

**EFEITO DO TEOR DE NITROGÊNIO,
INOCULANTES E MÉTODOS DE
COMPOSTAGEM PARA CULTIVO DE**
Agaricus blazei

FÉLIX GONÇALVES DE SIQUEIRA

2006

FÉLIX GONÇALVES DE SIQUEIRA

**EFEITO DO TEOR DE NITROGÊNIO, INOCULANTES E MÉTODOS
DE COMPOSTAGEM PARA CULTIVO DE *Agaricus blazei***

Dissertação apresentada à Universidade Federal
de Lavras como parte das exigências do
programa de Pós-graduação em Microbiologia
Agrícola, para a obtenção do título de "Mestre".

Orientador
Prof. Dr. Romildo da Silva

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2006

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

Siqueira, Félix Gonçalves de

Efeito do teor de nitrogênio, inoculantes e métodos de compostagem para cultivo de *Agaricus blazei* / Félix Gonçalves de Siqueira. -- Lavras: UFLA, 2006.

124 p. il.

Orientador: Romildo da Silva.
Dissertação (Mestrado) – UFLA.
Bibliografia.

1. Cogumelo. 2. *Agaricus blazei*. 3. Métodos de compostagem. 4. Nitrogênio total. 5. Pasteurização 6. Produtividade 7. Eficiência biológica. 8. Amônia. 9. *Scytalidium thermophilum*. 10. *Alcaligenes faecalis*. 11. *Bacillus subtilis*. 12. *Pseudomonas stutzeri*. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-635.8

FÉLIX GONÇALVES DE SIQUEIRA

**EFEITO DO TEOR DE NITROGÊNIO, INOCULANTES E MÉTODOS
DE COMPOSTAGEM PARA CULTIVO DE *Agaricus blazei***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de "Mestre".

APROVADA em 30 de janeiro de 2006.

Prof. Dr. Eustáquio Souza Dias - UFLA

Prof. Dr. Hilário Antônio de Castro - UFLA

Prof. Dr. Augusto Ferreira da Eira – UNESP/Botucatu

**Prof. Dr. Romildo da Silva
UFLA
(Orientador)**

**LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL**

À minha filha amada, Giovanna Maria.

Aos meus pais, Francisco e Sueli, pela sabedoria na educação de seus filhos.

Às minhas irmãs Elane, Eliane e Aline, por todo amor dedicado à nossa família.

Ao meu irmão Fernandes e família pela amizade e companheirismo de todas as horas.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, que reina em meu coração por meio das bênçãos dispensadas a mim e a meus familiares, dando-me força, saúde e alegria em todos os minutos de minha vida.

Aos meus pais, Francisco e Sueli, pela confiança, pelos conselhos, apoio e por sempre acreditarem em mim.

Aos professores Romildo da Silva, Eustáquio Souza Dias e a professora Rosane Freitas Schwan, pela oportunidade e confiança a mim concedida, pela orientação e incentivo sempre constante, pelas críticas e sugestões, pela paciência e disposição durante a realização deste trabalho e por acreditarem na minha capacidade. Muito obrigado, professores, vocês serão sempre lembrados.

Aos professores Hilário e Augusto Eira, por terem aceitado o convite e pela atenção dispensada. Os nossos sinceros agradecimentos.

Aos professores: José Osvaldo, Luciano, Custódio e Fátima, pelos ensinamentos nas disciplinas cursadas durante a pós-graduação.

Ao professor Ricardo Sette pela confiança. Muito obrigado.

À Secretaria de Educação do Distrito Federal, por ter permitido, através de licença remunerada, a realização deste trabalho.

À Diretora Regional de Ensino de Planaltina/DF, Profa. Maria do Socorro Galdino, pelo incentivo e compreensão da importância deste trabalho.

À Diretora da Universidade Estadual de Goiás – Campus Formosa/Go, Profa. Arlete Freitas Botelho, pela recomendação e confiança em minha pessoa.

Aos diretores do Colégio Visão (Formosa/Go), Beth e Zé Luiz, pelo apoio, confiança e recomendação.

A Fundação André Tosselo, pela doação de cepas das bactérias utilizadas durante os experimentos.

Ao prof. João Atilio Jorge da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras Ribeirão Preto/USP, pela doação da linhagem do fungo *Scytalidium thermophilum* utilizado nos experimentos.

Ao Laboratório de Zootecnia da UFLA, por ter permitido a realização das análises químicas das matérias-primas utilizadas nos experimentos.

Aos professores Darlan e Messias – DAG/UFLA, por ter cedido equipamentos utilizados na experimentação.

Aos funcionários da serraria do Departamento de Engenharia Florestal – UFLA, por ter cedido os resíduos de carvão vegetal utilizado no processo.

Aos meus amigos de república, Caio e Thiago, pela confiança, incentivo, apoio, paciência e aprendizado. Muito obrigado.

Ao Euziclei e família (Helivânia e Roberth), por ter me apoiado desde o início, pelos conselhos, pelos ensinamentos, pela amizade. Muito obrigado,

Às amigas Márcia, Valdirene e Evânia, pelo ensinamento, confiança e conselhos. Muito obrigado.

Ao professor Antonio R. Evangelista, pela contribuição ao Setor de Microbiologia da UFLA.

Ao amigo Clenderson, doutorando do DZO, pela cooperação, dedicação, força e ensinamento. Muito obrigado.

Ao Toninho, da Cachaça Bocaína, pelo cooperação com o Setor de Microbiologia da UFLA. Os nossos agradecimentos.

À grande amiga Ivani, que tanto me ajudou nesta etapa, muito obrigado.

A Cidinha, por sua educação e presteza.

A Magda, que sempre me atendeu de forma alegre, obrigado por tudo.

Ao Éderson, pelos ensinamentos, paciência, apoio e incentivo.

Aos amigos Emerson, Lucas e Leandro, por toda a dedicação e trabalho árduo durante a execução das tarefas diárias da experimentação. Muito obrigado.

Aos colegas e ex-colegas de pós-graduação: Patrícia, Gisele, Sandra, Thaís, Nina, Débora, João, Rômulo, Miriam, Márcio, Lucas, Helson, Jaíne, Carla, Halan, Claudinelli, Aramália, Fernanda, Scheila, Krisle, Gláucia, Robervone, Alessandra, Márcia Aviz, Daniel e Ildon, pela troca de experiências, convívio e amizade.

Aos alunos-estagiários amigos, Ana Paula, Gra, Whasley, Milena, Gabi, Fábio, João, André, Matheus, Janaina e Camila, pela ajuda, atenção e dedicação.

Aos funcionários Fábio, Lamartine, Zélia, Rafaela e Antônio, pela educação e cooperação.

A dona Cleonice, Rodrigo, Renato e Romildo Júnior, pela colaboração e amizade. Muito obrigado.

Aos grandes amigos de Formosa, Go e Planaltina, DF, Nilvan, Kátia, José Alberto, Jorge, Wellington, José Mundim, Neuza, Maria Dileta, Silon, Silomar, Dilvan, Robson, Daniela, Wélia, Patrícia, Simone, Eduarda, Nelma, Totonho, Lucinede e os demais que não foram aqui mencionados, agradeço do fundo coração pelas orações, incentivo, pelas palavras amigas e amáveis. Muito obrigado, que Deus abençoe a todos.

A Gilka, Elane, Eliane, Aline e Fernandes e família, pela torcida, incentivo e apoio em durante está etapa de vida.

À minha filha amada, Giovanna Maria que, mesmo nos seus 6 anos de idade, têm me ensinado tanto sobre a vida. Muito obrigado, filha, pela compreensão, amor e carinho. O papai te ama muito.

A todos, que, de forma direta ou indireta, contribuíram para que este trabalho tenha sido realizado, a minha eterna gratidão.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	i
ABSTRACT	iii
1 INTRODUÇÃO	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO	4
2.1 <i>Agaricus blazei</i>	4
2.1.1 Histórico do <i>Agaricus blazei</i>	6
2.1.2 Importância do <i>Agaricus blazei</i>	7
2.2 O cultivo de <i>Agaricus blazei</i>	9
2.3 Substrato para cultivo de <i>Agaricus blazei</i>	10
2.3.1 Formulação do composto e compostagem (Fase I).....	11
2.3.2 Nutrição do cogumelo.....	12
2.3.2.1 Fontes de carbono.....	12
2.3.2.2 Fontes de nitrogênio.....	13
2.3.2.3 Elementos minerais.....	14
2.3.2.4 Vitaminas e outros fatores de crescimento.....	15
2.3.3 Temperatura da compostagem.....	16
2.3.4 Pasteurização e condicionamento (Fase II).....	16
2.3.4.1 Função básica da Fase II.....	17
2.3.4.2 Interação entre <i>Agaricus</i> e outros microrganismos.....	18
2.3.5 Método “Indoor”.....	19
2.3.6 Final da compostagem.....	20
2.3.6.1 Seletividade do substrato.....	21
2.3.7 Microbiota da compostagem.....	22
2.3.8 Fungos termófilos.....	23
2.3.9 Actinomicetos e outras bactérias.....	23
3 MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1 Experimento 1- compostagem de 6 semanas e pasteurização a vapor....	25
3.1.1 Produção de inoculante.....	25
3.1.2 Processo de compostagem.....	26
3.1.3 Determinação do teor de N-total.....	31
3.1.3.1 Método Kjeldahl (AOAC, 1990).....	31

3.1.4 Relação C/N.....	35
3.1.5 Determinação do nitrogênio amoniacal.....	36
3.1.6 Celulose, hemicelulose e lignina.....	38
3.1.6.1 Determinação da fibra em detergente neutro (FDN).....	38
3.1.6.2 Determinação da fibra em detergente ácido (FDA).....	40
3.1.6.3 Determinação de lignina.....	42
3.1.6.4 Determinação da celulose.....	43
3.1.7 Inoculante de bactérias.....	44
3.1.7.1 Curva de crescimento e contagem de colônias bacterianas.....	44
3.1.8 Pasteurização a vapor.....	45
3.1.9 Ensacamento, inoculação e incubação.....	47
3.1.10 Crescimento micelial.....	48
3.1.11 Indução e terra de cobertura.....	48
3.1.12 Cultivo.....	49
3.1.13 Estatística.....	50
3.1.14 Colheita.....	50
3.1.15 Processamento.....	51
3.2 Experimento 2 - compostagem de 4 semanas e pasteurização a vapor..	51
3.2.1 Inoculante do fungo termofílico – <i>Scytalidium thermophilum</i>	54
3.2.2 Cultivo do experimento 2.....	54
3.3 Experimento 3 – compostagem/pasteurização tradicional.....	55
3.3.1 Pasteurização e condicionamento em túnel ventilado.....	55
3.3.2 Cultivo do experimento 3.....	58
3.4 Experimento 4-utilização de inoculantes em compostagem tradicional.	58
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	61
4.1 Curva de crescimento e contagem de colônias bacterianas.....	61
4.2 N-total e relação C/N.....	65
4.2.1 Nitrogênio (N) no E ₁	65
4.2.2 Nitrogênio (N) no E ₂	68
4.2.3 Nitrogênio (N) no E ₃	70
4.2.4 Nitrogênio (N) no E ₄	72
4.3 Celulose, hemicelulose e lignina.....	75
4.3.1 Teores lignocelulósicos – E ₁	76
4.3.2 Teores lignocelulósicos – E ₂	77

4.3.3 Teores lignocelulósicos – E ₃	78
4.3.4 Teores lignocelulósicos – E ₄	80
4.4 Nitrogênio amoniacal (N-amoniacal).....	80
4.4.1 N-amoniacal – E ₁	80
4.4.2 N-amoniacal – E ₂	84
4.4.3 N-amoniacal – E ₃	85
4.4.4 N-amoniacal – E ₄	86
4.5 Temperatura no processo de compostagem.....	87
4.5.1 Temperatura – E ₁	87
4.5.2 Temperatura – E ₂	88
4.5.3 Temperatura – E ₃	89
4.5.4 Temperatura – E ₄	91
4.6 Umidade no processo de compostagem.....	92
4.6.1 Umidade – E ₁	92
4.6.2 Umidade – E ₂	93
4.6.3 Umidade – E ₃	94
4.6.4 Umidade – E ₄	95
4.7 pH.....	96
4.7.1 pH – E ₁	96
4.7.2 pH – E ₂	97
4.7.3 pH – E ₃	98
4.7.4 pH – E ₄	99
4.8 Crescimento micelial, produtividade e eficiência biológica do E ₁	100
4.8.1 Efeito da concentração de N no composto.....	100
4.8.2 Efeito de bactérias assimiladoras de amônia na compostagem.....	101
4.9 Crescimento micelial, produtividade e eficiência biológica do E ₂	103
4.10 Crescimento micelial, produtividade e eficiência biológica do E ₃	106
4.11 Crescimento micelial, produtividade e eficiência biológica do E ₄	109
5 CONCLUSÕES.....	112
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	113
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	114

RESUMO

SIQUEIRA, Félix Gonçalves de. **Efeito do teor de nitrogênio, inoculantes e métodos de compostagem para cultivo de *Agaricus blazei***. Lavras: UFLA, 2006. 124 p. (Dissertação – Mestrado em Microbiologia Agrícola)¹.

O processo convencional de compostagem para o cultivo do cogumelo *Agaricus blazei* requer a utilização de uma câmara de pasteurização que tem o objetivo de eliminar o excesso de amônia do composto. Para a produção sem esse sistema, deve-se estabelecer condições especiais para evitar a presença de amônia no composto final. O objetivo deste trabalho foi avaliar a produtividade e a eficiência biológica na produção de *Agaricus blazei* em diferentes metodologias de compostagem. Desta forma foram montados experimentos usando microrganismos, como bactérias assimiladora de amônia e o fungo *Scytalidium thermophilum* como inoculantes durante quatro e seis semanas de compostagem, como também na metodologia tradicional de compostagem (fase I e fase II) usando diferentes concentrações de nitrogênio. Foi utilizado o *Agaricus blazei* CS1 nos seguintes experimentos: E₁ – compostagem de 6 semanas com sucessivas reviragens e pasteurização a vapor por 48 horas, utilizando diferentes concentrações de N-inicial e adição das bactérias *Alcaligenes faecalis*, *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas stutzeri* durante a compostagem e pasteurização; E₂ – compostagem de 4 semanas com sucessivas reviragens com N-inicial igual para todos os tratamentos (1,5%N), tendo como diferencial a adição das bactérias citadas no E₁ e o fungo termofílico *Scytalidium thermophilum* em tratamentos distintos; E₃ – compostagem convencional com fase I (2 semanas) e fase II (2 semanas), com diferentes concentrações de N-inicial (0,99%, 1,50% e 1,90%); E₄ – compostagem convencional (Fase I e II) com concentração de N-inicial igual para os tratamentos (2,0%), porém com adição de diferentes microrganismos (bactérias e *Scytalidium thermophilum*) nas duas fases de preparo do composto. Para melhor avaliação dos resultados dos experimentos foram feitos monitoramento da temperatura, umidade e pH durante a compostagem, como também a determinação do teor de celulose, hemicelulose e lignina das matérias-primas e composto após finalização dos processos. Foi determinado o crescimento micelial, em mm/dia, em todos os tratamentos nos diferentes experimentos. O teor de N-total das matérias-primas e de cada composto no final do processo de preparo do substrato. Foi determinado o conteúdo de amônia após a finalização do processo de pasteurização a vapor ou fase II, de acordo com a metodologia usada. Foi feito o levantamento do número

¹ **Comitê Orientador:** Romildo da Silva – UFLA (Orientador), Eustáquio Souza Dias–UFLA (Co-orientador).

médio de cogumelos produzidos por vaso/repetição (5 kg de substrato úmido/vaso), como também a determinação da massa média (g) dos mesmos. Determinou-se o percentual de massa de cogumelos produzidos por cinco ciclos de 15 dias cada, a partir do surgimento do primeiro cogumelo após a indução. Os resultados mostraram que a metodologia de preparo de substratos de cultivo *A. blazei* de compostagem longa e pasteurização a vapor foi eficiente, do ponto de vista de produtividade e eficiência biológica, somente quando ocorreu a adição de bactérias ou quando adicionado o fungo *Scytalidium thermophilum*, quando o teor de N-inicial foi de 1,5%. A metodologia convencional de preparo de substratos mostrou que o teor de N-inicial deve ser entre 1,0% e 1,5%, considerando produtividade e eficiência biológica. A utilização de bactérias e *Scytalidium thermophilum* não apresentou efeito positivo na metodologia convencional em composto com 2,0% de N-inicial, quando avaliadas produtividade e eficiência biológica.

