 h e 3 h: Autoclavado. 12 h: Pasteurizado. 4 D: 4 dias de compostagem. 6 D: 6 dias de compostagem. 10 blocos para cada tratamento.

Fonte: Do autor (2022).

A grande ausência de contaminação no substrato S+FT pode ser explicada provavelmente por uma menor carga microbiana presente na serragem, em comparação a uma maior carga microbiana presente no bagaço de cana. As mesmas características que fazem com que o bagaço de cana seja mais favorável ao processo de compostagem, evidentemente, favorece também a uma maior carga microbiana neste material. Evidentemente, mesmo após a extração do caldo de cana, o bagaço resultante ainda apresenta resquícios de açúcares que

podem favorecer o desenvolvimento de vários microrganismos mesofílicos. Isso torna-se evidente pelo surgimento de muitos bolores no bagaço de cana quando o mesmo não é devidamente desidratado após a sua obtenção. Ao contrário, não é comum observar a presença de bolores na serragem de eucalipto.

Os dados de corrida micelial nos blocos com os diferentes tratamentos estão demonstrados na Tabela 12. O menor tempo de corrida micelial foi observado nos tratamentos de 4 dias de compostagem autoclavados por 1 e 2h, bem como no tratamento de 6 dias de compostagem pasteurizado por 12h. Portanto, o tratamento de 6 dias de compostagem pasteurizado por 12h mais uma vez mostrou-se entre os melhores tratamentos em termos de colonização do substrato. Este resultado é muito importante, uma vez que o tempo de pasteurização de 12h é aceitável como procedimento para o preparo de substratos para o cultivo de cogumelos, evitando uma oneração muito grande em função do custo energético do processo. Observou-se que, para os três melhores tratamentos, foram necessários apenas 16 dias para o total fechamento micelial do substrato, o que é um resultado muito bom, inclusive muito superior ao obtido com o substrato S+BC+FT (Figura 9).

Figura 9 – Fechamento micelial completo do substrato S+F



Fonte: Do autor (2022).

Segundo Royse (2009), um tempo de corrida micelial de 18 a 23 dias em condições adequadas garante ótimo crescimento e melhores resultados finais. Portanto, para este experimento, observou-se total sucesso no tempo necessário para o fechamento da corrida micelial. E é importante enfatizar que, para isto, o inóculo foi misturado ao substrato em vez de apenas distribuído na parte superior do mesmo.

Tabela 12 – Efeito do tempo sobre a colonização do substrato em compostagem de serragem e farelo de trigo em sistema aberto.

TC (dias)	TT	T (h)	CM (dias)
4	A	1	16 a1
4	A	2	16 a1
6	P	12	16 a1
6	A	2	18 a2
4	A	3	20 a3
6	A	1	20 a3
6	A	3	24 a4

Legenda: TC- tempo de compostagem; TT- tratamento térmico. T- tempo; CM- tempo de corrida micelial. Letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Skott Knott a 5% de probabilidade.

Fonte: Do autor (2022).

O efeito da velocidade de crescimento pode estar relacionado ao tipo de substrato (ASGHER *et al.*, 2008). Entretanto, para este caso, é muito possível que a maior velocidade de colonização neste substrato possa estar associada também a uma menor carga microbiana gerada durante a compostagem. A menor temperatura durante a compostagem indica que houve também um menor crescimento microbiano, resultando, portanto, numa menor biomassa microbiana. Essa menor biomassa e correspondente carga de metabólitos microbianos pode ter apresentado também um menor efeito inibitório sobre o crescimento de *L. edodes*.

#### 4 CONCLUSÕES

A utilização da compostagem para a produção do substrato de cultivo do cogumelo shiitake mostrou-se viável, desde que o processo seja conduzido por, no máximo 6 dias, com pasteurização de 12 h a 80°C.

O desempenho agrônômico de *L. edodes* pode sofrer efeito de linhagem para o substrato obtido usando esta tecnologia. Entretanto, novos ensaios deverão ser conduzidos para validar esta informação.

## REFERÊNCIAS

- ANDRADE, M. C. N.; MINHONI, M. T. A.; ZIED, D. C.. Caracterização bromatológica de oito linhagens de *Lentinula edodes* (Shiitake) cultivadas em toras de *Eucalyptus grandis*. **Food Science and Technology**, v. 28, p. 793-797, 2008.
- ASGHER, M et al., Recent developments in biodegradation of industrial pollutants by white rot fungi and their enzyme system. **Biodegradation**, v. 19, n. 6, p. 771, 2008.
- ATHAYDE, M. B. et al. Influência da temperatura no crescimento micelial de linhagens de *Lentinula edodes* Temperature influence on the mycelial growth of *Lentinula edodes* strains. **Ambiência**, v. 6, n. 3, p. 503-509, 2010.
- CASTRO, A. L. A. et al. Avaliação das alterações bromatológicas e de degradabilidade do resíduo de lixadeira do algodão após tratamento biológico com *Pleurotus sajor-caju*. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 28, p. 608-613, 2004.
- CHANG, SHU-TING; MILES, PHILIP G. **Mushrooms: cultivation, nutritional value, medicinal effect, and environmental impact**. 2.ed. Boca Raton: CRC PRESS, 2004.
- CHANG, SHU TING; WASSER, SOLOMON P. The cultivation and environmental impact of mushrooms. In: **Oxford research encyclopedia of environmental science**. 2017.
- COELHO, R. P. P. **Produção de cogumelos exóticos em Portugal**. 2019. Tese de Doutorado. (Doutorado em Biotecnologia). 165p., Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2019.
- CONAB: COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (2019). Disponível em: [perspectivasparaaagropecuaria/item/download/28825\\_2ed3fc3b5b25a350206d276620cflc85](https://perspectivasparaaagropecuaria/item/download/28825_2ed3fc3b5b25a350206d276620cflc85). Acesso em 29 de Agosto de 2022.
- DELPECH, P.; OLIVIER, J. M. Cultivation of shiitake on straw based pasteurised substrates. In: **13. International congress**. AA Balkema, 1991.
- DIAS, E. S et al. Cultivo do cogumelo *Pleurotus sajor-caju* em diferentes resíduos agrícolas. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 27, p. 1363-1369, 2003.
- FERREIRA, D. F. SISVAR: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, p. 1039-1042, 2011.
- HE, Q et al. Lignin-first integrated steam explosion process for green wood adhesive application. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 8, n. 13, p. 5380-5392, 2020.
- KWON, H. W.; YUN, Y. H.; KIM, S. H. First Report of Brown Rot Caused by *Cryptococcus pseudolongus* on Fruiting Body of Shiitake (*Lentinula edodes*) in Korea 2. **Korea**, v. 7, p. 8, 2016.
- MAHDIZADEH, V et al. Substrate preference of Shiitake *Lentinula edodes* (Berk.)(Pegler strains). **Journal of Crop Protection**, v. 10, n. 1, p. 63-74, 2021.

MACIEL, W. P. **Cultivo de *Lentinula edodes* em diferentes condições de substrato e temperatura**. Dissertação de Mestrado. (Mestrado em Microbiologia Agrícola), 35 p., Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, 2012.

MATA, G.; GAITÁN-HERNÁNDEZ, R. Cultivation of the edible Mushroom *Lentinula edodes* (Shiitake) in Pasteurized Wheat Straw—Alternative Use of Geothermal Energy in Mexico. **Engineering in Life Sciences**, v. 4, n. 4, p. 363-367, 2004.

MATA, G.; SALMONES, D. Edible mushroom cultivation at the Institute of Ecology in Mexico. **Micologia aplicada internacional**, v. 15, n. 1, p. 23-29, 2003.

PEDROSA, T. D et al. Monitoramento dos parâmetros físico-químicos na compostagem de resíduos agroindustriais. **Nativa**, v. 1, n. 1, p. 44-48, 2013.

PHILIPPOUSSIS, A et al. The Composition and Porosity of Lignocellulosic Substrates Influence Mycelium Growth and Respiration Rates of *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 3, n. 2-3, 2001.

OBAME, S.N et al. Homolytic and heterolytic cleavage of  $\beta$ -ether linkages in hardwood lignin by steam explosion. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 67, n. 21, p. 5989-5996, 2019.

RIBEIRO, N. D. Q. et al. Microbial additives in the composting process. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 41, p. 159-168, 2017.

ROYSE, D. J. Cultivation of Shiitake on Natural and Synthetic Logs, College of Agricultural Sciences. **Agricultural Research and Cooperative Extension, The Pennsylvania State University**, 2009.

ROYSE, D. J.; BAARS, J.; TAN, Q. Current overview of mushroom production in the world. **Edible and medicinal mushrooms: technology and applications**, p. 5-13, 2017.

SANTOS, S. A et al. Characterization of phenolic components in polar extracts of *Eucalyptus globulus* Labill. bark by high-performance liquid chromatography–mass spectrometry. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 59, n. 17, p. 9386-9393, 2011.

SANTOS, S. A et al. Supercritical fluid extraction of phenolic compounds from *Eucalyptus globulus* Labill bark. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 71, p. 71-79, 2012.

SILVA, L. F. D et al. Deterioração da madeira de *Eucalyptus* spp. por fungos xilófagos. **Cerne**, v. 20, p. 393-400, 2014.

SIQUEIRA, F. G et al. Biological efficiency of *Agaricus brasiliensis* cultivated in compost with nitrogen concentrations. **Horticultura Brasileira**, v. 29, p. 157-161, 2011.

SIQUEIRA, F G et al. Cultivation of *Pleurotus* mushrooms in substrates obtained by short composting and steam pasteurization. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 53, p. 11630-11635, 2012.

SOUSA, M. A. C et al. Enzyme activity and biochemical changes during production of *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler. **Food Science and Technology**, v. 39, n. 3, p. 774-780, 2019.

VIEIRA, F. R.; PECCHIA, J. A. An exploration into the bacterial community under different pasteurization conditions during substrate preparation (composting–phase II) for *Agaricus bisporus* cultivation. **Microbial ecology**, v. 75, n. 2, p. 318-330, 2018.

ZIED, D. C., MACIEL, W. P., MARQUES, S. C., E SANTOS, D. M. D. Selection of strains for shiitake production in axenic substrate. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 32, n. 10, p. 1-6, 2016.

### CAPITULO 3

## **EFEITO DO SUBSTRATO COMPOSTADO UTILIZANDO FARELOS E CASCA DE CAFÉ COMO INGREDIENTES NA PRODUTIVIDADE DO COGUMELO *Lentinula edodes***

### **RESUMO**

Um dos principais gargalos no cultivo do cogumelo shiitake é a logística de fornecimento do substrato de cultivo, pois poucas empresas no país oferecem esse serviço. Uma vez que o crescimento e a qualidade dos cogumelos são significativamente afetados pelo ambiente, as condições adequadas de cultivo têm sido objeto de muitos estudos. Produzir o próprio substrato de shiitake requer um nível de investimento normalmente inacessível ao pequeno produtor. A compostagem curta seguida de pasteurização pode ser uma dessas alternativas de produção, desde que o produtor formule um substrato de qualidade, com uma suplementação adequada. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a compostagem à base de serragem com diferentes tipos de suplementação: farelo de arroz (10 a 30%), casca de café (5 a 25%), farelo de soja (2,5 a 12,5%) e fubá grosso (20 a 30%). Todos os ensaios foram conduzidos em bombonas de 50 litros cada, com a umidade padronizada em 65%. O tempo de compostagem foi de 4 dias e, para a pasteurização, os blocos foram acondicionados em uma caixa d'água de 1000 litros, onde o vapor foi canalizado durante 36 horas. O início da pasteurização foi considerado quando a temperatura atingiu 80°C. Após a pasteurização do substrato, os blocos foram inoculados em condições assépticas com 2% de inóculo. Após a inoculação, os blocos foram acondicionados até a completa colonização e formação de capa marrom, em uma sala à temperatura ambiente. Para a frutificação, os blocos foram transferidos para uma sala climatizada com umidade relativa do ar acima de 80% e 18 a 20°C. A suplementação com 15 a 20% de farelo de arroz apresentou os melhores resultados, com 17,5% e 35,18% de produtividade e eficiência biológica, respectivamente. A suplementação com fubá apresentou baixa produção de cogumelos com os níveis testados, sendo que a maior produtividade foi de 8,33% e 18,34% de eficiência biológica. A adição de soja provocou uma elevação do pH do substrato de 8,3 a 8,7, conforme o aumento dos níveis de inclusão. Provavelmente, isto pode ter sido a causa do comprometimento do crescimento micelial do fungo, tornando este substrato inadequado para o cultivo do shiitake. Semelhantemente, a adição da casca de café, em todos os níveis avaliados, não resultou em um bom substrato para o cultivo do shiitake, utilizando a compostagem.

Palavras-chave: shiitake, *Lentinula edodes*, suplementos, subprodutos.

## ABSTRACT

One of the main bottlenecks in Shiitake mushroom cultivation is the logistic of supplying the growing substrate, as few companies in the country offer this service. Since the growth and quality of mushrooms are significantly affected by the environment, the quest for appropriate growing conditions have been the subject of many studies. Producing one's own shiitake substrate requires a level of investment that is typically inaccessible to small growers. Short composting followed by pasteurization can be one of these production alternatives, provided that the producer formulates a quality substrate with adequate supplementation. Therefore, the aim of this study was to evaluate sawdust-based composting with different types of supplementations: rice bran (10 to 30%), coffee husk (5 to 25%), soybean meal (2.5 to 12.5%), and coarse cornmeal (20 to 30%). All experiments were conducted in 50-liter drums, with standardized moisture content of 65%. The composting process lasted for 4 days, and for pasteurization, the blocks were placed in a 1000-liter water tank and steam pasteurized for 36 hours. Pasteurization was considered initiated when the temperature reached 80°C. Following substrate pasteurization, the blocks were aseptically inoculated with a 2% inoculum. After inoculation, the blocks were conditioned until complete colonization and formation of the brown film, within a room maintained at room temperature. For fruiting, the blocks were transferred to a climatized room with an air relative humidity above 80% and a temperature range of 18 to 20°C. Supplementation with 15 to 20% rice bran showed the best results, with productivity and biological efficiency reaching 17.5% and 31.18%, respectively. Cornmeal supplementation resulted in a limited mushroom production at the test levels, with the highest productivity recorded at 8.33% and biological efficiency of 18.34%. The addition of soybean led to an increase in substrate pH from 8.3 to 8.7 as the inclusion levels increased. This pH elevation likely contributed to compromised fungal mycelial growth, rendering the substrate unsuitable for shiitake cultivation. Similarly, the addition of coffee husk across all evaluated levels did not result in a viable substrate for shiitake cultivation using composting methods.