ABSTRACT

SIQUEIRA, Félix Gonçalves de. **Effect of the concentration of nitrogen, inoculants and composting methods for the cultivation of *Agaricus blazei***. Lavras: UFLA, 2006. 124 p. (Dissertação – Mestrado em Microbiologia Agrícola)¹.

The conventional process composting for the cultivation of *Agaricus blazei* mushroom requires the utilization of pasteurization/conditioning tunnel to eliminate the excess of ammonia from the compost. For the production without this system, special conditions must be established to avoid the presence of ammonia on the final compost. The aim of this project was to evaluate the productivity and biological efficiency of the growth of the mushroom *Agaricus blazei* under different composting process. In order to evaluate that experiments were done using microorganisms, such as ammonia assimilating bacteria and the fungus *Scytalidium thermophilum* as starters during four and six weeks of composts process, as well as in the traditional methodology composting (phase I and phase II) using different nitrogen concentration. The *Agaricus blazei* CS1 was used, on the following experiments: E₁ – 6 weeks composting under successive revolving and vapor pasteurization for 48 hour, using different concentrations of N-initial and addition of the bacteria *Alcaligenes faecalis*, *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas stutzeri* during composting and pasteurization; E₂ – 4 weeks composting under successive revolving with N initial similar to all the treatments (1,5%), having the addition of the bacteria mentioned on E₁ and the thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum* in special treatments; E₃ – conventional composting (phase I and II) with similar concentrations of N-initial for the treatments (2,0%), however with the addition of different microorganisms (bacteria and *Scytalidium thermophilum*) on the two phases of the compost preparation. For better evaluating the results of the experiments, the monitoring of the temperature, moisture and pH were made during the composting, as well as the determination of the concentration of cellulose, hemicelluloses and lignin of the raw material and composting after the final processes. It was determined the mycelium growth in mm/day for all experiments done. The concentration of N-total of the raw material and of each final compost was determined. It was also determined the ammonia content after the finalization of the vapor pasteurization process or phase II, according to the methodology used. It was made an account of the average mushrooms produced in vase/replication (5 kg wet substrate/vase), as well as the determination of the

¹ **Guidance committee:** Romildo da Silva - UFLA (Adviser), Eustáquio Souza Dias – UFLA (Co-adviser).

average mass of them. It was determined the percentage of mass of the mushrooms produced in five cycles of 15 days each since the outcome of the first mushroom after induction. The results have shown that the methodology of preparation of the substrate on the cultivation of *A. blazei* in six week composting and vapor pasteurization was efficient in terms of productivity and biological efficiency only when there happened the addition of bacteria or when the fungus *Scytalidium thermophilum* was added, when the N-initial concentration was 1,5%. The conventional methodology of substrate preparation have shown that the N-initial concentration should be between 1,0% and 1,5%, considering biological productivity and efficiency. The utilization of bacteria and *Scytalidium thermophilum* as inoculums did not present positive effect on the conventional methodology in composting with 2,0% of N-initial, when assessed the biological efficiency and productivity.

1 INTRODUÇÃO

Há mais de 2000 anos os cogumelos são apreciados como uma iguaria culinária. Há registros de que, em 372-287 a.C., o filósofo grego Theophrastus descreveu os cogumelos silvestres como um alimento de valor para o homem. *Lentinula edodes* (Shiitake) foi o primeiro cogumelo cultivado na China, entre 1000 DC e 1100 DC, *Agaricus bisporus* na França, em meados de 1600 e *Pleurotus ostreatus* nos EUA, em 1900. No entanto, apesar de experiências tão antigas, somente nas últimas décadas têm sido desenvolvidas pesquisas aplicáveis ao cultivo industrial dos cogumelos comestíveis.

No Brasil, o consumo de cogumelos vem crescendo significativamente devido ao reconhecimento do seu alto valor nutritivo e ao aumento da oferta, tornando o produto mais popular e acessível. Os principais cogumelos são o *Agaricus bisporus* Lange (*Champignon*), o *Lentinula edodes* Berk (*Shiitake*) e espécies do gênero *Pleurotus*. Têm-se atribuído aos cogumelos comestíveis propriedades terapêuticas no tratamento de diversas enfermidades, sobretudo no uso conjunto de terapias contra tumores cancerígenos. Nesse sentido, estudos científicos sobre agentes antitumorais têm tido progressos a partir de polissacarídeos extraídos de cogumelos.

A espécie *Agaricus blazei* começou a despertar grande interesse a partir de estudos científicos que o relatam como tendo propriedades medicinais potenciais. Esta espécie também é conhecida popularmente como “cogumelo do sol”, sendo seu cultivo comercial no Brasil iniciado na década de 1990. Por se tratar de uma cultura recente e dada a escassez de pesquisas, o cultivo de *A. blazei* ainda é praticado de forma relativamente empírica e sem muito embasamento técnico pela maioria dos produtores. A maior produção de *A.*

blazei encontra-se no estado de São Paulo, principalmente nas épocas de primavera e verão.

Como uma das etapas do cultivo do *A. blazei*, a compostagem é importantíssima para a obtenção de maior produtividade e qualidade. A compostagem é uma prática antiga, que consiste na decomposição controlada de restos vegetais e esterco, obtendo matéria orgânica bio-estabilizada ou humificada, após uma seqüência de processos microbianos sobre a matéria orgânica, provavelmente pela ação de fungos, bactérias e actinomicetos. No decurso do processo de compostagem, desenvolve-se uma atividade microbiana que provoca a elevação da temperatura, variável de acordo com o local da pilha, também chamada de meda ou leira.

O processo convencional de compostagem para o cultivo do cogumelo *Agaricus blazei* requer a utilização de uma câmara de pasteurização que tem o objetivo de pasteurizar e eliminar o excesso de amônia do composto. Para a produção do composto sem esse sistema, devem-se estabelecer condições especiais para evitar a presença de amônia no composto final. Os métodos de compostagem procuram conciliar a importância da fase de alta temperatura (Fase I) com a sobrevivência ou restauração da microbiota termófila na Fase II, de finalização dos substratos. No cultivo de *A. bisporus* em países que possuem alta tecnologia para esta atividade, tem sido utilizada uma técnica de compostagem denominada “indoor”, cuja fase I é também conduzida em um túnel por um período de 7 dias, sendo adicionado um “ativador biológico” apropriado, que influencia diretamente a produtividade de *A. bisporus*. Este “ativador biológico” é constituído de bactérias e fungos, porém, empresas que possuem o domínio desta tecnologia não revelam quais são os microrganismos envolvidos no processo.

O processo de compostagem e pasteurização para cultivo de *Agaricus blazei* mais utilizado no Brasil é derivado do processo utilizado para cultivo de

Agaricus bisporus. Este método é constituído de duas etapas, dos quais a primeira denominada “*outdoor*”, em que as matérias-primas são pré-umedecidas e montadas em pilhas ou medas, que são reviradas algumas vezes, durante duas semanas, aproximadamente. Na segunda etapa, “*indoor*”, o material que estava em compostagem passa por pasteurização de aproximadamente 6 horas, à temperatura em torno de 60°C. Logo após, o composto fica sob ventilação forçada, chegando à temperatura de 45°C. Esse processo é denominado condicionamento físico-químico-biológico, que ocorre durante 14 dias em média. Na Fase II da compostagem (pasteurização e condicionamento) ocorre a eliminação de amônia, promovendo maior seletividade do substrato por meio da eliminação de microrganismos que poderiam competir com *Agaricus*, além de eliminar larvas de insetos.

Desse modo, os objetivos deste trabalho foram avaliar a produtividade e a eficiência biológica (EB), por meio de quatro experimentos, quanto ao efeito do teor de nitrogênio, inoculantes (bactérias: *Alcaligenes faecalis*, *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas stutzeri*, e fungo, *Scytalidium thermophilum*) e métodos de compostagem para o cultivo de *Agaricus blazei*. Outros aspectos analisados foram os teores de nitrogênio total ao final do processo de preparo do substrato, como também de nitrogênio amoniacal, celulose, hemicelulose e lignina. Foram observados também o crescimento micelial, o número médio de cogumelos, a massa média dos cogumelos e o percentual de cogumelos colhidos por ciclo de 15 dias a partir do surgimento do primeiro cogumelo.

2 REFERENCAL TEÓRICO

2.1 *Agaricus blazei*

O cogumelo *Agaricus blazei* faz parte dos microrganismos eucarióticos e é classificado no Reino *Fungi*, divisão Basidiomycota, ordem Agaricales, família Agaricaceae, espécie *Agaricus blazei* (Alexopoulos et al., 1996) (Figura 1).

De ocorrência natural na Mata Atlântica do sul do estado de São Paulo, em 1965, algumas amostras foram levadas para o Instituto Iwade de Cogumelos, no Japão, com o intuito de estudar suas propriedades medicinais. Em 1967, este cogumelo foi identificado por Heinemann como *Agaricus blazei* Murrill. Devido às condições climáticas serem favoráveis ao cultivo deste cogumelo, matrizes reproduzidas ainda no Japão foram enviadas de volta ao Brasil e, desde então, várias técnicas de produção têm sido adaptadas (Mizuno et al., 1990; Mizuno, 1995a/b; Iwade e Mizuno, 1997; Braga, 1997).



FIGURA 1 Ilustração do *Agaricus blazei* CS1

No Brasil, normalmente, uma empresa é responsável por todas as etapas de produção e também fornece substratos colonizados para outros produtores com menores recursos tecnológicos. Neste caso, o produtor compra o composto colonizado e transfere o material para o campo ou estufa, cuidando apenas das etapas de frutificação, colheita, secagem e comercialização (Dias et al., 2002).

Segundo o setor de promoção comercial da Embaixada do Brasil em Tóquio (www.brasemb.or.jp/porutogatu/relac/secom/agaricus.PDF - atualizado em janeiro/2005), o mercado de *Agaricus blazei* Murril teve seu pico de consumo no período de 1998 a 2000, mas, atualmente, se encontra estável. Em 2004, alcançou 30 bilhões de ienes (US\$ 290 milhões) nas vendas ao varejo, sendo que a produção japonesa ocupa em torno de 20% do mercado japonês. O volume de importação de *Agaricus* no mercado japonês, em 2004, foi estimado em 350 toneladas, das quais 200 pela China, que é responsável por 57% do volume total, seguida do Brasil com 100 toneladas (28%). Os preços médios de importação praticados atualmente alcançam 3.000 a 6.000 ienes/kg (US\$ 28 a US\$ 57) para cogumelos provenientes da China e 12.000 a 25.000 ienes/kg (US\$ 114 a US\$ 238) quando originários do Brasil. Os preços diferenciados praticados entre os produtos originários do Brasil e da China devem-se à preferência dos japoneses pelos produtos orgânicos, pois foram encontrados resíduos de agrotóxicos em produtos provenientes da China em 2002.

Apesar do crescente interesse dos produtores pelo cogumelo *A. blazei*, verifica-se que a produção do mesmo apresenta alguns problemas. Um deles é a falta de uniformidade na produtividade, verificando-se, às vezes, um grande fracasso na produção. Outro problema enfrentado é a discussão quanto à uniformidade na composição de β -glucana no cogumelo, que é a substância de maior interesse, devido às suas propriedades antitumorais (Higaki et al., 1997).

2.1.1 Histórico do *Agaricus blazei*

A identificação e a classificação das espécies de *Agaricus* têm sido baseadas em características morfológicas e fisiológicas pela maioria dos especialistas em taxonomia e, mais recentemente, em métodos genéticos, moleculares e bioquímicos. As espécies de *Agaricus* são diferenciadas principalmente pela coloração, forma e dimensão dos corpos de frutificação e estruturas microscópicas (esporos, lamelas, cistídios, etc.). Sob condições naturais e artificiais, este fungo pode apresentar diversas linhagens, sendo observadas a partir de características morfológicas das colônias fúngicas desenvolvidas em diferentes meios de cultivo artificiais de laboratório, temperaturas e luminosidade (Urban, 2005).

Takatoshi Furomoto, na década de 1960, descobriu, em sua propriedade, na região de Piedade, SP, um cogumelo diferente que chamou sua atenção. Não tendo conseguido identificá-lo, enviou amostras desse cogumelo para o Japão, para serem analisadas pelo Instituto de Cogumelos Iwade, o qual encaminhou essa mesma amostra para o Dr. Paul Heinemann, especialista em taxonomia de cogumelos na Bélgica, que identificou o fungo como *Agaricus blazei* Murrill. Esta espécie já tinha sido descrita na Flórida, por Murrill, em 1945, uma espécie de ocorrência natural na América do Norte. Ao mesmo tempo em que enviava a amostra para o Japão, o Sr. Furomoto enviou uma amostra para o Instituto Botânico de São Paulo que, imediatamente, enviou-a para o Instituto Real de Botânica, na Inglaterra, aos cuidados do Dr. Pegler que identificou o cogumelo como sendo muito parecido ao *Agaricus silvaticus* Schaeffer, um fungo húmico florestal, de distribuição cosmopolita. Com base nisso, uma empresa adotou, erroneamente, o nome *Agaricus silvaticus* Schaeffer (ref).