Keywords: shiitake, *Lentinula edodes*, supplements, by-products.

## 1. INTRODUÇÃO

A fungicultura no Brasil é um setor que ainda depende de investimentos no desenvolvimento tecnológico, tanto no âmbito das condições sócio-econômicas como nos aspectos geográficos dos produtores, com as mais variadas condições, inclusive da disponibilidade de matérias-primas. Além disso, o cultivo do cogumelo shiitake tem como um dos grandes gargalos a logística para o fornecimento do substrato de cultivo, uma vez que poucas empresas prestam este serviço no país. Soma-se a isso a preocupação com os efeitos que as condições de cultivo sobre o sucesso do cultivo, levando à necessidade de muitos estudos sobre o assunto (SEO; KOO, 2009).

Segundo Átila (2021), há uma grande preocupação por parte dos produtores com a eliminação do *Trichoderma spp*, principal contaminante dos substratos de *L. edodes*. Entretanto, um bom controle dos índices de contaminação requer uma estrutura laboratorial, tanto para a esterilização do substrato, como para a inoculação asséptica do mesmo. Esta estrutura, porém, é inacessível para a maioria dos produtores. Uma das alternativas ao processo de autoclavagem é a pasteurização severa, a qual requer uma infraestrutura de custo muito menor quando comparado à autoclavagem. Segundo Rosseto *et al.* (1996), a pasteurização ocorre através do calor úmido, que, ao ser injetado, faz com que a temperatura do composto permaneça entre 60-100°C, durante um período de tempo que pode variar de 6 a 36 horas. Apesar disso, não há relatos sobre uma metodologia padronizada para as condições brasileiras.

O shiitake já foi cultivado convencionalmente em toras de madeira, principalmente em toras de eucalipto e castanheira, porém, atualmente, o cultivo é feito predominantemente em substrato à base de serragem ou outros subprodutos agroindustriais e gramíneas, no sistema axênico (MAHDIZADEH *et al.*, 2021). Os farelos de trigo, arroz e soja são os suplementos mais comuns na produção do substrato de cultivo de cogumelos. Entretanto, esses farelos são subprodutos utilizados também em outros setores da economia. Além da necessidade da otimização da sua utilização, com o intuito de reduzir os custos de produção, é importante buscar também novas alternativas de suplementação, de acordo com as características regionais, e, principalmente, com o menor custo possível.

A casca de café é um resíduo produzido de forma abundante no Brasil, uma vez que o país destaca-se no cenário mundial dentre os maiores produtores de café. Trata-se de uma matéria-prima rica em nitrogênio e que pode ser utilizada como um dos ingredientes da formulação do substrato de cultivo de cogumelos (DIAS *et.al.*, 2003). Apesar disso, outros estudos mostram a necessidade de tratamento térmico prévio da casca de café para que a mesma

seja utilizada com sucesso. Entretanto, o tratamento térmico prévio significa um custo energético adicional ao processo de pasteurização. Por isso, seria interessante avaliar a utilização da casca de café associada ao processo de compostagem.

Neste contexto, o presente trabalho tem como objetivo avaliar a produtividade de *Lentinula edodes* em substrato compostado à base de serragem, utilizando farelo de arroz, fubá grosso e soja, em comparação à casca de café como suplementos.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Preparo do inóculo

Para estes experimentos foi utilizada a linhagem de *Lentinula edodes* denominada de LECAR pertencente à Micoteca do Laboratório de Cogumelos Comestíveis. A linhagem foi previamente selecionada através de testes de produtividade, sendo a mais produtiva no substrato compostado. Dessa forma, a linhagem foi reativada e mantida em meio de cultura BDA, incubada a 25° C, sendo esta cultura considerada a matriz primária para o preparo do inoculante. Já a matriz secundária, foi preparada em substrato à base de serragem, com 20% de farelo de trigo e 2% de calcário calcítico. O substrato base para a produção do inóculo foi acondicionado em frascos de vidro, com capacidade para 400g cada. Para a proteção dos frascos, foram utilizadas tampas furadas e vedadas com fita micropore, para permitir trocas gasosas. Os frascos foram autoclavados por 2 horas a 121 °C. Depois de 24h, foram inoculados com 4 discos de 5 mm de diâmetro das colônias cultivadas em BDA. Os frascos foram incubados à temperatura de 25 °C±3°C, por 3 semanas ou até a completa colonização do substrato.

### 2.2 Formulação dos substratos

Os experimentos foram realizados em 4 ensaios, utilizando farelo de soja, fubá, farelo de arroz e casca de café, como suplementos do substrato à base de serragem, em sistema de compostagem. Além da compostagem, avaliou-se também a suplementação da serragem com a casca de soja, porém, no sistema axênico, com a possibilidade de se testar também está matéria-prima futuramente no processo de compostagem. Todos os ingredientes foram formulados com base na matéria seca e a umidade foi calculada para que os substratos finais apresentassem 65% de umidade. A formulação dos substratos está representada na tabela 1.

### 2.3 Compostagem e Pasteurização

Para a avaliação da produtividade de cada ingrediente proposto, foram realizadas compostagens de 4 dias, sem nenhuma reviragem. Em ensaios preliminares tempos inferiores a 4 dias e superiores a 6 dias não apresentaram boa colonização ou contaminaram muito. Além disso, um teste avaliando a colonização sem o manejo das reviragens mostrou-se eficiente para a produção de shiitake. O processo foi conduzido em bombonas de 50 L, que denominamos como sistema fechado, em função do pequeno volume de substrato utilizado. As bombonas

utilizadas apresentam capacidade para cerca de 12 kg de substrato seco, e foram produzidos 8 blocos para cada nível proposto. Em todos os experimentos, a umidade do substrato foi ajustada para 65%. Os ingredientes e a água foram misturados em betoneira na posição mais horizontal possível durante 5 minutos.

Tabela 1 – Formulações dos substratos para os ensaios de compostagem, com diferentes níveis e tipos de suplementos.

Substratos	Ingredientes		
	Serragem	Farelo de arroz	Calcário
1	85%	10%	5%
	80%	15%	5%
	75%	20%	5%
	70%	25%	5%
	65%	30%	5%
2	Serragem	Farelo de soja	Calcário
	92,5%	2,5%	5%
	90,0%	5,0%	5%
	87,5%	7,5%	5%
	85,0%	10%	5%
3	Serragem	Fubá	Calcário
	75%	20%	5%
	70%	25%	5%
	65%	30%	5%
4	Serragem	Casca de café	Calcário
	90%	5%	5%
	85%	10%	5%
	80%	15%	5%
	75%	20%	5%
	70%	25%	5%

Fonte: Do autor (2022).

Para cada tratamento, amostras foram retiradas para determinação do pH e teor de umidade. Para o pH, utilizou-se um volume da amostra para dois volumes de água. Para a determinação do teor de umidade, as amostras foram mantidas em estufa a 65° C até atingir peso constante, o que ocorreu normalmente em até 48 horas.

Após a montagem dos blocos, estes foram colocados em uma caixa de 1000 l, onde para cada ensaio, os blocos foram dispostos de forma aleatória. O vapor de água que dava acesso a

caixa através de mangueiras, saía das válvulas de saída de ar de duas autoclaves próximas. As mangueiras foram encaixadas no fundo da caixa, por baixo de um estrado de madeira onde os blocos eram colocados. Dessa forma, o vapor era direcionado de baixo para cima, atingindo todos os blocos. Para o monitoramento da temperatura, foram usados 5 termômetros no interior dos blocos, nas seguintes posições na caixa: base, topo, meio, lateral direita, lateral esquerda; sendo que o tempo de pasteurização foi contado quando o termômetro do topo atingiu 80°C. A caixa foi fechada com tampa própria e coberta com lona plástica, para amenizar a perda de vapor. A pasteurização foi conduzida a 80°C por 36h, de acordo com testes anteriores. Após o resfriamento até atingir temperatura ambiente, os blocos foram inoculados em condições assépticas, utilizando a proporção de 2% da matriz secundária.

#### **2.4 Colonização do substrato e formação da capa marrom**

Após a inoculação, os blocos foram mantidos em temperatura ambiente para colonização do substrato e formação da capa marrom. Quando o substrato foi completamente colonizado, deu-se início ao manejo para formação da capa marrom. Para isso, a luz foi mantida acesa durante o dia e o plástico dos blocos era descolado do substrato periodicamente, para favorecer a aeração da superfície do mesmo.

#### **2.5 Frutificação e colheita dos cogumelos**

Para indução da frutificação de todos os substratos, estes foram abertos com 104 dias e submetidos à temperatura de 18 a 20°C e umidade acima de 80% em sala com ar-condicionado e sistema de nebulização. Após o início da frutificação, a colheita dos cogumelos ocorreu diariamente. Os cogumelos foram coletados e levados ao laboratório para pesagem e registro dos dados.

#### **2.6 Imersão dos blocos após o primeiro fluxo**

Após cada fluxo, os blocos foram mantidos em repouso a temperatura ambiente e sem umidificação por cerca de 15 dias. Após esse período, os blocos foram imersos em água fria para recuperar a umidade interna do substrato e levados de volta ao ambiente refrigerado para indução do próximo fluxo de produção. Esse procedimento foi repetido para 3 ou 4 fluxos, de acordo com a resposta de frutificação. Quando os blocos apresentavam problemas de contaminação ou não apresentavam mais frutificação, os mesmos eram descartados.

## 2.7 Produtividade e eficiência biológica

A produção dos cogumelos foi expressa por meio da produtividade (P) e eficiência biológica (EB), de acordo com as equações abaixo, conforme Dias et al., (2003).

$$P (\%) = \frac{\text{Massa fresca de cogumelos (g)}}{\text{Massa úmida do substrato inicial (g)} \times 100}$$

$$EB (\%) = \frac{\text{Massa fresca de cogumelos (g)}}{\text{Massa seca do substrato inicial (g)} \times 100}$$

## 2.8 Análise Estatística

Os dados de produção de cogumelos foram agrupados e submetidos à análise de variância pelo teste F, e quando significativos, procedeu-se à análise de regressão para os ensaios de níveis de farelos, a 5% de probabilidade, e o teste de Scott Knott para os demais. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2011).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Compostagem do substrato à base de serragem suplementada com farelo de arroz

À medida que se aumentou a concentração do farelo de arroz no substrato, observou-se uma redução no pH do substrato, atingindo os valores mais baixos nos tratamentos com 25 e 30% de farelo (Tabela 2). Provavelmente, os tratamentos com maior inclusão de farelo de arroz favoreceram o processo fermentativo com consequente aumento na produção de ácidos pelos microrganismos fermentadores. Normalmente, os substratos para cultivo dos cogumelos são ajustados para pH em torno de 7,0 (ZIED *et al.*, 2016). Apesar disso, esses valores (6,3 e 6,4) ainda estão dentro da faixa de pH ideal de crescimento dos fungos de modo geral, uma vez que os mesmos apresentam bom crescimento em pH ácido (5,5 a 6,5). Porém, é interessante que o pH inicial do substrato seja um pouco mais elevado, uma vez que, durante o processo de colonização, o pH torna-se ainda mais ácido. Por isso, é importante trabalhar com um pH inicial um pouco mais elevado, por volta de 7, considerando que o ciclo de cultivo do cogumelo estende-se por alguns meses e o metabolismo do fungo tende a tornar o substrato cada vez mais ácido. Apesar dessa recomendação, nem sempre se alcança pH 7 no substrato, mesmo com a adição de calcário, dependendo dos ingredientes utilizados na formulação do substrato.

Tabela 2 – Parâmetros físico-químicos do substrato à base de serragem suplementada com diferentes níveis de farelo de arroz, após compostagem 4 dias, sem reviragem.

Farelo de arroz	pH final	Umidade final (%)	Temperatura
10%	7,2	54,7	46,2
15%	7,0	50,9	45,2
20%	6,9	53,6	45,8
25%	6,3	53,2	46,3
30%	6,4	52,6	46,8

Fonte: Do autor (2022).

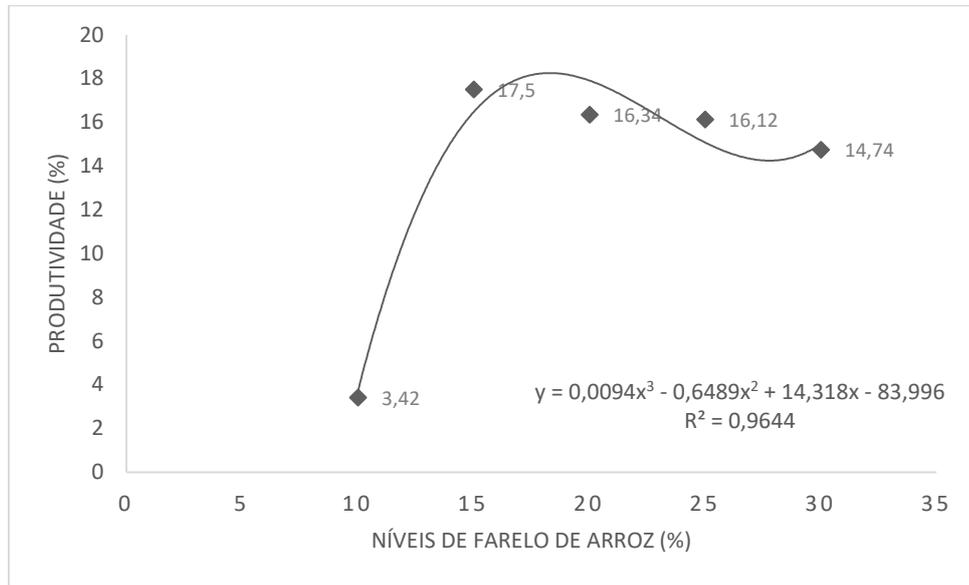
O teor de umidade dos substratos ficou abaixo do valor teórico sugerido (60 a 65%). Normalmente, a umidade do substrato vai sendo ajustada pela adição de água até que se observou um leve escorrimento de água quando se pressiona uma pequena amostra entre os dedos. Provavelmente o teor de umidade inicial ficou abaixo do esperado porque a serragem apresenta uma baixa capacidade de absorção de água quando no seu estado original. Segundo Royse *et al.* (2017), o teor de umidade do substrato para cultivo de cogumelos deve estar entre 55 e 60%, porém, para este experimento, os valores ficaram entre 50,9 e 54,7%. No caso do

cultivo do shiitake, esse problema pode ser corrigido quando os blocos são imersos em água para o segundo fluxo, quando ocorre a reidratação dos mesmos.