Wasser et al. (2002), em um estudo morfológico comparativo, concluíram que a espécie endêmica norte-americana *A. blazei* ss. Murrill e a medicinal amplamente cultivada *A. blazei* ss. Heinem. são, na verdade, duas

espécies diferentes, sendo proposta uma re-classificação da espécie. *Agaricus blazei* ss. Heinemann foi, então, aclamada como uma nova espécie, denominada *Agaricus brasiliensis*. Porém, segundo Urben (2005), com base em testes morfológicos e fisiológicos, relatou que *Agaricus sylvaticus* e *Agaricus brasiliensis* são sinônimos de *Agaricus blazei*. Kerrigan (2005), em estudos baseados no seqüenciamento da região ITS do rDNA e em análises genéticas de progênies híbridas, verificou que todas as definições que foram atribuídas a esse cogumelo até o momento (*A. blazei*, *A. sylvaticus* e *A. brasiliensis*), são, na verdade, sinônimas de uma única espécie: *Agaricus subrufescens*. Mas, a denominação *Agaricus blazei* tem sido a mais usada na literatura sobre aspectos biotecnológicos e medicinais do cogumelo, assim como na maioria dos seus produtos comercializados (Amazonas, 2004).

2.1.2 Importância do *Agaricus blazei*

Os cogumelos são alimentos de elevado valor nutritivo, contendo poucas calorias e com 85% a 90% de água. Quando desidratado, é rico em proteínas e carboidratos, contendo de 40% a 45% de proteína bruta, 38% a 45% de carboidratos, 6% a 8% de fibra, 5% a 7% de cinzas e 3% a 4% de lipídeos, com predominância do ácido linoléico (70% a 78%). Contém vitaminas do complexo B (B1 e B2), niacina e grande quantidade de potássio (2,97%), além de outros minerais, como P, Mg, Ca, Na, Cu, Zn, Fe, Mn e Mo (Crisan & Sands, 1978; Steineck, 1987; Quimio et al., 1990; Vedder, 1991; Mizuno, 1995; Ranzani & Sturion, 1998; Moraes et al. 2000, Urben, 2004).

Os cogumelos comestíveis contêm importantes propriedades funcionais, em particular β -glucanas, homo e hetero-glucanas, supostamente responsáveis por algumas propriedades benéficas à saúde humana, como atividade imunomodulatória, antioxidante, antiinflamatória e anticancerígena (Park et al., 2003).

A espécie *Agaricus blazei* começou a despertar grande interesse a partir de estudos científicos que o descrevem como tendo propriedades medicinais potenciais. Estudos em cobaias apresentaram que polissacarídeos do tipo β -glucanas, extraídos de basidiocarpos de *A. blazei*, exerceram forte ação contra tumores tipo Sarcoma 180 induzidos nas cobaias (Mizumo et al., 1990; Kawagishi et al., 1990; Itoh et al., 1994; Osaki et al., 1994). No Brasil, vêm sendo realizados estudos sobre a ação antimutagênica de extrato dos cogumelos *L. edodes* e *A. blazei* (Denadai et al., 1998; Alves de Lima et al., 1998).

O *Agaricus blazei* vem sendo utilizado como nutracêutico por seus atributos de aumentar as defesas imunológicas do organismo (Urban, 2005). Este cogumelo tem sido objeto de vários estudos no Japão, para onde foi enviado logo após a sua descoberta, e o grande interesse, inicialmente, estava nas suas propriedades medicinais, principalmente a atividade antitumoral apresentada por polissacarídeos (Kawagishi et al., 1988; Kawagishi et al., 1989; Itoh et al., 1994; Osaki et al., 1994; Higaki et al., 1997; Ito et al., 1997).

Posteriormente, verificou-se que a fração com maior atividade antitumoral era compreendida de proteína e polissacarídeo de ligação $\beta(1\rightarrow6)$, chamado β -D-Glucana (Kawagishi et al., 1989). Logo depois, confirmou-se que as duas substâncias formam um complexo proteína-glucana e que este complexo é que apresenta atividade antitumoral (Kawagishi et al., 1989). Esta descoberta levou a uma série de outros estudos sobre o mecanismo de ação desse complexo proteína-glucana (Itoh et al., 1994; Ito et al., 1997), além da descoberta de outras substâncias presentes no corpo de frutificação de *A. blazei*, apresentando atividades antimutagênicas e bactericidas (Osaki et al., 1994).

Takaku et al. (2001) isolaram uma substância antitumoral da fração lipídica do *A. blazei* chamada ergosterol, que também é encontrada em *Lentinula edodes* (*Shiitake*) e *Polyporus umbellatus*. Esses resultados sugerem que o ergosterol e seu metabólito estejam envolvidos na inibição da angiogênese.

O seu valor nutricional e medicinal, aliado às características peculiares quanto ao seu sabor, fragrância de amêndoas (doce e fresca) e excelente textura, o tornam particularmente adequado a inúmeras aplicações culinárias, sendo um dos cogumelos cultivados mais valorizados no mercado mundial (Stijve et al., 2002). Assemelha-se ao *Champignon*, mas, apresenta o estipe mais longo e espesso, sendo considerado um material adequado para a composição de pratos japoneses, chineses e ocidentais (Mizuno et al., 1990). Segundo Siqueira (2002), especialista em gastronomia de cogumelos, o *A. blazei* possui sabor adocicado, combinando bem com alimentos doces, temperados com cravo, canela e erva-doce, podendo ser acrescentado às receitas de bolos, compotas de frutas, gelatinas, biscoitos doces e outros.

O cogumelo *A. blazei* é comercializado desidratado em pó ou fatiado e seu uso é indicado como suplemento alimentar e como “nutracêutico”, considerando suas propriedades nutricionais (“alimento funcional”); é consumido também na forma de chá (extrato aquoso quente) ou na forma de suco (extração aquosa a frio), a partir da infusão dos cogumelos já secos em água (Eira, 2003).

2.2 O cultivo de *Agaricus blazei*

O cultivo de *Agaricus blazei*, em escala comercial, é recente e as técnicas de cultivo são ainda empíricas. Porém, alguns produtores têm conseguido bons resultados de produtividade (10% a 15% de cogumelos frescos por peso de composto úmido), juntamente com uma boa qualidade final do produto.

Apesar disso, a produtividade do *Agaricus blazei* é muito variável, principalmente devido às variáveis ligadas ao ambiente e a outros fatores, tais como tipo de substrato, camada de terra de cobertura, características genéticas das linhagens, como também pragas e doenças, que são fatores ainda em estudo

e, dessa forma, torna-se impraticável precisar níveis de produtividade em cultivos deste cogumelo.

Por tratar-se de cogumelo do mesmo gênero, a técnica de cultivo de *Agaricus blazei* em muito se assemelha a do *Agaricus bisporus* (*Champignon*), portanto, ele partilha de várias etapas do cultivo de *Champignon*, tais como:

1. preparo do substrato de cultivo (compostagem):
 - Fase I da compostagem (*outdoor*);
 - Fase II da compostagem (pasteurização e condicionamento “*indoor*”);
2. inoculação;
3. incubação do substrato inoculado;
4. cobertura do substrato (*casing layer*);
5. indução de primórdios e produção de cogumelos;
6. colheita e processamento.

2.3 Substrato para cultivo de *Agaricus blazei*

O processo de preparo do substrato é a parte mais dispendiosa do cultivo (Molena, 1986; Ferrato & Prola, 1994; Eira & Braga, 1997). Assim, procuram-se novos métodos de compostagem rápida, que abreviem as operações e o tempo de ocupação das instalações, racionalizem materiais, evitando a perda de nutrientes, minimizem o impacto ambiental e ofereçam produtividade e confiabilidade maiores.

O substrato para o cultivo comercial de *Agaricus blazei* é produzido por meio do processo de compostagem. A compostagem pode ser definida como um processo aeróbio, controlado, baseado na termogênese microbiana por meio da transformação (bioestabilização) de resíduos orgânicos (Pereira Neto, 1989; Lima, 1990; Kiehl, 2004), resultado em uma estabilidade biológica na qual haja nutrientes assimiláveis ao cogumelo e resistentes à ação das espécies

competidoras, tendo assim um substrato seletivo (Gerrits, 1988; Randle & Smith, 1986; Levanon, 1988). Algumas propriedades físicas e químicas são importantes durante a compostagem, tais como a permeabilidade do ar, retenção de umidade, o pH, o nitrogênio orgânico e a concentração final de amoníaco.

As matérias-primas são constituídas por diversos tipos de palhas ou capins, cama de cocheira de eqüinos ou de aviário, gesso e quantidades menores de uréia, farelos, tortas ou resíduos agrícolas de baixo custo (Celso, 1999).

2.3.1 Formulação do composto e compostagem (Fase I)

Segundo Eira (2003), os cogumelos do gênero *Agaricus* possuem enzimas lignolíticas, celulolíticas e hemicelulolíticas. Entretanto, deve-se para esclarecer que os cogumelos nutrem-se, e muito bem, de açúcares, mas, sob condições naturais não assépticas, se tais compostos estiverem presentes, é a microbiota mesofílica e termofílica que prevalecerá no sistema e não permitirá a colonização do substrato pelo cogumelo. Esta é a razão pela qual, sob condições naturais, faz-se necessário o pré-tratamento do substrato pela compostagem, pasteurização e condicionamento do composto, para que se estabeleça uma microbiota responsável pela biostase favorável ao cultivo do cogumelo.

Na literatura, encontram-se muitas formulações de substratos, os quais, de maneira geral, podem ser divididos em compostos clássicos, utilizando esterco eqüino, de aves e outros dejetos e compostos sintéticos, cujas fontes de nitrogênio têm composição mais estável, possibilitando maior repetibilidade entre os ciclos de produção. Os compostos clássicos são ainda muito utilizados por seu baixo custo, disponibilidade e para reciclagem de resíduos agrícolas e zootécnicos (Rinker, 1993). Urban (2004) relatou que o composto para cultivo de *Agaricus blazei* é constituído, em geral, de materiais fibrosos à base de palhas vegetais (ricos em carbono e pobres em nitrogênio) que deve ser distribuído em

pilhas, e que o nitrogênio orgânico deve ser corrigido com adição de alguns materiais suplementares, tais como farelos e tortas tendo uma relação C/N inicial entre 25-30. Esta suplementação geralmente é feita por meio de sulfato de amônia ou uréia, superfosfato, calcário ou carbonato e sulfato de cálcio (gesso agrícola). Eira (2003) ressaltou a importância do uso da uréia, por ser fonte barata e concentrada de N-orgânico, em substituição parcial do farelo de soja (mais caro), além de permitir formulações de composto com maior repetibilidade em relação ao uso de esterco de galinha ou de cavalo (compostos naturais pouco repetitivos).

2.3.2 Nutrição do cogumelo

Segundo Flegg et al. (1985), há uma literatura vasta sobre informações nutricionais do *Agaricus bisporus*, ao contrário do que ocorre com o *Agaricus blazei*. O *Agaricus bisporus* é um organismo heterotrófico e, como todos os demais fungos, requer, para sua nutrição, compostos orgânicos produzidos por outros organismos autotróficos, em especial as plantas. Para o seu crescimento, a maioria dos fungos depende de vários tipos de nutrientes: fonte de carbono, fonte de nitrogênio e outros elementos minerais, além de fatores de crescimento, como vitaminas, aminoácidos, entre outros, dependendo da espécie de fungo.

2.3.2.1 Fontes de carbono

Flegg et al. (1985) ressaltaram que, na natureza, vários fungos, dentre eles os cogumelos, utilizam como fonte de carbono os polissacarídeos produzidos pelas plantas, como celulose e hemicelulose. Açúcares simples, como glicose, frutose e xilose, são facilmente utilizados, enquanto outros açúcares e ácidos orgânicos são pouco ou não utilizados.

Para a utilização de polissacarídeos, o fungo depende da produção de enzimas, as quais são produzidas e excretadas para o meio, como as celulasas,

xilanases, lacases, entres outras, responsáveis pela quebra das macromoléculas correspondentes em unidades de açúcar assimiláveis pelo fungo (Flegg et al., 1985). Segundo os mesmos autores, algumas espécies de fungos possuem também a capacidade de degradação da lignina, um composto polifenólico normalmente de difícil decomposição. A degradação da lignina ocorre mediante ação de um conjunto de enzimas chamadas genericamente de ligninases. Estudos sobre a atividade enzimática extracelular durante os vários estágios dos ciclos de produção do cogumelo *A. bisporus* mostraram que a atividade de lacase aumentou até o primeiro fluxo de frutificação, quando então declinou, enquanto a atividade de endocelulase apresentou um comportamento contrário. Outros estudos sugeriram que um complexo ligno-protéico formado durante a compostagem é utilizado, preferencialmente, durante o crescimento micelial no composto. Por ocasião do primeiro fluxo de frutificação, ocorre um declínio na utilização desse complexo e ocorre uma transição para uma rápida e vigorosa utilização de celulose e hemicelulose. Acredita-se que o aumento da atividade de celulase a partir do primeiro fluxo seja necessário para suprir a necessidade de carboidrato para a formação dos basidiocarpos (Flegg et al., 1985).

2.3.2.2 Fontes de nitrogênio

Várias espécies de fungos são incapazes de assimilar nitrogênio na forma de nitrato. Por isso, recomenda-se, geralmente, a utilização de nitrogênio na forma de amônia e uréia. Vários aminoácidos podem ser utilizados também como fonte de nitrogênio. Fontes mais complexas podem também ser utilizadas, como é o caso da caseína solúvel, a qual é utilizada eficientemente por *A. bisporus* como fonte única de carbono e nitrogênio, com a ajuda de proteases extracelulares (Flegg et al., 1985).

2.3.2.3 Elementos minerais

Segundo Flegg et al. (1985), nove elementos minerais são considerados essenciais para todos os fungos, sendo quatro macronutrientes (Mg, P, K e S), os quais são requeridos a uma concentração de 10^{-3} Mol e cinco micronutrientes (Cu, Fe, Mn, Mo e Zn), os quais são requeridos a uma concentração de 10^{-6} M ou menos (Cu, Fe), 10^{-7} (Mn), 10^{-9} (Mo) e (Zn) 10^{-8} . Para o *A. bisporus*, foi acrescentado como macronutriente o cálcio. Os autores ressaltaram que é necessário enfatizar que muitos estudos sobre as necessidades de elementos minerais são prejudicados pela presença de impurezas nos reagentes e nas vidrarias, em especial quando tratam-se dos estudos de micronutrientes.

O efeito de um elemento mineral sobre o crescimento micelial do cogumelo em um meio de cultura pode ser diferente do efeito de mesmo elemento no composto de cultivo. Apesar de apresentar o mesmo efeito fisiológico sobre o *A. bisporus*, o nutriente pode ter um efeito indireto no composto, agindo sobre os microrganismos responsáveis por sua transformação. Além disso, é necessário considerar que, no composto, os nutrientes estão complexados de várias formas, o que afeta a sua disponibilidade. A maioria dos elementos minerais não é adicionada nas formulações de composto na forma de suplementos minerais porque as matérias-primas utilizadas (bagaço, palhas e esterco) já possuem esses elementos em quantidade suficiente. Esterco de cavalo e galinha são substratos ricos em elementos essenciais, de maneira que nenhum dos elementos essenciais (incluindo o cálcio) será limitante em um composto bem formulado (Flegg et al., 1985).