O aumento da concentração do farelo de arroz resultou no aumento da produtividade e eficiência biológica, até uma concentração entre 15 e 20% (Figura 1 e 2). A partir de 20% de concentração, a produção de cogumelos caiu. Para o cultivo axênico, a adição de farelos ocorre dentro de uma faixa de 10 a 20% (ZIED *et al.*, 2016). De acordo com Donini *et al.* (2009), o aumento da concentração de farelos (arroz, trigo e fubá) de 10 para 20% não resultou em maior produção de shiitake. *L. edodes* é um fungo saprófita que apresenta bom crescimento em substratos de elevada relação C/N e isso explica por que o enriquecimento do substrato a partir de certo ponto não resulta em maior produção de cogumelos. Entretanto, para o presente trabalho, a utilização de maiores concentrações de farelo tinha como objetivo avaliar o seu efeito também sobre a qualidade da compostagem, porém, isso também não ocorreu.

De acordo com Hernandez e Mata (2004), a faixa de 20 a 30% de EB é comercialmente aceitável para *L. edodes*, a qual está abaixo do maior valor encontrado neste trabalho (35,18%). Os menores valores para estes dois parâmetros foram obtidos com 10% de farelo de arroz, com 3,42% para a produtividade e 6,25% para a EB. Neste trabalho, o tempo para fechamento micelial dos blocos foi de 42 dias para os níveis de 10 e 15% de farelo de arroz, de 31 dias para os níveis 20 e 25% e 36 dias para o nível de 30% de farelo de arroz. Resultados semelhantes foram encontrados por Marino e Abreu (2008), que realizaram a suplementação com 10% de farelo de trigo e 10% de farelo de arroz em substrato para cultivo do shiitake. Para Rossi e Machado (2001), o farelo de arroz estimula o crescimento micelial de diversas espécies de cogumelos, promovendo, assim, a rápida colonização do substrato. Por outro lado, a produtividade de cogumelos pode aumentar, caso haja o consórcio entre dois ou mais farelos. Ainda há necessidade de se avaliar o efeito da adição de nutrientes minerais, tais como fósforo, potássio e magnésio, ou até mesmo alguns elementos-traço. Apesar de serem decompositores naturais de madeira, esses fungos podem depender de maior equilíbrio na sua composição nutricional para uma produção eficiente de cogumelos. Portanto, será muito importante avaliar a adição destes nutrientes no substrato de cultivo na forma mineral, de forma que se possa compreender melhor a sua importância.

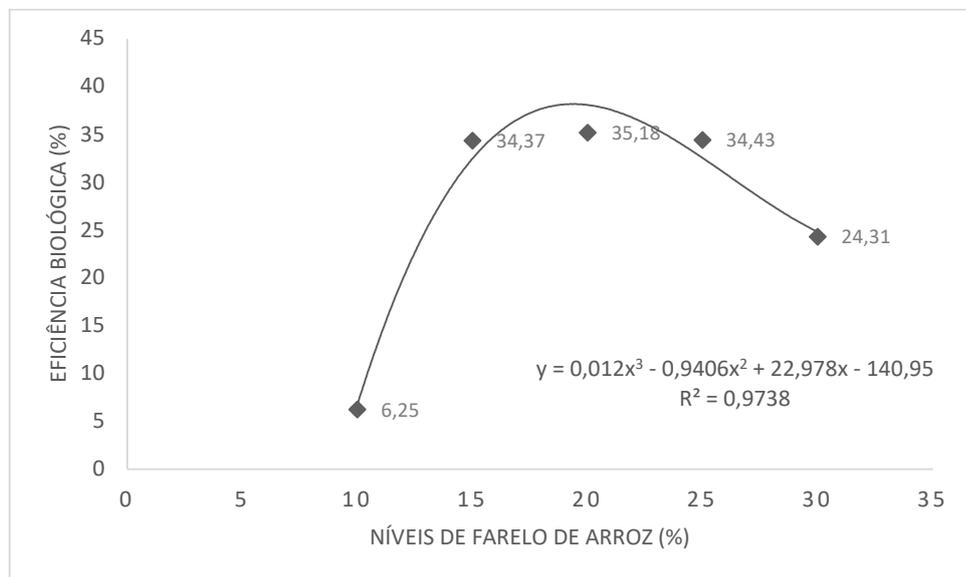
Figura 1 – Produtividade de *Lentinula edodes* em função dos níveis de farelo de arroz na compostagem.



Legenda: Compostagem em sistema fechado. Pasteurização a 80°C por 36h. Média de blocos por tratamento: 5. Teste de Regressão.

Fonte: Do autor (2022).

Figura 2 – Eficiência Biológica de *Lentinula edodes* em função dos níveis de farelo de arroz na compostagem.



Legenda: Compostagem em sistema fechado. Pasteurização a 80°C por 36h. Média de blocos por tratamento: 5. Teste de Regressão.

Fonte: Do autor (2022).

### 3.2 Compostagem do substrato à base de serragem suplementada com fubá grosso

Este tratamento foi o único, dentre todos os tratamentos de suplementação testados neste trabalho, que não resultou na elevação da temperatura. Em todos os outros tratamentos, a temperatura ultrapassou os 40° C (46,8 para o farelo de arroz, 45,1 para o farelo de soja e 43,9 para a casca de café, mas para o fubá, a maior temperatura observada foi de 26,5° C quando se utilizou 30% de fubá (Tabela 3). Portanto, ainda que se tenha observado uma elevação da temperatura do menor para o maior teor de fubá, essa elevação foi muito baixa. Além disso, exceto pela casca de café, todos os níveis de suplementação permitiram elevação da temperatura acima de 40° C. Para o menor nível de farelo de arroz utilizado na compostagem (10%), atingiu-se uma temperatura de 46,2° C, enquanto que para o menor nível de farelo de soja (2,5%), a temperatura ao final da compostagem foi de 41° C.

A baixa temperatura alcançada durante a compostagem com a suplementação com fubá grosso poderia ser explicada devido ao menor teor de proteína bruta (8-9%) em relação ao farelo de arroz (14-16%), por exemplo. Um menor teor de nitrogênio no substrato seria um fator limitante para o crescimento da microbiota local e, conseqüentemente, para o processo de fermentação (MOTHÉ *et al*, 2005). Porém, os resultados obtidos com os outros suplementos tornam evidente, que o teor de nitrogênio está longe de ser o fator limitante no tratamento com fubá. Por exemplo, quando se utilizou farelo de arroz, o nível de 10% do farelo proporcionou uma temperatura de 46,2° C e com este nível de farelo, o teor de nitrogênio foi menor do que o teor de nitrogênio proporcionado pelo nível de 30% de fubá. Portanto, há outros fatores nutricionais envolvidos no processo que fizeram com que a compostagem utilizando fubá não proporcionasse uma elevação da temperatura compatível com os demais tratamentos. Esses resultados reforçam, portanto, o argumento de que o estudo de outros nutrientes pode ser muito importante para o aperfeiçoamento do processo de compostagem para a produção do substrato de cultivo de cogumelos.