A deficiência de fósforo em meio de cultura provoca maior limitação no crescimento micelial do *A. bisporus* do que qualquer outra deficiência mineral. É possível, que por isso, haja uma preocupação de se adicionar fosfato no composto de cultivo na maioria das formulações existentes. No entanto, os

resultados da suplementação de fosfato no composto têm sido contraditórios em termos de produção de cogumelo (Flegg et al., 1985).

O cálcio, apesar de não ser essencial para todos os fungos, tem sido considerado essencial para a formação do corpo de frutificação, além de ser encontrado formando uma bainha de cristais de oxalato de cálcio circundando as hifas do fungo. Praticamente todas as formulações de composto possuem gesso (sulfato de cálcio), portanto, há um suprimento suficiente desse elemento para o cogumelo. A adição do gesso ao composto é recomendada para torná-lo menos gorduroso, melhorando a sua estrutura e, conseqüentemente, a sua aeração, facilitando a colonização do composto pelo fungo. Além disso, tem sido atribuída uma ação antagonística do cálcio contra injúrias provocadas no micélio por íons de potássio, magnésio e sódio. O cálcio promoveria, portanto, um balanço quando esses íons estivessem presentes em concentrações inibitórias (Flegg et al., 1985).

Vários metais não essenciais são encontrados quando se faz uma análise química dos basidiocarpos, entre eles metais pesados, como cádmio, mercúrio e prata. Por isso, a presença desses elementos deve ser monitorada periodicamente e de preferência, deve-se conhecer a origem da matéria-prima utilizada na formulação do composto (Flegg et al., 1985).

2.3.2.4 Vitaminas e outros fatores de crescimento

Segundo Flegg et al. (1985), a biotina e a tiamina têm sido apontadas como vitaminas essenciais para o crescimento do *A. bisporus*, em concentrações micromoleculares.

Outros fatores de crescimento, como os aminoácidos fenilalanina, metionina e prolina, e lipídios, como o ácido linoléico, são importantes para o crescimento micelial do fungo. Apesar da sua importância, não há uma preocupação quanto à sua adição ao composto de cultivo porque os mesmos ou

já estão presentes nos resíduos utilizados ou são sintetizados pela microbiota do composto, como acontece, por exemplo, com as vitaminas do complexo B, as quais são sintetizadas por actinomicetos termófilos, bactérias e fungos.

2.3.3 Temperatura da compostagem

Segundo Eira (2003), na meda em compostagem, a atividade microbiana caracteriza-se pela elevação da temperatura, que varia com o local. Assim, na superfície, prevalece baixa umidade e condições máximas de aerobiose, ao passo que, na região central, as condições são parcialmente anaeróbicas e a temperatura é elevada. Embora a maior parte do metabolismo na compostagem seja fermentativo, as transformações ocorrem mais uniformemente quando se faz revolvimento periódico que propicia condições momentaneamente aeróbias, impedindo o estabelecimento de anaeróbios estritos. A reviragem reduz e uniformiza a temperatura da meda de compostagem e promove homogeneização dos componentes. Na compostagem, a retenção de nitrogênio na biomassa depende do teor inicial de nitrogênio e da presença de carbono mais prontamente disponível no composto (van Griensven, 1988). Formulações de composto com elevado teor inicial de nitrogênio e baixo teor de carbono assimilável redundam em maior perda por volatilização do NH_3 e menor incorporação de N na biomassa. A temperatura e a concentração de oxigênio tendem a variar nas leiras, tanto temporal como espacialmente (20°C a 80°C; 0% a 21% de O_2), alteradas constantemente pela atividade microbiológica e pelas reviragens periódicas (Miller et al., 1989).

2.3.4 Pasteurização e condicionamento (Fase II)

A pasteurização do composto para *Agaricus spp.* nada mais é que a elevação uniforme da temperatura do composto a, aproximadamente, 60°C a 62°C durante 4 a 6 horas e tem a finalidade de promover o saneamento do

composto, eliminando a microbiota e alguns microrganismos mesofílicos prejudiciais à colonização do fungo. Após a pasteurização, segue-se o condicionamento químico, físico e biológico do composto, que requer, no mínimo 8 dias a 45°C a 50°C dentro do túnel (Eira, 2003; Oei, 2003; Buth, 2004; Urban, 2004).

O pasteurizador deve possibilitar o controle da temperatura, por meio do sistema de ventilação, ajustando-se as proporções de reciclagem do ar quente (150 a 200 m³/t. h) e o ar novo e filtrado (10 a 40 m³/t. h), para que a temperatura eleve-se entre 60°C e 62°C, durante quatro e cinco horas e, a seguir, baixe entre 45°C e 50°C, mantendo-se um regime de ventilação constante durante 7 a 10 dias (condicionamento), quando, então, se promove o resfriamento rápido para 26°C e efetua-se a inoculação. Esta etapa de cálculos é, talvez, a mais importante no detalhamento da Fase II de pasteurização e condicionamento do composto. Um sistema de ventilação subdimensionado, com um volume de reciclagem abaixo de 150 m³/t hora e com uma pressão estática insuficiente para vencer a camada de composto dentro do pasteurizador, irá prejudicar a aeração e, principalmente, a uniformidade da ventilação no pasteurizador. Nesta situação, a termogênese do composto ficará prejudicada e a temperatura não alcançará naturalmente os 60°C indispensáveis à pasteurização do composto num período de no mínimo 4 e 6 horas. Também não fornecerá o oxigênio necessário ao desenvolvimento dos termófilos durante o condicionamento do composto (Eira, 2003).

2.3.4.1 Função básica da Fase II

A principal função da Fase II é chegar à seletividade física, química e biológica do composto. Num substrato “seletivo”, o micélio do *Agaricus* crescerá de forma excludente em relação aos microrganismos competidores

devido, em parte, à ausência de nutrientes facilmente assimiláveis, como açúcares simples e aminoácidos (Ross e Harris, 1983a; Stölzer e Grabble, 1991).

2.3.4.2 Interação entre o *Agaricus* e outros microrganismos

Ross e Harris (1983a) relataram que o fungo termófilo *Torula thermophila* Cooney & Emerson (1964) (*Scytalidium thermophilum*) estimulou o crescimento do *Agaricus bisporus* e suprimiu competidores, além de acelerar o desaparecimento da amônia. Outros microrganismos termófilos, citados por Straatsma et al. (1994a) como sendo estimuladores do micélio de *Agaricus bisporus* em composto esterilizado, são os seguintes: *Chaetomium thermophilum*, *Chaetomium sp.*, *Malbranchea sulfurea*, *Myriococcum thermophilum*, *Stilbella thermophila*, *Thielavia terrestris* e dois basidiomicetos não identificados.

A interação entre o *Agaricus bisporus* e outros fungos e actinomicetos termófilos vem sendo estudada no Brasil, visando à inoculação desses microrganismos, no início da Fase II, como um trunfo para a obtenção de substratos de boa qualidade (Celso, 1999). Ross & Harris (1983a, 1983b) argumentaram que alguns fungos termófilos dominam o final do processo (declínio da termogênese), levando ao desaparecimento do amoníaco, que é muito tóxico ao *Agaricus bisporus*. No resfriamento a 25°C, para a inoculação do *A. bisporus*, os termófilos entram em latência e a estrutura celular dessa biomassa é digerida e assimilada pelo *Agaricus*. Os cultivadores associam um composto de qualidade à presença de actinomicetos (micélio branco, referido como *fire fang*).

2.3.5 Método “indoor”

Na Alemanha, na década de 1960, foi utilizado substrato esterilizado, ou seja, substrato sem degradação microbiana, para cultivo de *A. bisporus* (Till,

1962). Os resultados de rendimento foram compatíveis e uniformes com o método tradicional de produção de compostagem para o cultivo deste cogumelo, apresentando também período bem mais curto. Porém, este método que mantinha o substrato em condições axênicas por meio da autoclavagem foi deixado de lado por motivos técnicos e econômicos (Molena, 1986; Laborde et al., 1993).

O método “indoor” é uma tecnologia que visa abreviar e reduzir as perdas durante a compostagem, usando alguns dos termófilos citados no item anterior e que promove índices de até 100% de eficiência biológica (Houdeau et al., 1991; Laborde, 1993). A tecnologia é emergente e reúne as fases I e II convencionais num único sistema de 6 a 7 dias, num mesmo túnel. Entre as fases do processo, é introduzido um “ativador biológico” apropriado (um ou vários termófilos) que padroniza a Fase II. Essa técnica está em franca expansão desde 1985, em países europeus e na Austrália, demonstrando ser um processo uniforme, mais econômico e menos poluente que o tradicional, chegando a 100% de eficiência biológica (EB) no cultivo de *A. bisporus* (Laborde et al., 1993; Summerfield, 1996). Essa tecnologia emergente combina as fases I e II convencionais num sistema de 7 dias num mesmo túnel, sendo que entre as fases do processo é introduzido um “ativador biológico” apropriado, que influencia diretamente a Fase II e, por conseqüência, a produtividade no cultivo de *Champignon* (Laborde et al., 1987).

Em países como Inglaterra, Holanda, Austrália e Bélgica foram feitos trabalhos simultâneos sobre o método *indoor* em condições ótimas para o crescimento de determinados fungos termófilos que promovem a seletividade do composto para produção de *A. bisporus*. O processo foi feito em uma única fase, com temperaturas de 45°C a 50°C, durante 5 a 7 dias, tendo a temperatura de pasteurização chegado a 58°C por um tempo de 6 horas sob forte ventilação (Laborde et al., 1993).

Gulliver et al. (1991), na Austrália, apresentaram um método denominado de *environmentally controlled composting*, ou ECC, no qual a compostagem foi feita entre 6 e 8 dias, com temperaturas iniciais de 54°C (1 a 3 dias) e de 47°C nos demais, para melhor crescimento de bactérias e fungos termófilos.

Segundo Eira (2003), a utilização da tecnologia de compostagem denominada “*indoor*” ainda está sendo estudada. Sua eficiência é muito difícil de ser comprovada em compostos naturais, pois, a população natural já existente, se favorável, mascara ou supera a inoculação dos microrganismos termófilos. Eira (2003) ainda ressaltou que, em situações nas quais os “bons” termófilos estiverem ausentes, a inoculação de termófilos eficientes selecionados na fase II poderá resultar em composto mais seletivo, baixo teor de NH₃ e como nutriente orgânico para o cogumelo. A seletividade de um composto nada mais é que um meio nutritivo que foi preparado para o crescimento micelial do cogumelo, de modo que seja inadequado para os competidores. Pesquisas apontam que o fungo termofílico *Scytalidium thermophilum* é um fator determinante nesta seletividade do composto (Buth, 2005; Oei, 2003). Num substrato “seletivo”, o micélio do *Agaricus bisporus* crescerá de forma excludente em relação aos microrganismos competidores pela ausência de nutrientes facilmente assimiláveis, como açúcares simples e aminoácidos (Ross & Harris, 1983a; Stölzer & Grabble, 1991).

2.3.6 Final da compostagem

Na formulação de um lote de composto, o produtor terá que considerar uma perda de massa durante o processo de compostagem, decorrente do consumo metabólico dos microrganismos, da ordem de 35% da matéria seca inicial. Portanto, para cada tonelada de matéria-prima perdem-se 350 kg de massa seca ao final da compostagem (Urban, 2004). Uma característica

distintiva da qualidade de um composto chama-se “seletividade”. Num substrato “seletivo”, o micélio do *Agaricus blazei* crescerá, preferencialmente, em relação aos microrganismos competidores devido, provavelmente, à ausência de nutrientes facilmente assimiláveis como açúcares simples e aminoácidos (Eddy & Jacobs, 1976 apud Ross & Harris, 1983a; Stölzer & Grabbe, 1991). O manejo incorreto da compostagem pode levar ao aparecimento no período de incubação de *A. bisporus*, de fungos mesófilos contaminantes competidores (Harvey et al., 1982), tais como: *Chaetomium olivaceum*, *Coprinus* sp, *Doratomyces stemonitis*, *Fusarium* sp, *Sepedonium* sp, *Scopulariopsis brevicaulis*, *Trichoderma viride*, *T. harzianum* e outros, que competem pela nutrição do composto, elevam a temperatura, produzem metabólitos tóxicos e, conseqüentemente, reduzem ou até inviabilizam a produtividade do cogumelo (Vijay & Gupta, 1994). Segundo Fergus (1982), muito destes fungos mesófilos resistem às temperaturas de pasteurização.

2.3.6.1 Seletividade do substrato

Alguns autores, na literatura sobre compostagem para cultivo de *Agaricus bisporus*, relataram os aspectos químicos provocados pelas altas temperaturas da fase I, como, por exemplo, a formação de carboidratos complexos “caramelizados”, complexos lignina-nitrogênio, complexos húmico-polissacarídeos ou produtos de reação de Maillard. Temperaturas entre 65°C e 80°C da Fase I aumentam a produção de NH_4^+ e NH_3 , em pH alcalino, acelerando a degradabilidade das paredes celulares da palha, podendo ser um importante fator de seletividade ligado à fase I (Savoie et al., 1995).

A seletividade do substrato, segundo Stölzer & Grabbe (1991), seria o empobrecimento de nutrientes solúveis, decorrente do processo de bioestabilização na compostagem. A imobilização de nutrientes, na forma de complexos envolvendo macromoléculas de carboidratos, proteínas, lignina e

húmus, torna o meio resistente à competição de microrganismos, como deuteromicetos, ascomicetos, entre outros, propiciando, assim, um ambiente favorável ao basidiomiceto. A biomassa viva, mas dormente sob condições de temperatura ambiente, imobiliza nutrientes para o desenvolvimento do cogumelo (Ross & Harris, 1982).

2.3.7 Microbiota da compostagem

A condição física do composto é avaliada a partir da coloração do material após o processo da compostagem, apresentando uma coloração escura (marrom) e textura macia. A produção de melanina é comum em fungos e actinomicetos durante a compostagem, contribuindo para a produção de materiais que deixam o composto com uma coloração escura (Atkey & Wood, 1983). As bactérias, actinomicetos e fungos são responsáveis por mais de 95% da atividade microbiana que ocorre no processo de compostagem. Assim, diversos grupos diferentes de microrganismos participam no condicionamento de um substrato seletivo em que o *A. blazei* e *A. bisporus* possam se desenvolver. Microrganismos mesófilos iniciam o processo de compostagem utilizando carboidratos simples e nitrogenados solúveis. Após rápida elevação de temperatura, gerada pela atividade microbiana, estabelece-se uma sucessão de populações termotolerantes e termófilas. No estágio inicial de absorção d'água, as bactérias dominam. Actinomicetos termófilos geralmente aparecem quando o carbono e nitrogênio facilmente assimiláveis esgotaram-se e a água livre diminui. Fungos termófilos somente começam a aparecer no estágio final da compostagem (Smith et al., 1995).

Segundo Azevedo (2004), a microbiota predominante no processo de compostagem para *Agaricus blazei* foi de bactérias em comparação ao total de microrganismos identificados dentro do composto (bactérias, fungos filamentosos e actinomicetos). As bactérias gram-positivas foram mais

abundantes quando comparadas às gram-negativas. As bactérias gram-positivas em maior frequência foram as dos gêneros *Bacillus* e *Paenibacillus*. Estas apresentaram maior diversidade de espécies em relação às bactérias gram-negativas, porém com menor incidência. As bactérias gram-negativas foram mais diversificadas, com a predominância dos gêneros *Enterobacter*, *Serratia*, *Pseudomonas* e *Acinetobacter*.

2.3.8 Fungos termófilos

Os fungos termófilos são importantes para a caracterização física final do composto pela degradação das fibras. Straatsma (1995) sugeriu a presença do fungo termófilo *Scytalidium thermophilum* como predominante na Fase II e presente durante o desenvolvimento do cogumelo. Em substratos para cultivo de *A. bisporus* constituído de palha de trigo, suplementados com esterco equino e ou cama de aviário houve a predominância dos seguintes fungos termófilos e termotolerantes: *Aspergillus fumigatus*, *Chaetomonium thermophilum* var. *coprophile*; *Humicola grisea* var. *thermoidea*, *Humicola insolens*, *Humicola lanuginosa* (syn *Thermomyces lanuginosa*), *Mucor pusillus* (syn *Rhizomucor pusillus*), *Talaromyces duponti* (syn *Talaromyces thermophilus*) e *Torula thermophila* (*Scytalidium thermophilum*) (Rosemberg, 1975; Fermor et al., 1985).

2.3.9 Actinomicetos e outras bactérias

Ross & Harris (1983b) argumentaram que alguns fungos e actinomicetos termófilos dominam o final do processo (declínio da termogênese), levando ao desaparecimento do amoníaco que é muito tóxico ao *Agaricus*. Alguns actinomicetos termófilos e termotolerantes que já foram isolados em substrato de cultivo de *Agaricus bisporus* (Fergus, 1964; Fermor et al., 1979; Fermor et al., 1985), são: *Actinobifida chromogena*, *Micropolyspora faeni*, *Nocardia* spp,

Nocardia brasiliensis, *Pseudonocardia thermophila*, *Saccharomonospora viridis*, *Streptomyces* spp, *Streptomyces albus*, *Streptomyces griseus*, *Streptomyces rectus*, *Streptomyces thermovulgaris*, *Streptomyces thermoviolaceus*, *Streptomyces violaceoruber*, *Thermoactinomyces vulgaris*, *Thermoactinomyces glaucus*, *Thermomonospora fusca*, *Thermomonospora curvata*, *Thermomonospora viridis* e *Thermopoluspora polyspora*. Vijay & Gupta (1994) citaram que os actinomicetos *Streptomyces* e *Micromonospora* têm influência favorável no crescimento do *A. bisporus*; o micélio cresce melhor e livre de contaminantes, além de estimular a produção de biotina, tiamina e vitaminas.

As bactérias termófilas podem degradar celulose (Fermor & Wood, 1981). Segundo Fermor et al. (1985), *Bacillus subtilis* inativado pelo calor foi utilizado como única fonte de carbono para cultivo de *A. bisporus*, e filtrados de culturas bacterianas estimulam actinomicetos termófilos celulolíticos e vice-versa. As bactérias isoladas com maior frequência em composto para cultivo de *A. bisporus* foram: *Bacillus coagulans*, *Bacillus stearothermophilus* e *Bacillus subtilis* (Laborde, 1993). Fermor et al. (1985) relataram que as bactérias dominantes durante a compostagem são: mesófilas (*Flavobacterium* spp, *Pseudomonas* spp, *Serratia marscescens*), termotolerantes (*Pseudomonas* spp) e termófilas (*Bacillus coagulans*, *B. stearothermophilus*, *B. subtilis* e *B. lichiniiformis*).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Experimento 1 (E₁): compostagem de 6 semanas e pasteurização a vapor

Neste experimento utilizou-se compostagem de 6 semanas com pasteurização a vapor para cultivo de *Agaricus blazei*, em substratos com diferentes concentrações de nitrogênio inicial (N-inicial), e o uso de bactérias assimiladoras de amônia (*Alcaligenes faecalis*, *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas stutzeri*) durante a compostagem e pasteurização. Foram realizados quatro tratamentos: 1) Testemunha (T₁): 0,87% de N-inicial; 2) 1,52% de N-inicial (T₂); 3) 2,04% de N-inicial (T₃); e 4) 1,57% de N-inicial (T₄), mais adição das bactérias assimiladoras de amônia durante a compostagem e a pasteurização.

3.1.1 Produção do inoculante

Foi utilizado, neste experimento, o cogumelo comestível e medicinal *Agaricus blazei* CS1 da coleção do Laboratório de Cogumelos Comestíveis da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

O preparo do inoculante foi feito com arroz em casca enriquecido com 10% de farelo de trigo. O arroz em casca foi pré-cozido durante 30 minutos e misturado ao farelo de trigo, sendo acondicionado em frascos de vidro contendo 300 mL de substrato, devidamente fechados com tampão de algodão e autoclavados a 121°C, por 4 horas, em duas seções de 2 horas, com intervalo de 24 horas entre as autoclavagens. A inoculação foi feita em câmara de fluxo laminar com discos do meio de cultura (BDA) com o isolado CS1 de *Agaricus blazei*. Logo após, os mesmos foram incubados na sala de colonização de inoculantes com temperaturas entre 20°C e 28°C.

3.1.2 Processo de compostagem

As matérias-primas utilizadas no E₁, para todos os quatro tratamentos, foram bagaço de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*), capim coast-cross (*Cynodon dactylon* (L.) Pers) e farelo de trigo, que foram pesados no momento da montagem para chegar a aproximadamente 100 kg por pilha, levando-se em conta a quantidade de matéria seca determinada dois dias antes da montagem, por meio da secagem das matérias-primas a 65°C em estufa (Tabela 1). A suplementação foi feita na 4ª reviragem com: superfosfato simples (1 kg), calcário (2 kg), cloreto de potássio (1 kg), gesso agrícola (2 kg) e uréia (variando entre os tratamentos) (Tabela 1). Após a pesagem das matérias-primas de cada tratamento, foi montado um estrado de madeira de 1,0x1,0x1,0 m para receber os materiais, no qual foram dispostos em camadas sobrepostas, para melhor homogeneização durante as sucessivas reviragens. Na montagem das camadas, o capim coast-cross foi submerso em tambores com água, facilitando seu umedecimento.

O umedecimento das pilhas foi feito por meio de mangueira com água em abundância durante o período de montagem, para que o bagaço de cana pudesse absorver o máximo de água possível. Finalizando cada pilha ou meda, o estrado era retirado (Figura 2).

Foram montadas 4 pilhas/tratamentos, utilizando-se as matérias-primas citadas anteriormente, tendo como diferencial o teor de nitrogênio total e a adição de bactérias assimiladoras de amônia durante o processo de compostagem. Os tratamentos foram:

- T₁ → 0,87% - testemunha (sem adição de uréia);
- T₂ → 1,52% de N;
- T₃ → 2,04% de N;
- T₄ → 1,57% de N + bactérias (adicionadas no composto).

TABELA 1 Matérias-primas para montagem de cada tratamento do experimento 1, considerando a matéria seca (MS) e a matéria úmida (MU).

Tratamentos	Matéria –Prima (kg)																	
	Bagaço de cana		Capim coast-cross		Farelo de trigo		Calcário		Gesso agrícola		Super fosfato simples		Cloreto de potássio		Uréia		Total*	
	MU	MS	MU	MS	MU	MS	MU	MS	MU	MS	MU	MS	MU	MS	MU	MS	MU	MS
T ₁ – 0,87% de N	52,3	45,5	47,5	41,8	10,0	9,0	2,0	2,0	2,5	2,1	1,0	1,0	1,0	1,0	-	-	109,8	96,3
T ₂ – 1,52% de N	49,7	43,5	54,4	51,0	10,0	9,0	2,0	2,0	2,5	2,1	1,0	1,0	1,0	1,0	1,5	1,5	114,1	103,5
T ₃ – 2,04 de N	55,4	46,0	47,2	43,8	10,0	9,0	2,0	2,0	2,5	2,1	1,0	1,0	1,0	1,0	2,6	2,6	112,6	98,8
T ₄ – 1,57 + Bactérias	47,1	42,9	49,9	43,3	10,0	9,0	2,0	2,0	2,5	2,1	1,0	1,0	1,0	1,0	1,5	1,5	107,0	95,2

* Somatório das matérias-primas bagaço de cana, capim coast-cross e farelo de trigo.



FIGURA 2 Montagem das quatro pilhas/tratamentos do E₁.

As reviragens das pilhas ocorreram sempre às segundas, quartas e sextas-feiras, durante 6 semanas. A reviragem consistiu na quebra da pilha e no revolvimento de todo o material, de modo a deixá-lo o mais homogêneo possível, sendo montada novamente a pilha dentro do estrado (Figura 3). Na quarta reviragem, foi feita a suplementação, após a verificação da umidade, por meio do teste da mão, que consiste em apertar entre os dedos uma porção do composto que deverá ter um leve escorrimento. A adição dos suplementos em camadas, durante a remontagem das pilhas, nos respectivos tratamentos, ocorreu após a homogeneização dos ingredientes. A adição de uréia variou entre os tratamentos, pois ela foi utilizada como fator determinante para variar o teor de N no processo de compostagem (Tabela 1).

O monitoramento da temperatura foi realizado por meio de sonda termométrica, durante todo o processo de compostagem. As medidas foram realizadas com a inserção da haste da sonda até o centro da pilha, local de maior temperatura, antes do processo de reviragem. Assim, foram registradas as variações da temperatura em todas as reviragens.

A umidade foi observada por meio da retirada de várias amostras durante as reviragens, as quais foram submetidas à estufa a 65°C, por 24 horas, com ventilação forçada. A umidade foi estabelecida pela da média aritmética das massas secas das amostras após a secagem.

O pH foi acompanhado por meio da retirada de 3 amostras de 100 g de composto em diferentes pontos das pilhas, que foram adicionadas 150 mL de água destilada. O pH foi estabelecido no líquido extraído da prensagem, utilizando-se a média aritmética entre as amostras de cada tratamento.



FIGURA 3 Processo de reviragens dos substratos.

3.1.3 Determinação do teor de N-total

O teor de nitrogênio-total (N-total) das matérias-primas e de amostras dos tratamentos depois da pasteurização a vapor foi determinado por meio do método de Kjeldahl (Silva & Queiroz, 2002), utilizado no Laboratório de Zootecnia da UFLA, local onde foram feitas as análises.

3.1.3.1 Método Kjeldahl (AOAC, 1990)

Descrito inicialmente há quase um século, tem passado por modificações e, desde então, é o mais amplamente adotado e o mais indicado para amostras de origem biológica. Por este método, por meio de uma digestão ácida, o nitrogênio da amostra é transformado em amônio (NH_4^+), o qual é posteriormente separado por destilação e finalmente, dividido em três etapas: digestão da matéria orgânica, destilação do nitrogênio e titulação, as quais serão descritas a seguir.

Digestão da matéria orgânica

Nesta etapa, o nitrogênio orgânico é capturado na forma de sulfato de amônio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ concomitantemente à descarboxilação e queima orgânica na forma de CO_2 , H_2O , SO_2 , etc.



Observações

- K_2SO_4 - aumenta o ponto de ebulição de ácido sulfúrico de 180°C para 400°C , devido à formação de S_2O_7 , tornando a digestão rápida.
- CuSO_4 - catalisador; promove a ativação do oxigênio, aumentando o seu poder de oxidação.

Destilação do nitrogênio

O nitrogênio capturado na forma de sulfato de amônio reage com hidróxido de sódio (NaOH) numa reação exergônica, dando origem a hidróxido de amônio ((NH₄)₂SO₄) - um composto instável que se transforma espontaneamente em amônia (NH₃). A amônia, na forma de vapor, é condensada sobre ácido bórico (H₃BO₃), dando origem a borato ácido de amônio (NH₄H₂BO₃).



Titulação

O borato ácido de amônio é titulado, até a viragem de cor, com ácido clorídrico (HCl), gerando, como produtos finais, cloreto de amônio (NH₄Cl) mais ácido bórico. De posse do volume gasto de HCl e sua normalidade, pode-se calcular o teor de nitrogênio e, conseqüentemente, o teor de proteína da amostra.



Material

- tubos de digestão apropriados;
- bloco digestor;
- aparelho de “Kjeldahl”;
- balança analítica
- espátula;
- papel manteiga;

- erlenmeyer de 250ml;
- reagentes:
 - ✓ K_2SO_4 anidro;
 - ✓ $CuSO_4$ anidro;
 - ✓ H_2SO_4 P.A.
 - ✓ solução de HCl 0,02N;
 - ✓ solução de NaOH 50%;
 - ✓ solução saturada de H_3BO_3
 - ✓ verde de bromocresol;
 - ✓ vermelho de metila.

Preparo dos reagentes

- **Solução de NaOH 50%:** dissolver 500g de NaOH em cerca de 700mL de água destilada (balão volumétrico de 1000mL), evitando aquecimento. Completar o volume final para 1000mL;
- **Indicadores:** preparar solução alcoólica de vermelho de metila a 0,2% e de verde bromocresol a 0,2%. Misturar 1 parte da solução de vermelho de metila com 5 partes da solução de verde de bromocresol. Obs.: essa solução indicadora pode ser pré-adicionada à solução saturada de H_3BO_3 , fazendo os devidos cálculos para o volume total.
- **Solução de H_3BO_3 saturada.**
- **Solução de HCl 0,02N:** colocar em balão volumétrico de 1.000mL cerca de 500mL de água destilada. Adicionar 1,7mL de HCl P.A. [$d=1,19$; $c(T\%) = 36\%$] lentamente e completar o volume para 1.000mL. Fatorar essa solução com NaOH 0,02N recém preparado.
- **Solução de NaOH 0,02N:** pesar 0,8g de NaOH e diluir em balão volumétrico com água destilada. Fatorar com solução de ácido oxálico 0,02N.

- **Solução de ácido oxálico 0,02N:** pesar exatamente 0,3152g de ácido oxálico e diluir para 250mL com água destilada, em balão volumétrico.

Técnica

- Pesar 100 mg de matéria seca e desengordurada (amostra remanescente da determinação de extrato etéreo, presente no cartucho), envolvendo a amostra em papel manteiga.
- Transferir amostra e papel para o tubo de digestão.
- Adicionar ao tubo 600 mg de K_2SO_4 (uma pitada), 300 mg $CuSO_4$ (uma pitada) e 5mL de H_2SO_4 .
- Levar o tubo ao bloco digestor, suspendendo a temperatura de 50°C em 50°C, até a temperatura de 400°C, até que a amostra se torne incolor.
- Acoplar o tubo com a amostra digerida [$(NH_4)_2SO_4$] ao aparelho de Kjeldhal.
- Adaptar um erlenmeyer com 10mL de ácido bórico (H_3BO_3) à saída de condensado, de modo que a ponta do condensador fique imersa no ácido bórico. Caso contrário, quando a amônia for destilada, pode se perder para o ambiente por volatilização.
- Adicionar 15mL de NaOH ao reservatório apropriado, vertendo lentamente dentro do tubo previamente acoplado.
- Acionar a temperatura para que a caldeira ferva a água que ira conduzir a amônia para o erlenmeyer contendo ácido bórico.
- Certificar-se de que o sistema de refrigeração do condensador está funcionando.
- Coletar cerca de 75mL de condensado no erlenmeyer. Levar o erlenmeyer contendo, agora $NH_4H_2BO_3$ (borato ácido de amônio) para titulação.
- Titular o $NH_4H_2BO_3$ com HCl até viragem de cor (verde para vermelho).