Com respeito ao pH, observou-se o processo de alcalinização do substrato assim como ocorreu nos demais tratamentos de suplementação. Esses resultados indicam que, apesar da suplementação com fubá não ter favorecido o crescimento dos microrganismos termofílicos, a mesma foi suficiente para o crescimento de outros microrganismos, os quais atuaram no processo fermentativo.

De acordo com a produtividade e eficiência biológica, os resultados foram também bastante diferentes daqueles encontrados com a suplementação com farelo de arroz. Além de

uma produção menor de cogumelos em todos os níveis testados, não se observou um aumento da produção em função do aumento do nível de fubá acrescentado à serragem (Figura 3).

Tabela 3 – Parâmetros físico-químicos do substrato à base de serragem suplementada com diferentes níveis de fubá, após compostagem de 4 dias, sem reviragem.

Fubá de milho	pH inicial	pH final	Umidade final (%)	Temperatura final (°C)
20%	6,4	7,2	50,9	25,1
25%	6,4	7,4	54,8	25,5
30%	7,0	7,6	53,7	26,5

Fonte: Do autor (2022).

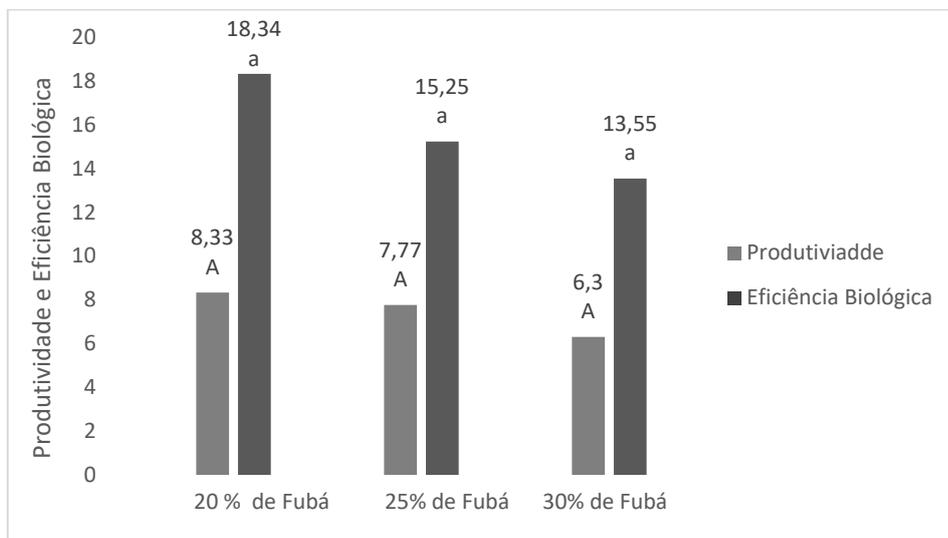
Mata e Gaitán-Hernández (2004) relataram uma produtividade de 13,9% quando utilizaram apenas palha de trigo como substrato para cultivo do shiitake. A palha de trigo apresenta um teor de nitrogênio de 0,67% em média, ou seja, trata-se de um substrato que não necessita de suplementação para garantir uma boa produção de cogumelos. Portanto, vários tipos de palhas ou até fenos (braquiária, coast-cross, etc), poderiam ser utilizados para o cultivo do shiitake. Entretanto, além da necessidade de triturar esses materiais para garantir a compactação mínima necessária, esses materiais apresentam a “desvantagem” de apresentar um teor protéico normalmente muito acima daquele necessário para a relação C/N ideal para o cultivo do shiitake. Uma das possibilidades seria combinar essas palhas ou fenos com materiais mais pobres em nitrogênio tais como a serragem de eucalipto ou bagaço de cana.

Ranjbar e Olfati (2017) utilizaram serragem de espécies nativas suplementada 30% de farelo de trigo e obtiveram uma eficiência biológica de 94,8%. Entretanto, segundo os autores, houve uma queda drástica na produção de cogumelos quando se utilizou farelo de arroz ou fubá isolados. Esses resultados demonstram que os farelos podem responder de forma diferente, não apenas em função do seu teor protéico, mas em função ou da qualidade das suas proteínas ou de outros nutrientes, tais como macro e micronutrientes, cujo balanço pode ser um fator muito importante, porém, ainda não abordado de forma adequada. Outro aspecto importante é que a combinação de diferentes tipos de farelos, tais como farelo de trigo, farelo de arroz e fubá pode ser o mais interessante.

Observa-se que os níveis de farelo de arroz de 10, 15 e 20% equivalem, aproximadamente, aos níveis de 20, 25 e 30% de fubá, considerando-se o teor final de nitrogênio estimado a partir destes dois suplementos (Tabela 4). Em função disso é que não se incluiu no presente estudo os níveis de 10 e 15% de fubá, os quais resultariam em substratos

com teor de nitrogênio muito baixo. Mas, de acordo com os dados comparados na tabela 4, fica evidente que o aumento do teor de nitrogênio promovido pela incorporação de maiores níveis de fubá não correspondeu a uma maior produção de cogumelos. Quando se utilizou farelo de arroz, o substrato com 0,47% de nitrogênio resultou em 17,5% de produtividade, porém, quando utilizou-se fubá, o substrato com 0,46% de nitrogênio resultou em apenas 7,8% de produtividade.

Figura 3 – Produtividade e eficiência biológica de *Lentinula edodes* em função da variação de farelo de fubá no substrato.



Legenda: Compostagem em sistema fechado. Pasteurização a 80°C por 36h. Média de blocos por tratamento: 5. Letras iguais nas barras não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Skott Knott a 5% de probabilidade.

Fonte: Do autor (2022).

Tabela 4 – Produtividade e eficiência biológica do shitake em função do teor de nitrogênio incorporado ao substrato de cultivo para a compostagem.

Proporção (%)	Substrato suplementado com farelo de arroz			Substrato suplementado com Fubá		
	N(%)	P(%)	EB(%)	N	P(%)	EB(%)
10	0,36	3,4	6,2	-	-	-
15	0,47	17,5	34,4	-	-	-
20	0,58	16,3	35,2	0,39	8,3	18,3
25	0,70	16,1	34,4	0,46	7,8	15,2
30	0,81	14,7	24,3	0,52	6,3	13,5

Legenda: P=Produtividade; EB=Eficiência Biológica; N=Nitrogênio.

Fonte: Adaptado de FEEDPEDIA (2023).

Os valores de nitrogênio da Tabela 4 foram retirados de Feedpedia (2023) para a comparação dos dados. Observa-se que os níveis de farelo de arroz de 10, 15 e 20% equivalem aos níveis de fubá de 20, 25 e 30%, aproximadamente, sendo que o nível de 15% de farelo de arroz equivaleu quase exatamente ao nível de 25% de fubá em termos de porcentagem de incorporação de nitrogênio no substrato a partir destes dois suplementos

### 3.3 Compostagem do substrato à base de serragem suplementada com farelo de soja

O experimento de compostagem com o farelo de soja foi realizado utilizando valores menores de farelo, em comparação ao experimento com farelo de arroz e fubá, considerando que o farelo de soja é muito mais rico em proteína em comparação aos outros dois farelos. Portanto, as concentrações de farelo de soja foram calculadas para se adequar a uma faixa de nitrogênio semelhante àquela obtida com os níveis de farelo de arroz. O farelo de soja é um dos farelos utilizados em várias formulações de substrato de cultivo de cogumelos, mas, dado o seu elevado teor proteico, é utilizado em concentrações pequenas. Por esta razão, o farelo de soja foi testado também no processo de compostagem para o cultivo do shiitake.