- Calcular o teor de nitrogênio da amostra, transformando para proteína, por meio do fator 6,25.

$$\text{Nitrogênio (\%)} = (V \times N \times 14 \times 100) / A$$

N = normalidade da solução de HCl = 0,02N;

V = volume gasto de HCl 0,02N na titulação;

A = peso da amostra (tomada de ensaio) em mg (normalmente 100mg);

Observação: o nº 14 é a massa atômica do nitrogênio e 100 transforma o resultado em percentagem.

$$\text{Proteína (\%)} = \% \text{ Nitrogênio} \times 6,25$$

Obs: O fator 6,25 é utilizado porque se considera que, teoricamente, toda proteína contém 16% de nitrogênio. Sendo assim, segue-se o seguinte raciocínio:

100g proteína → 16g nitrogênio
Xg proteína → 1g de nitrogênio

$$X = 6,25$$

3.1.4 Relação C/N

A relação C/N inicial da compostagem foi determinada por meio da divisão do teor de C (carbono) de cada matéria-prima (bagaço de cana-de-açúcar, capim coast-cross e farelo de trigo), respeitando-se a proporção de cada material. Os teores de carbono das matérias-primas utilizados foram extraídos de dados literatura (Penteado, 2000; Eira, 2003; Urben, 2004), enquanto os teores de N-total foram determinados no Laboratório de Zootecnia da UFLA.

A relação C/N pode ser descrita conforme o exemplo da equação matemática descrita a seguir, considerando o percentual de cada ingrediente utilizado na formulação.

$$X = (45\% \times 90/1) + (45\% \times 47/1) + (10\% \times 21/1)$$

Onde:

X = Relação C/N do composto

45% e **10%** = Percentual das matérias-primas utilizadas na formulação.

90/1 = Relação C/N de um ingrediente "A"

47/1 = Relação C/N de um ingrediente "B".

21/1 = Relação C/N de um ingrediente "C".

3.1.5 Determinação do nitrogênio amoniacal

Os teores N-amoniacal foram obtidos por meio da técnica descrita por Kiehl (1985), utilizada no Laboratório de Zootecnia da UFLA, onde foram feitas as análises, pela extração do líquido, por meio de prensagem das amostras, de aproximadamente 1,5 kg cada, antes e depois da pasteurização de todos os experimentos. Para a extração do líquido, a amostra foi colocada na prensa hidráulica sobre uma pressão de 5 toneladas, retirando-se aproximadamente, 300 mL, que foram usados em triplicata durante as análises.

Reagentes

- 20 mL de ácido bórico (4% → 4 g em 100 mL);
- 50 mL de amostra;
- cloreto de cálcio 25% → 5 mL – 25 g em 100 mL;
- 2 g de óxido de magnésio;
- Titular em ácido clorídrico 0,1N

Preparo dos reagentes:

- Ácido bórico 4%: pesar 40 g de H_3BO_3 / 1000 mL de água. Dissolver aproximadamente 500 mL em água quente. Esfriar e colocar 8 mL da solução indicadora mista e completar para 1000 mL.
- Solução indicadora mista: dissolver 0,132 g de vermelho de metila P. A. em 70 mL de álcool etílico P.A. Transferir quantitativamente para um balão volumétrico de 200 mL.
- Dissolver 0,066 g de verde de bromocresol P.A. em 70 mL de álcool etílico P.A. Juntar ao balão contendo vermelho de metila e completar o volume com álcool etílico.
- Para que a solução de ácido bórico não se precipite, aconselha-se: pegar 1 L de álcool etílico, 40 mL da solução mista e completar com a solução de ácido bórico para 5 L.

Determinação

Transferir 50 mL da amostra para o tubo de digestão/destilação. Adicionar aproximadamente 2 mL de água destilada. Adicionar 2 g de óxido de magnésio, 5 mL da solução de cloreto de cálcio 25% e algumas gotas de anti-espumante (ou bolas de vidro), agitar e proceder a destilação. Recolher cerca de 125 mL do destilado em erlenmayer, contendo 10 mL de solução de ácido bórico. Retirar e titular, utilizando ácido clorídrico 0,1N. Com a quantidade de ácido clorídrico titulado, utilizar a equação abaixo para determinar o teor de N-amoniaco.

$$\text{Nh\%} = (\text{V} \times \text{N} \times 0,014 \times 100) / \text{volume da amostra}$$

Onde:

Nh% = percentual de nitrogênio amoniacal;

V = volume de HCl titulado.

N = normalidade;

0,014 = constante utilizada para determinação de N-amoniacal

3.1.6 Celulose, hemicelulose e lignina

As matérias-primas e amostras dos tratamentos, antes e depois da pasteurização a vapor do E₁ tiveram seus teores de fibra detergente ácida (FDA) e fibra detergente neutro (FDN) definidos de acordo com o método Van Soest, descrito por Silva & Queiroz (2002), utilizado no Laboratório de Zootecnia da UFPA, local onde foram realizadas as análises. O valor de FDN corresponde ao teor de hemicelulose e o FDA à somatória de celulose e lignina. Para determinação de celulose e lignina foi utilizado o método do permanganato (KMnO₄). Para a determinação dos teores lignocelulósicos foram utilizadas as seguintes equações (Silva & Queiroz, 2002):

- Hemicelulose = FDA – FDN
- Celulose = FDA – lignina
- Lignina = FDA – celulose

3.1.6.1 Determinação da fibra em detergente neutro (FDN)

Os equipamentos necessários para determinação de FDN, são: aparelho digestor consistindo em aquecedores controlados individualmente com condensadores de água; frascos de erlenmayer de 500 mL; cadinho filtrante de vidro com porosidade média ou média grossa com diâmetro de 40 mm e volume de 40 ou 50 mL.

Reagentes:

- 1 litro d'água destilada;
- 230 g de sulfato láurico de sódio U.S.P. [$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_2\text{OSO}_3\text{Na}$];
- 18,61 g de E.D.T.A. (etilenodiaminotetracetato dissódico). $\text{Na}_2\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.
- 6,81 g de borato de sódio hidratado. $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$.
- 4,56 g de fosfato de ácido de sódio anidro – Na_2HPO_4 .
- 10 mL de 2-metoxietanol – $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_2$.

Preparo da solução detergente neutro: pesar o E.D.T.A. e o $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ e colocá-los em um béquer com 400 mL, aproximadamente, de água destilada e aquecer até que se dissolva. Outra solução de sulfato láurico de sódio e 2-metoxietanol é preparada, a fim de juntar-se à primeira. Finalmente, Na_2HPO_4 é também dissolvido, por aquecimento e misturado aos demais reagentes. Não se deve esquecer, entretanto, que todas essas dissoluções são preparadas em apenas 1 litro d'água destilada.

A solução detergente neutro deve ter um pH entre 6,9 a 7,1 e dificilmente será necessário ajustar este pH, desde que se tomem as precauções, durante o seu preparo, e se faça uso de reagentes com alto grau de pureza, como:

- acetona.
- sulfito de sódio anidro – Na_2SO_3 .
- decaidronaftaleno – $\text{C}_{10}\text{H}_{18}$ (antiespumante).

Determinação:

Pesar entre 0,5 e 1,0 g de amostra seca ao ar, triturada em moinho, com peneira de 20 ou 30 “mesh”. Colocar em copo de 600 mL do aparelho digestor – digestor de fibra bruta ou equivalente. Adicione em ordem: a) 100 mL de solução detergente neutro (temperatura ambiente); b) 2 mL de

decaidronaftaleno; c) 0,5g de sulfito de sódio. Aquecer até a fervura (de 5 a 10 minutos), reduzindo a temperatura para evitar a espuma. Ajustar a temperatura até um nível fixo e deixar em digestão durante 60 minutos, a partir do início da fervura. Fazer a filtração em cadinho filtrante de vidro, previamente pesado, por sucção a vácuo. Esta filtração deverá ser feita imediatamente após a digestão do material, isto é, quando ainda estiver bem quente. A sucção deve ser lenta no início e mais forte no final. Lavar, com água quente (90°C a 100°C), o material dentro do cadinho filtrante. Repetir esta operação duas vezes, tendo o cuidado de quebrar a crosta com a ajuda de um bastão de vidro, a fim de facilitar a lavagem e remover todo complexo gelatinoso formado, principalmente, de proteína e amido. Antes, porém, deve-se lavar bem o copo onde se fez a digestão, usando-se o mínimo d'água quente. Lavar, igualmente, duas vezes, com acetona (30 a 40 mL). Secar os cadinho filtrantes a 105°C, durante 8 horas ou uma noite; esfriar em dessecador e proceder à pesagem. Considerar como fibra em detergente neutro a porcentagem dos constituintes da parede celular, calculada pela diferença entre as pesagens. Determinar os constituintes solúveis ou o conteúdo celular, subtraindo de 100 a porcentagem encontrada para parede celular.

3.1.6.2 Determinação de fibra em detergente ácido (FDA)

A fibra em detergente ácido é a porção menos digerível da parede celular das forrageiras por microrganismo. Constituída, na sua quase totalidade, de lignocelulose, ou seja, lignina e celulose.

Conhecendo-se a porcentagem dos constituintes da parede celular (FDN) e da FDA do material analisado, é possível calcular a fração de hemicelulose, apenas pela diferença entre as frações.

Por hemicelulose entende-se um grupo de substâncias em que se incluem os polímeros de pentoses (xilose, ribose, etc.) e certos polímeros de

hexoses e ácidos urônicos. É, em geral, menos resistente a tratamento químico e mais digerível que a celulose, porém menos que os carboidratos solúveis e amido.

Equipamentos:

Aparelho digestor: usar um aparelho convencional, próprio para fibra em detergente neutro e ou fibra bruta. Cadinho filtrante de vidro: usar o de forma alta, de porosidade média, com volume ao redor de 50 mL.

Reagentes:

- Solução detergente ácida: adicionar 20 g de brometo-cetil-trimetilamônio (CTAB), próprio para análise, em 1 litro de ácido sulfúrico 1 N, previamente padronizado. Agita-lo para facilitar a dissolução. Esta solução dissolve as proteínas, gorduras e carboidratos solúveis.
- Decaidronaftaleno (C₁₀H₁₈).

Determinação:

Pesar 1 g de amostra seca ao ar, previamente triturada em moinho, com peneira de 30 a 40 “mesh”. Adicionar 100 mL de solução detergente ácida (temperatura ambiente) e 2 mL de decaidronaftaleno (antiespumante). Aquecer durante um período de 5 a 10 minutos, até a ebulição; reduzir o calor, para evitar a espuma, logo que a ebulição tenha começado. Fazer a digestão durante 60 minutos, a partir do início da ebulição, ajustando-se a nível lento e constante. Filtrar em cadinho de vidro, pesado anteriormente, usando pequena sucção. Dispersar o resíduo com um bastão e lavar duas vezes, no mínimo, com água quente (90°C a 100°C), tendo o cuidado de lavar as paredes do cadinho. Fazer duas lavagens com acetona (30 a 40 mL) até que ela se torne incolor,

removendo-se toda a amostra, a fim de que o solvente entre em contato com todas as partículas de fibra. Secar a 105°C, durante 8 horas, ou durante uma noite. Esfriar em dessecador e pesar.

3.1.6.3 Determinação de lignina

A determinação da lignina é feita a partir da fibra de detergente ácido (celulose, lignina, cutina, minerais e sílica). Existem dois métodos de determinação: o método do ácido sulfúrico a 72% e o do permanganato de potássio. Neste trabalho foi utilizado o método de permanganato de potássio.

Reagentes:

- Permanganato de potássio: dissolver 50 g de KMnO_4 em 1 litro d'água destilada. Proteger contra a luz solar, usando-se recipiente escuro.
- Solução tampão: dissolver 6 g de nitrato férrico hidratado [$\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$] e 0,15 g de AgNO_3 em 100 mL de água destilada. Adicionar 500 mL de ácido acético glacial, 5 g de acetato de potássio e 400 mL de álcool butil terciário e misturar.
- Solução combinada de permanganato (2:1): misturar a solução de KMnO_4 e a solução deve ser guardada no refrigerador ou lugar frio, na ausência de luz. A solução deve ficar de cor vermelha (purpúrea) e não conter precipitado, pois este dificulta a filtração.
- Solução de desmineralização: dissolver 50 g de ácido oxálico diidratado ($\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) em 700 mL de etanol 95%. Adicionar 50 mL de HCl concentrado (12 N) e 250 mL de água destilada e misturar.

Determinação:

Determinar a fibra em detergente ácido, de acordo com a técnica previamente descrita, usando-se 1g de amostra. Atentar para secagem das amostras sempre em temperatura inferior a 65°C (55°C) e a moagem em tela sempre de 20 ou 30 “mesh”. Colocar os cadinhos contendo a fibra em uma bandeja esmaltada ou de vidro, contendo uma camada d’água de 2 a 3 cm de altura. Adicionar 30 mL de solução 2:1 em cada cadinho, a fim de que o nível d’água, na bandeja, seja o mesmo da solução nos cadinhos. Colocar um pequeno bastão de vidro em cada cadinho, para agitar o conteúdo e permitir que a solução de 2:1 entre em contato com todas as partículas por, aproximadamente, 15 minutos. Succionar os cadinhos a vácuo. Renovar a água da bandeja e colocar no cadinho a solução 2:1 (30mL), que aí permanecerá durante 90 minutos. A cor purpúrea deve estar presente durante todo o tempo da oxidação. Os cadinhos são novamente succionados. Colocar os cadinhos em uma bandeja limpa, com água e adicionar de 20 a 30 mL da solução de desmineralização. Depois, de 5 a 10 minutos, succionar para secar e renovar a solução de desmineralização, a fim de que a fibra fique com uma cor amarela. Lavar os cadinhos com etanol a 80%. Succionar até secar e repetir a lavagem duas vezes, com etanol. Lavar duas vezes de maneira similar, com acetona (30 a 40 mL). Secar a 100°C, durante uma noite e pesar. Calcular o teor de lignina pela perda de peso da fibra em detergente ácido.

3.1.6.4 Determinação da celulose

Após a determinação da lignina, aproveita-se o material para determinar a celulose. Incinerar os cadinhos durante 2 horas a 500°C, esfriar em dessecador e pesar. Calcular a porcentagem de celulose pela diferença nas pesagens, antes e depois da incineração.

3.1.7 Inoculante de bactérias

As bactérias que formaram o inoculante utilizado durante as fases I e II do E₁T₄, foram *Alcaligenes faecalis*, *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas stutzeri*. Estas cepas foram cedidas pela Fundação André Tosselo, Campinas, SP.