A adição do farelo de soja no substrato resultou em um escurecimento anormal durante a compostagem, principalmente na parte superior do substrato (Figura 4). Além disso, observou-se a geração de um odor bastante desagradável, resultando na atração de muitas moscas. O farelo de soja é utilizado na compostagem para produção do substrato de cultivo de outras espécies de cogumelos, inclusive do *Agaricus subrufescens*. Entretanto, até o momento, não houve relatos sobre este tipo de problema. Isto pode estar associado às características da serragem, cuja composição pode favorecer algum tipo de reação indesejável com o farelo de soja.

Figura 4 – Diferenças de coloração entre os substratos à base de serragem suplementados com farelo de soja (à esquerda) e farelo de arroz (à direita).



Fonte: Do autor (2022).

Outro aspecto importante foi a elevação do pH com a adição do farelo de soja, em qualquer um dos tratamentos. Normalmente observa-se um processo de acidificação, resultando em pH abaixo de 7. Entretanto, para o experimento com farelo de soja, todos os tratamentos apresentaram pH final acima de 8 (Tabela 5). Em todos esses tratamentos, o pH inicial estava em torno da neutralidade, de modo que o efeito alcalinizante do farelo de soja ficou evidente.

Com respeito à temperatura, o aumento da concentração do farelo de soja também não favoreceu o crescimento de termófilos a ponto de provocar a elevação da temperatura, assim como o foi observado em todos os experimentos anteriores.

Tabela 5 – Parâmetros físico-químicos do substrato à base de serragem suplementado com diferentes níveis de farelo de soja, com 4 dias de compostagem.

Farelo de Soja	pH inicial	pH final	Umidade final (%)	Temperatura final
2,5%	7,4	8,3	50	41
5%	7,1	8,5	52,56	44,2
7,5%	7	8,5	51,3	42,3
10%	6,9	8,6	50,81	45,1
12,5%	6,8	8,7	54,09	42,1

Fonte: Do autor (2022).

Alguns trabalhos relatam alguns problemas que ocorrem na bioquímica da compostagem, caso haja algum desbalanço de nitrogênio e aeração no processo. De Guardia *et al.* (2010), observaram que, com o aumento da taxa de aeração da compostagem utilizando dejetos suínos com serragem, os níveis de amônia foram dissipados, ocorrendo, portanto, a redução da mesma. Os mesmos autores explicam que se há uma baixa concentração de nitrogênio inicial, a nitrificação (processo que assimila a amônia para a produção de nitrato) ocorre imediatamente, trazendo qualidade ao composto. Todavia, no caso de altas concentrações, os microrganismos nitrificantes se desenvolvem lentamente. Esse mecanismo de nitrificação favorável, também é relatado por alguns autores como sendo um mecanismo dependente da aeração (LEMUS; LAU, 2002). Dessa forma, a falta de oxigenação pela falta de aeração (compostagem não revirada em bombonas), associada ao tipo de proteínas do farelo de soja, pode ter resultado no maior acúmulo de amônio, cuja dissipação não ocorreu pela ausência de aeração. O amônio possui pH alto (9,25) o que explica os dados de pH acima de 8,0 deste trabalho (Tabela 5) (LIDE, 2009). Além disso, ainda há a possibilidade de alguma reação desconhecida do farelo de soja com a serragem, uma vez que essas reações ainda não tinham sido observadas em nenhum dos experimentos anteriores.

Por fim, como já era esperado, os blocos preparados com o substrato contendo níveis de farelo de soja, não apresentaram qualquer sinal de colonização, mostrando-se completamente inadequados para o cultivo do shiitake. Portanto, a utilização do farelo de soja não se mostrou uma alternativa como suplemento para a produção do substrato de shiitake obtido por compostagem.

### **3.4 Compostagem do substrato à base de serragem suplementada com casca de café**

A utilização da casca de café no substrato obtido por compostagem foi realizada com o intuito de definir o limite máximo de aproveitamento deste resíduo na produção do substrato de cultivo do shiitake. Devido ao seu teor de cafeína e taninos, a casca de café foi usada em doses menores, quando comparada aos níveis de farelos. Entretanto, mesmo em quantidades relativamente baixas, a compostagem da casca de café apresentou uma coloração escura, indicando um problema semelhante ao observado na compostagem do farelo de soja. Semelhantemente, observou-se um efeito alcalinizante da casca de café sobre o substrato, ainda que de forma menos intensa do que o observado com o farelo de soja (Tabela 6). Esses valores de pH estão acima dos valores considerados adequados para o cultivo de shiitake, ou seja, pH mais ácido, entre 4,5 e 5,5 conforme relatado por alguns autores (PHILIPPOUSSIS *et al.*, 2001; CHANG; MILES, 2004). A temperatura do substrato ao longo da compostagem apresentou valores crescentes, atingindo o pico de 43,9°C com o maior nível de casca de café. Este foi o único tratamento que apresentou um padrão nítido de aumento proporcional da temperatura em função aumento do teor da casca de café. Entretanto, como ocorreu com os tratamentos com os farelos, a temperatura sequer chegou a 50° C.

Com respeito à umidade final do substrato ao final da compostagem com casca de café, observou-se o mesmo problema enfrentado com os tratamentos com os farelos, ou seja, a umidade final ficou abaixo do teor proposto inicialmente de 65%. Este foi um dos grandes desafios encontrados ao longo do trabalho. Como não houve reviragens, não foi possível fazer o ajuste da umidade ao longo do processo e a umidade ficou cerca de 10% abaixo do valor proposto de 65%.

Assim como observado para o tratamento com farelo de soja, não se observou colonização dos substratos suplementados com casca de café, em nenhum dos níveis propostos neste trabalho. Observou-se apenas um crescimento micelial inicial ao redor do inóculo, porém, poucos dias após a inoculação, o crescimento cessou (FIGURA 5).

Tabela 6 – Parâmetros físico-químicos do substrato à base de serragem suplementada com diferentes níveis de casca de café, após compostagem de 4 dias, sem reviragem.

Casca de café	pH inicial	pH final	Umidade final (%)	Temperatura final (°C)
5%	7,0	7,1	55,07	28,1
10%	6,9	7,2	51,35	30,6
15%	6,8	7,7	53,70	34,1
20%	6,8	7,9	52,77	38,1
25%	7,0	8,4	52,94	43,9

Fonte: Do autor (2022).

A utilização de casca de café nos substratos de cultivo de cogumelos apresenta limitações já relatadas por alguns autores. Isso pode ser explicado pela falta de um tratamento prévio deste subproduto antes da sua utilização na compostagem. Segundo Leifa *et al.*, (2000), é necessário um tratamento térmico da casca de café, para a eliminação de taninos que possam inibir o crescimento do fungo. Esses autores submeteram a casca de café a uma imersão em água quente durante 1 hora, o que permitiu a total colonização do substrato do micélio de *Lentinula edodes* e alcançando 85,8% de eficiência biológica. O substrato tratado com água quente deu origem a cogumelos com valores nulos de cafeína e taninos. Para o presente trabalho, a casca de café utilizada não foi submetida a nenhum tratamento prévio para a diminuição de taninos e outros fatores antinutricionais do material, o que pode explicar a inibição do micélio de *Lentinula edodes*.