3.1.7.1 Curva de crescimento e contagem de colônias bacterianas

A quantidade de bactérias adicionadas durante o processo de compostagem e pasteurização no E₁T₄ foi de 10⁴ cel/g de composto, para cada tipo de bactéria. As bactérias foram espalhadas sobre o composto nos seguintes momentos:

- 4^a reviragem;
- 12^a reviragem;
- 18^a reviragem (no momento de entrada do composto para o pasteurizador);
- reviragem que ocorreu durante a pasteurização;
- após a finalização da pasteurização (antes da inoculação).

As bactérias foram diluídas em 10 L de água e espalhadas sobre todo o composto, que foi revirado após a aplicação para melhor homogeneização.

Para alcançar o número de 10⁴ cel/g de composto foi necessário determinar a curva de crescimento de cada bactéria e a contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) para saber quantas células/mL de meio cultura. Foram determinados também a taxa de crescimento média e o tempo de geração das bactérias utilizadas no experimento, por meio das equações: [$\mu_x = (\text{Log população final} - \text{Log população inicial}) / \log 2$] para taxa de crescimento e [tempo de geração = 1 / taxa de crescimento]. Assim, as bactérias foram reativadas em AN (ágar nutriente – em g.L⁻¹: extrato de carne, 3; peptona bacteriológica, ágar, 13) por 24 horas, processo repetido por duas vezes. Uma alçada de bactérias foi colocada em 100 mL de CN (caldo nutriente) em frascos

“side-arm”, os quais foram incubados em “Shaker” a 30°C sob agitação de 150 rpm. A curva de crescimento foi construída com valores dados pela absorbância ($2 - \text{LOG } T$) a 520 nm em colorímetro foto elétrico MICRONAL B240, a cada 1 hora durante 24 horas de incubação. Neste primeiro momento, foram feitos plaqueamentos em AN a cada 3 horas de incubação, sendo feito em triplicata. No segundo momento, após a construção da curva de crescimento e a contagem das colônias, foi feita uma repetição do plaqueamento e transmitância, porém, utilizando apenas três pontos da curva de crescimento, que foram: início, meio e fim da fase LOG de cada bactéria, de acordo com a curva de crescimento estabelecida anteriormente, para assegurar que as contagens e a curva estavam corretas.

3.1.8 Pasteurização a vapor

A pasteurização a vapor ocorreu após 6 semanas de compostagem com 18 reviragens. O sistema de pasteurização a vapor constitui-se de um fogão a lenha com um tambor de 200 L de capacidade (Figura 4A). O tambor foi ligado ao túnel de pasteurização por meio do sistema de canos galvanizado com registros para liberação do vapor na parte inferior do túnel, que possuía um fundo falso de madeira (grade). As pilhas, após finalização do período de compostagem, foram acondicionadas dentro do túnel sobre o tablado de madeira, que estava coberto com sombrite, para evitar que o composto passasse pelas frestas do tablado (Figura 4B). Os tratamentos foram separados em quatro partes por compensados, evitando que os tratamentos se misturassem. O tempo de pasteurização foi de 48h de fluxo contínuo, desprezando-se o tempo que antecedeu o aquecimento da água. A pasteurização foi dividida em 2 etapas de 24h de vapor contínuo com uma reviragem de cada composto no momento de intervalo. Para a realização da reviragens durante a pasteurização, os tratamentos foram retirados do túnel e revirados, sendo posteriormente devolvidos. O T_4 no



FIGURA 4 Sistema de pasteurização a vapor. A) fogão a lenha com tambor acoplado e sistema de tubulação ligando com pasteurizador; B) disposição dos 4 tratamentos do E_1 sobre o fundo falso de madeira forrado com sombrite, dentro do pasteurizador.

momento da reviragem receberam a adição das bactérias, que foram diluídas em 10 L de água, para que fossem espalhadas sobre todo o composto. Para cada experimento, foram utilizados 2m³ de lenha durante todo o processo de pasteurização e aproximadamente 300 L de água, sendo feito o reabastecimento no intervalo de 24 horas, no momento em que ocorreu a reviragem dos tratamentos. A temperatura durante o fluxo contínuo de vapor foi monitorada a cada 8 horas.

3.1.9 Ensacamento, inoculação e incubação

Após o resfriamento do composto a aproximadamente 25°C, o composto foi acondicionado em sacolas plásticas (10kg/sacola). Para aproximadamente 100 kg de matéria utilizada na produção do composto no E₁, foram obtidas entre 10 e 14 sacolas, de acordo com cada tratamento. Amostras para a medição do crescimento micelial foram retiradas após a pasteurização, como também para determinação do N-total, N-amoniaco, celulose, hemicelulose e lignina.

A inoculação do *Agaricus blazei* CS1 para todos os experimentos foi de 200 mL de inoculante produzido em arroz em casca para cada sacola com 10 kg de substrato. O fungo foi espalhado por todo o substrato para maximizar a colonização.

A incubação foi feita na casa de colonização, disponibilizando as sacolas em prateleiras. As sacolas foram semi-fechadas para permitir a troca gasosa do fungo. A temperatura variou de acordo com a temperatura ambiente (mínima de 8°C e máxima de 26°C), ou seja, de acordo com o mês em que os tratamentos ficaram em incubação. Os meses mais frios foram de junho e julho, tendo temperaturas mínimas noturnas de aproximadamente 8°C.

3.1.10 Crescimento micelial

Durante a colonização dos substratos pelo *Agaricus blazei* CS1 foi feito o acompanhamento do crescimento micelial em mm/dia. Para a realização desta medida, foram utilizados 10 sacos plásticos com 1 kg de substrato de cada tratamento, de todos os experimentos, tendo assim 40 parcelas distribuídas aleatoriamente nas prateleiras da casa de colonização, de acordo com datas de incubação de cada experimento. Cada saco recebeu, aproximadamente, 5 mL de inoculante no topo do substrato de cada saco plástico. As medidas foram feitas com 10, 20, 30 e 40 dias após a inoculação e transformadas no final em mm/dia. As médias foram comparadas estatisticamente pelo SISVAR-UFLA, por meio do teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

3.1.11 Indução e terra de cobertura

Vasos de polietileno (capacidade para 20 L) foram preenchidos com 5 kg de substrato colonizado, os quais receberam 5 cm de terra de cobertura, sendo posteriormente umedecidos utilizando sistema de mangueira com borrifador, para evitar jatos de água fortes na terra de cobertura, que causam buracos e escorrimento de terra para os lados do vaso. A umidade dos substratos colonizados foi determinada por meio de amostras de cada tratamento de todos os experimentos em triplicata, secas em estufa com ventilação forçada a 65°C.

A terra de cobertura utilizada para todos os experimentos foi o Latossolo Vermelho distroférico (LVdf) de horizonte B (barranco), extraído da reserva florestal do Departamento de Engenharia Florestal da UFLA. Este solo foi misturado com carvão vegetal no volume de 4:1, após ser peneirada para a retirada de torrões maiores e pedaços de madeira e quaisquer outras sujidades. O carvão vegetal foi triturado manualmente e peneirado para evitar pedaços muito grandes, utilizando-se apenas o pó e pedaços de até 0,5 cm de comprimento. Antes de misturar o LVdf com carvão vegetal, foi feita a correção de pH do solo

por meio da adição de calcário calcítico. O LVdf apresentou pH 5,4, de acordo com relatório de análises químicas feitas no Laboratório de Solos da UFLA, sendo corrigido com aplicação de 0,3 g de calcário/ kg de solo (PRNT = 92,8%), com posterior incubação do solo por 90 dias antes da indução. Após a correção, o pH do solo passou a 6,5. A quantidade de calcário foi determinada pelo cálculo de necessidade de calagem, de acordo com as informações contidas no relatório de análise química do solo. Após adição de calcário, foi feita a mistura do carvão vegetal, sendo a mistura sobreposta aos 5 kg de composto acondicionado nos vasos de polietileno, até atingir a altura de 5 cm.

3.1.12 Cultivo

O cultivo é a etapa que se inicia após a indução do *Agaricus blazei* e foi feito na casa de cultivo de cogumelos do DBI/UFLA. A temperatura dentro da casa foi monitorada por meio de termômetro de máxima e mínima. As temperaturas oscilaram entre 14°C e 28°C durante este período, as mais baixas ocorriam principalmente durante a noite e foram mais constantes no mês de agosto e início de setembro de 2005. O tempo de cultivo a partir da indução foi de 105 dias (agosto a dezembro/2005).

A umidade do ambiente foi mantida por do umedecimento do piso (concreto com uma canaleta), pela manhã e ao anoitecer. As paredes também eram umedecidas com jatos de água de mangueira manual. O monitoramento da umidade foi feito por termoigrômetro que registrou variações entre 70% e 85%, durante todo o cultivo.

A terra de cobertura foi umedecida sempre que necessário, depois de uma avaliação visual e com toque dos dedos sobre o solo. Quando da necessidade de umedecimento dos vasos, adicionava-se em torno de 200 mL de água em toda a superfície da terra de cobertura. Para isso utiliza-se um frasco de plástico com perfurações no fundo (chuveiro), para evitar que a água provocasse

buracos ou que a terra escorresse para as laterais do vaso. O umedecimento com a mangueira conectada ao borrifador não foi utilizado pela dificuldade de controlar a direção das gotículas de água, que acabava, muitas vezes, caindo sobre primórdios dos vasos vizinhos. Durante a formação de primórdios de cogumelos evitava-se o umedecimento da terra de cobertura para não ocasionar o aborto (morte) dos cogumelos.

3.1.13 Estatística

A avaliação estatística no cultivo dos cogumelos foi realizada por meio de delineamento inteiramente casualizado (DIC). O programa utilizado para fazer as análises de variância foi o SISVAR-UFLA, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade para produtividade, eficiência biológica, crescimento micelial, quantidade média de cogumelos e massa média dos cogumelos.

O E₁ teve quatro tratamentos com 10 vasos (repetições) com 5 kg de substrato colonizado cada, formando, assim, 40 parcelas, que foram sorteadas e distribuídas aleatoriamente nas prateleiras. Os tratamentos foram identificados como: E₁T₁, E₁T₂, E₁T₃ e E₁T₄, conforme foram apresentados no item 2.1.2.

3.1.14 Colheita

As colheitas foram realizadas pela manhã e no final de tarde. Os cogumelos que no momento da colheita encontravam-se com píleo aberto foram pesados, porém, foram descontados de 20% a 35% do seu peso. Esse desconto de peso ocorreu em função do cogumelo *Agaricus blazei* CS1 com píleo aberto ganhar, em média de 20% a 35% de massa dependendo do tempo de maturação. Estes valores foram observados por meio de comparações entre cogumelos de mesmo porte em estágios de maturação diferenciados.

3.1.15 Processamento

Após colheita dos cogumelos, foi feita a limpeza da sujidade de sua base, utilizando uma escova, para que a pesagem ocorresse sem a presença de terra ou pedaços de carvão vegetal. Após anotações da massa nos respectivos tratamentos, foi feita a lavagem dos cogumelos. A lavagem foi feita com jato de água por meio de um aspersor conectado ao sistema. Após a lavagem, eram retiradas, na base do cogumelo, manchas avermelhadas em decorrência da terra de cobertura. Depois, os cogumelos foram fatiados ao meio para secagem a aproximadamente 60°C, em desidratadora. Após 24 horas de secagem, os cogumelos secos eram embalados em sacos plásticos, com sachê de sílica, e assim eram selados.

3.2 Experimento 2 (E₂): compostagem de 4 semanas e pasteurização a vapor

Este experimento seguiu basicamente a mesma estratégia de compostagem e pasteurização descrita no E₁, porém, utilizando 1,5% de N em todos os tratamentos e com apenas 4 semanas de compostagem. O objetivo deste experimento foi avaliar o efeito de bactérias assimiladoras de amônia (*Alcaligenes faecalis*, *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas stutzeri*) e de *Scytalidium thermophilum* com o tempo de compostagem similar ao processo convencional (Fase I e Fase II) que utiliza entre 25 a 30 dias.

Foram feitos três tratamentos: (T₁): 1,5% de N-inicial (sem adição de inoculantes), (T₂): 1,5% de N-inicial (adição de bactérias no composto) e (T₃) 1,5% de N-inicial (adição de *Scytalidium thermophilum* no composto).

A produção do inoculante *Agaricus blazei* CS1 ocorreu da mesma forma e no mesmo local descrito no E₁. No Laboratório de Zootecnia da UFLA, foram feitas as análises para N-total, N-amoniaco, celulose, hemicelulose e lignina, seguindo os mesmos passos descritos no E₁.

A montagem das pilhas foi feita com as mesmas matérias-primas utilizadas no E₁, tomando como base a matéria seca dos materiais, formando-se assim, três pilhas com aproximadamente 100 kg matéria seca cada uma (Tabela 2). A suplementação foi feita com os mesmos materiais citados no E₁, tendo a uréia neste experimento sendo igual para todos, para que as pilhas tivessem aproximadamente 1,5% de N inicial (Tabela 2). As pilhas/tratamentos foram:

- T1 = 1,63% de N-inicial (sem adição de inoculantes)
- T2 = 1,62% de N-inicial (adição de bactérias no composto)
- T3 = 1,63% de N-inicial (adição de *Scytalidium thermophilum* no composto)

O inoculante à base de bactérias utilizadas neste experimento foi produzido e utilizado da mesma forma que ocorreu com o E₁, porém o número de aplicações foi menos, sendo realizada em quatro momentos, que foram:

- 5^a reviragem;
- 10^a reviragem (no momento de entrada do composto para o pasteurizador);
- reviragem que ocorreu durante a pasteurização;
- após a finalização da pasteurização (antes da inoculação).

Durante a compostagem de 4 semanas foram feitas as medições de temperatura, umidade e pH, no momento das reviragens, que totalizaram 10, até o momento da entrada dos tratamentos para túnel de pasteurização a vapor.

A pasteurização a vapor ocorreu nos mesmos moldes que o E₁, como também o ensacamento, a inoculação, a incubação e a medida de crescimento micelial.

TABELA 2 Matérias-primas para montagem de cada tratamento do experimento 2, considerando a matéria seca (MS) e a matéria úmida (MU).

Tratamentos	Matéria-prima (kg)																	
	Bagaço de cana		Capim coast-cross		Farelo de trigo		Calcário		Gesso agrícola		Super fosfato simple		Cloreto de potássio		Uréia		Total*	
	MU	MS	MU	MS	MU	MS	MU	MS	MU	MS	MU	MS	MU	MS	MU	MS	MU	MS
T ₁ – Sem inoculante	45,1	38,3	47,6	42,8	10,0	9,0	2,0	2,0	2,5	2,1	1,0	1,0	1,0	1,0	1,5	1,5	99,1	90,1
T ₂ – Bactérias	46,2	39,3	46,6	41,9	10,0	9,0	2,0	2,0	2,5	2,1	1,0	1,0	1,0	1,0	1,5	1,5	102,8	90,2
T ₃ – <i>S. thermophilum</i>	46,6	39,6	47,3	42,6	10,0	9,0	2,0	2,0	2,5	2,1	1,0	1,0	1,0	1,0	1,5	1,5	103,9	91,2

* Somatório das matérias-primas bagaço de cana, capim coast-cross e farelo de trigo.