Figura 5 – Aspecto do crescimento micelial de *L. edodes* em substrato compostado à base de serragem suplementada com casca de café.



Fonte: Do autor (2022).

Os resultados obtidos neste trabalho confirmaram a limitação da utilização da casca de café no substrato de cultivo do shiitake. Mesmo para outras espécies de cogumelos, há relatos acerca das suas limitações, conforme discutido anteriormente. Dias *et al.* (2003) relataram os

problemas na utilização da casca de café pura para o cultivo de cogumelo *Pleurotus*, quando sequer a colonização total do substrato foi observada. Além da presença de cafeína e taninos, os autores associaram o problema também ao excesso de umidade, indicando uma necessidade de adição mais moderada de água. Entretanto, os indícios apontam mais para problemas na composição química deste material. Os resultados obtidos pelo tratamento de imersão em água quente, descrito por Leifa *et al.* (2000), indicam um efeito não apenas do calor mas, provavelmente, pela remoção dos componentes tóxicos ou antinutricionais, uma vez que, se fosse unicamente pelo calor, a pasteurização severa surtiria o mesmo efeito. Infelizmente, mesmo com o sucesso descrito por Leifa *et al.* (2000), o tratamento de imersão em água quente limita bastante a utilização da casca de café, uma vez que este tipo de procedimento só poderia ser feito em condições de baixa escala de produção e, mesmo assim, só se justificaria se não houvesse outro tipo de matéria-prima disponível para compor o substrato de cultivo do cogumelo. Entretanto, pode ser que, para outros substratos que não utilizem a serragem como substrato base, seja possível utilizar a casca de café.

#### 4 CONCLUSÕES

Para a produção do substrato de cultivo de shitake usando o sistema de compostagem, o farelo de arroz mostrou-se um suplemento adequado para o suprimento de nitrogênio. Por outro lado, farelo de soja e casca de café mostraram-se completamente inadequados, não permitindo sequer a colonização do substrato. O fubá foi um suplemento melhor do que o farelo de soja e casca de café, porém, muito inferior ao farelo de arroz. Apesar disso, o substrato suplementado com o fubá apresentou boa colonização e formação da capa marrom e produziu cogumelos, ainda que com produtividade bastante inferior. Portanto, o fubá não se mostrou um suplemento suficiente para garantir a melhor produção, porém, pode ser considerado como parte da suplementação, em associação com outros tipos de suplementos, tais como farelo de trigo e farelo de arroz.

## REFERÊNCIAS

- CONAB: COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (2019). Disponível em: [perspectivasparaagropecuaria/tema/download/28825\\_2ed3fc3b5b25a350206d276620cf1c85](https://perspectivasparaagropecuaria/tema/download/28825_2ed3fc3b5b25a350206d276620cf1c85). Acesso em 29 de Agosto de 2022.
- DE GUARDIA, A., MALLARD, P., TEGLIA, C., MARIN, A., LE PAPE, C., LAUNAY, M., PETIOT, C. Comparison of five organic wastes regarding their behaviour during composting: Part 2, nitrogen dynamic. **Waste Management**, v. 30, n. 3, p. 415-425, 2010.
- DIAS, E. S. Mushroom cultivation in Brazil: challenges and potential for growth. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 34, p. 795-803, 2010.
- DIAS, E. S., KOSHIKUMO, É., SCHWAN, R. F., & SILVA, R. D. Cultivo do cogumelo *Pleurotus sajor-caju* em diferentes resíduos agrícolas. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 27, p. 1363-1369, 2003.
- FEEDIPEDIA - Animal Feed Resources Information System - INRAE CIRAD AFZ and FAO, 2012-2022. Disponível em: [www.feedipedia.org/node/12758](http://www.feedipedia.org/node/12758). Acesso em 15-05-2023.
- FERREIRA, D. F.. SISVAR: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, p. 1039-1042, 2011.
- LEIFA, F.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A. Production of mushrooms on Brazilian coffee industry residues. In: **Coffee biotechnology and quality**. Springer, Dordrecht, p. 427-436, 2000.
- LEMUS, G. R.; LAU, A. K. Effect of carbon availability on greenhouse gases emissions and nitrogen conservation during high rate composting. In: **Proceedings of the International Scientific Symposium on Composting and 38 Compost Utilization**, 6-8 may, Colombus, USA, Published on CD-ROM, 2002.
- LIDE, DAVID R. (Ed.). **CRC handbook of chemistry and physics**. CRC press, 2004.
- MAHDIZADEH, V., SAFAIE, N., SALEHI, M., & JAHEDI, A. Substrate preference of Shiitake *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler strains. **Journal of Crop Protection**, v. 10, n. 1, p. 63-74, 2021.
- MARINO, R. H.; DE ABREU, L. D. Cultivo do cogumelo Shiitake em resíduo de coco suplementado com farelo de trigo e/ou arroz. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 4, n. 1, p. 11-16, 2009.
- MATA, G.; SALMONES, D. Edible mushroom cultivation at the Institute of Ecology in Mexico. **Micologia aplicada internacional**, v. 15, n. 1, p. 23-29, 2003.
- MATA, G.; GAITÁN-HERNÁNDEZ, R. Cultivation of the edible mushroom *Lentinula edodes* (Shiitake) in pasteurized wheat straw—alternative use of geothermal energy in Mexico. **Engineering in Life Sciences**, v. 4, n. 4, p. 363-367, 2004.

MOTHÉ, C. G.; DAMICO, A.; MACHADO, M. G. S. Estudo termoanalítico, CLAE e fracionamento físico e químico do subproduto industrial do milho. **Food Science and Technology**, v. 25, p. 1-7, 2005.

MILES, P. G.; CHANG, S. **Mushrooms: cultivation, nutritional value, medicinal effect, and environmental impact**. CRC press, 2<sup>a</sup> ed., 451 p., 2004.

PHILIPPOUSSIS, A., DIAMANTOPOULOU, P., EUTHIMIADOU, H., & ZERVAKIS, G. I. The Composition and Porosity of Lignocellulosic Substrates Influence Mycelium Growth and Respiration Rates of *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 3, n. 2-3, 2001.

RANJBAR, M. E.; OLFATI, J. A. Evaluation of substrate components on shiitake mushroom properties. **International Journal of Vegetable Science**, v. 23, n. 2, p. 145-150, 2017.

ROSSI, I. H et al. Desenvolvimento micelial de *Lentinula edodes* como efeito da profundidade e suplementação do substrato. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, n. 6, p. 887-891, 2001.

ROYSE, D. J.; BAARS, J.; TAN, Q. Current overview of mushroom production in the world. **Edible and medicinal mushrooms: technology and applications**, p. 5-13, 2017.

SEO, D. S.; KOO, C. D. **Effect of temperature to rooting of *Lentinula edodes* in surface cultivation**. Journal of Korean Forest Society. 2009.

ZIED, D. C., MACIEL, W. P., MARQUES, S. C., E SANTOS, D. M. D. Selection of strains for shiitake production in axenic substrate. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 32, n. 10, p. 1-6, 2016.