3.2.1 Inoculante do fungo termofílico – *Scytalidium thermophilum*

O fungo termofílico *Scytalidium thermophilum* foi utilizado como inoculante no tratamento 3 (T₃). A cepa deste fungo foi gentilmente cedida pelo Professor João Atílio Jorge, da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP.

O *Scytalidium thermophilum* foi cultivado em ágar aveia enriquecido com sorbose, a 40°C por 7 dias. Após o crescimento, os esporos do fungo foram re-suspensos em água, em volume final de 1,5 L. Foi feita a contagem de esporos na câmara de Neubauer, obtendo $7,2 \times 10^8$ esporos/mL. Para a inoculação do composto foi utilizado todo o volume da suspensão obtida, resultando em $1,1 \times 10^6$ esporos/g de composto úmido.

A quantidade $1,1 \times 10^6$ esporos/g de composto foi adicionada da mesma forma ao E₂T₃, em dois momentos:

- antes da pasteurização (10^a reviragem).
- durante a pasteurização.

Os esporos foram espalhados sobre o composto que estava sendo revirado, após serem diluídos em 10 litros de água, para melhor distribuição no substrato.

3.2.2 Inoculação do composto, cultivo e colheita do E₂

Todos os procedimentos de inoculação, cultivo e colheita foram idênticos ao E₁.

O cultivo foi realizado durante 107 dias (entre os meses de setembro e dezembro/2005), contando a partir do momento da indução. A temperatura oscilou entre 17°C e 28°C e a umidade ficou na faixa de 75% a 90%.

3.3 Experimento 3 (E₃): compostagem/pasteurização tradicional

No E₃ foi utilizado o sistema tradicional de compostagem/pasteurização, ou seja, compostagem de duas semanas (Fase I) e pasteurização/condicionamento (fase II) também de duas semanas, com porcentagem de N inicial de 0,99%, 1,50% e 1,90%. Este experimento teve como objetivo avaliar a melhor concentração inicial de N sobre a colonização e a produtividade do *Agaricus blazei*.

Foram feitos três tratamentos: (T₁), 0,99% de N-inicial; (T₂), 1,50% de N-inicial e (T₃) 1,90% de N-inicial.

A produção do inoculante *Agaricus blazei* CS1 ocorreu da mesma forma e no mesmo local descrito no E₁. No Laboratório de Zootecnia da UFLA, foram feitas as análises para N-total, N-amoniaco, celulose, hemicelulose e lignina, seguindo os mesmos passos descritos no E₁.

A montagem das pilhas foi feita com as mesmas matérias-primas utilizadas no E₁, tomando como base a matéria seca dos materiais, formando assim três pilhas com aproximadamente 300 kg matéria seca cada uma (Tabela 3). A suplementação foi feita com os mesmos materiais citados no E₁, porém, a quantidade de uréia variou entre os tratamentos, tendo como objetivo alterar o teor de N-total entre os tratamentos (Tabela 3).

Durante a compostagem, foram feitas as medições de temperatura, umidade e pH no momento das reviragens, que totalizaram 5, até o momento da entrada dos tratamentos no túnel de pasteurização.

3.3.1 Pasteurização e condicionamento em túnel ventilado

Para a pasteurização e condicionamento do composto, foi utilizada uma câmara de 2x2x4 m (largura x altura x profundidade) com um sistema de ventilação forçada (exaustor centrífugo de 3 cv) em tubulação de 150 mm (Figura 5). Os três tratamentos foram divididos por compensados dentro do túnel

para evitar o contato de um tratamento com outro. Antes de ligar o sistema de ventilação, o composto foi deixado em repouso com a porta aberta até recuperar a temperatura normal. A pasteurização foi de 12 horas com temperatura média de 60°C. Os tratamentos ficaram por 13 dias em condicionamento físico-químico-biológico, tendo temperatura média entre 40°C a 45°C. No 13º dia de condicionamento, o motor foi desligado e os tratamentos foram mantidos dentro do túnel por 12 horas (uma noite), aguardando a queda da temperatura para aproximadamente 25°C.



FIGURA 5 Ilustrações do sistema de pasteurização/condicionamento tradicional no cultivo de *Agaricus blazei*. A) os três tratamentos, B) túnel de pasteurização com assoalho em forma de grade coberto com sombrite; C) entrada do composto no túnel; D) aparência do composto no final da fase II.

TABELA 3 Matérias-primas para montagem de cada tratamento do experimento 3, considerando a matéria seca (MS) e a matéria úmida (MU).

Tratamentos	Matéria-prima (kg)															
	Bagaço de cana		Capim coast-cross		Farelo de trigo		Calcário		Gesso agrícola		Super fosfato simples		Uréia		Total*	
	MU	MS	MU	MS	MU	MS	MU	MS	MU	MS	MU	MS	MU	MS	MU	MS
T ₁ – 0,99 N	141,9	134,8	140,7	130,8	30,0	27,0	6,0	6,0	7,0	5,9	3,0	3,0	1,0	1,0	312,6	292,6
T ₂ – 1,50 N	146,0	138,7	144,5	132,9	30,0	27,0	6,0	6,0	7,0	5,9	3,0	3,0	4,4	4,4	320,5	298,6
T ₃ – 1,90 N	137,0	132,9	139,2	128,1	30,0	27,0	6,0	6,0	7,0	5,9	3,0	3,0	6,7	6,7	306,2	288,0

* Somatório das matérias-primas bagaço de cana, capim coast-cross e farelo de trigo.

3.3.2 Cultivo do experimento 3

O cultivo foi realizado durante 101 dias (entre os meses de setembro e dezembro/2005), contando a partir do momento da indução. A indução ocorreu da mesma forma que descrita no E₁. A temperatura oscilou entre 17°C e 28°C e a umidade ficou na faixa de 75% a 90%. Foi feito também o controle da umidade dos vasos da mesma forma que o E₁.

A colheita e o processamento dos cogumelos foram realizados da mesma maneira que no E₁.

No E₃ também foi usado o programa SISVAR-UFLA para realizar as análises de variância, para um cultivo realizado em DIC, com 3 tratamentos de composto com 10 vasos/repetições, ou seja, 30 parcelas, sorteadas e distribuídas aleatoriamente nas prateleiras da casa de cultivo de cogumelos. Os tratamentos foram identificados como E₃T₁, E₃T₂ e E₃T₃, conforme a descrição feita no item 2.3 para pilhas/tratamentos.

3.4 Experimento-4 (E₄): utilização de inoculantes em compostagem tradicional

Este experimento foi realizado conforme descrito no E₃, porém utilizando 2% de N inicial para todos os tratamentos e com a inoculação de microrganismos assimiladores de amônia. O objetivo foi avaliar o potencial de utilização desses microrganismos no processo convencional.

Foram feitos três tratamentos: (T₁), 2% de N-inicial (sem inoculantes); (T₂), 2% de N-inicial (adição de bactérias no composto) e (T₃) 2,0% de N-inicial (adição de *Scytalidium thermophilum* no composto). Os tratamentos foram montados com as mesmas matérias-primas utilizadas no E₁, tendo aproximadamente 300 kg de matéria-seca (Tabela 4). A suplementação foi realizada na 3ª reviragem com os mesmos materiais citados no E₁, porém, em quantidades diferentes, levando-se em conta a maior quantidade de matéria-prima utilizada neste experimento (Tabela 4). A quantidade de uréia no E₄ foi

igual para todos os tratamentos, acertando o teor de N-total para aproximadamente 2%.

No Laboratório de Zootecnia da UFLA, foram feitas as análises para N-total, N-amoniaco, celulose, hemicelulose e lignina, seguindo os mesmos passos descritos no E₁.

Durante a compostagem de duas semanas, foram feitas as medições de temperatura, umidade e pH no momento das reviragens, que totalizaram 5, até o momento da entrada dos tratamentos para o túnel de pasteurização/condicionamento. Durante a fase II, foi feito o monitoramento da temperatura do composto, por meio da inserção da haste de uma sonda termométrica. Após a finalização da fase II, os tratamentos foram ensacados, inoculados e incubados, nos mesmos moldes do que foi feito no E₁. Amostras foram tiradas, como aconteceu no E₁, para a realização do crescimento micelial.

A fase II deste experimento foi realizada da mesma forma que o E₃, porém, recebendo como inoculantes diferentes espécies de bactérias (*A. faecalis*, *B. subtilis* e *P. stutzeri*) para T₂ e um fungo (*Scytalidium thermophilum*) para T₃ no momento em que os substratos foram colocados no túnel. Uma segunda aplicação destes inoculantes ocorreu quando os tratamentos estavam esfriando, até aproximadamente 25°C, para ser ensacados, inoculados e incubados, tendo estas etapas iguais às que ocorreram no E₁. A concentração de bactérias foi a mesma, ou seja, 10⁴ cel/g. O T₃ recebeu adição do *Scytalidium thermophilum* na concentração de 5,5 x 10⁶ esporos/g de composto.

TABELA 4 Matérias-primas para montagem de cada tratamento do experimento 4, considerando a matéria seca (MS) e matéria úmida (MU).

Tratamentos	Matéria-prima (kg)															
	Bagaço de cana		Capim coast-cross		Farelo de trigo		Calcário		Gesso agrícola		Super fosfato simples		Uréia		Total*	
	MU	MS	MU	MS	MU	MS	MU	MS	MU	MS	MU	MS	MU	MS	MU	MS
T ₁ – Sem inoculante	145,4	129,4	146,5	136,2	30,0	27,0	6,0	6,0	7,0	5,9	3,0	3,0	7,7	7,7	321,9	292,6
T ₂ – Bactérias	144,3	128,4	143,6	133,5	30,0	27,0	6,0	6,0	7,0	5,9	3,0	3,0	7,7	7,7	317,9	288,9
T ₃ – <i>S. thermophilum</i>	141,2	125,7	148,1	137,7	30,0	27,0	6,0	6,0	7,0	5,9	3,0	3,0	7,7	7,7	319,3	290,4

* Somatório das matérias-primas bagaço de cana, capim coast-cross e farelo de trigo.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Curva de crescimento e contagem de colônias bacterianas

Os gráficos das Figuras 6, 7 e 8 apresentam a curva de crescimento das três espécies de bactérias gênio que foram utilizadas como “ativador biológico” durante o processo de compostagem e pasteurização a vapor para cultivo de *Agaricus blazei* CS1 dos experimentos 1, 2 e 4. As curvas de crescimento das bactérias *A. faecalis*, *B. subtilis* e *P. stutzeri* nortearam a quantidade de bactérias a ser inoculada, juntamente com a contagem de UFC por meio do plaqueamento, da taxa de crescimento e do tempo de geração (Tabela 5). Os momentos para aplicação foram escolhidos aleatoriamente durante o período de compostagem, por não se ter referência do uso destas bactérias em sistemas de compostagem para cultivo de cogumelos. Dessa forma, a aplicação foi feita ao longo da compostagem e pasteurização dos substratos.

TABELA 5 Resultado da contagem de UFC das bactérias utilizadas durante a compostagem e pasteurização dos experimentos 1, 2 e 4.

Bactérias	Tempo de crescimento (Horas)	Contagem de células bacterianas (UFC/mL)	Taxa de crescimento Médio (h^{-1})	Tempo de Geração (Horas)	Quantidade da cultura para alcançar 10^4 cel/g de composto (mL)	
					(E_1 e E_2)	(E_4)
<i>A. faecalis</i>	17	$1,85 \times 10^9$	0,09	10,2	0,9	2,70
<i>B. subtilis</i>	9	$2,16 \times 10^8$	0,10	9,6	7,8	23,0
<i>P. stutzeri</i>	9	$1,17 \times 10^9$	0,74	1,3	1,5	4,30

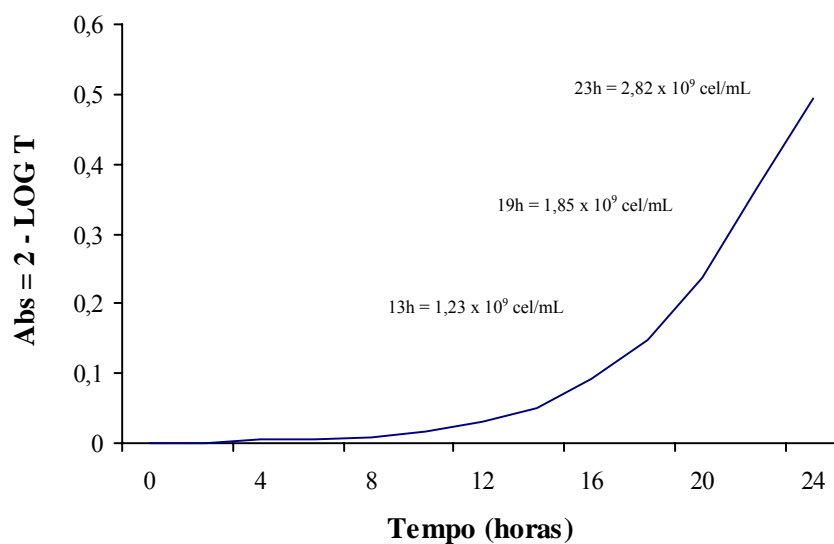


FIGURA 6 Curva de crescimento da bactéria *Alcaligenes faecalis*.

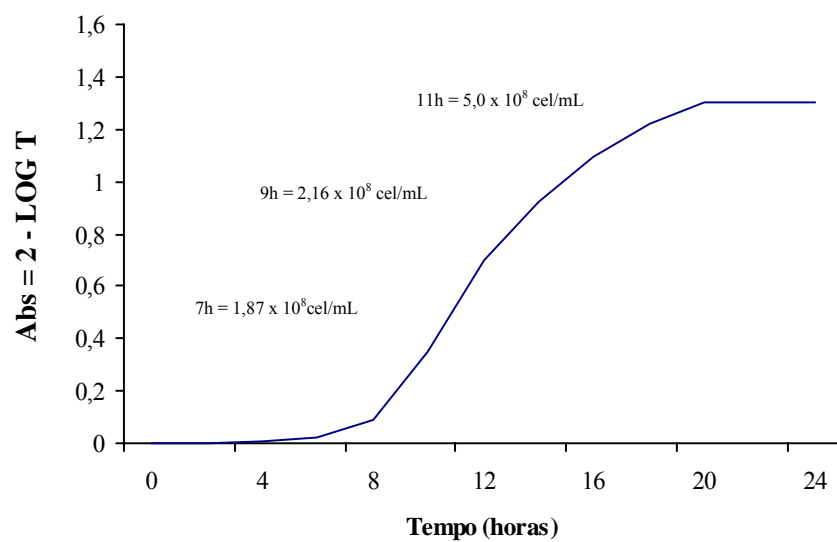


FIGURA 7 Curva de crescimento da bactéria *Bacillus subtilis*.

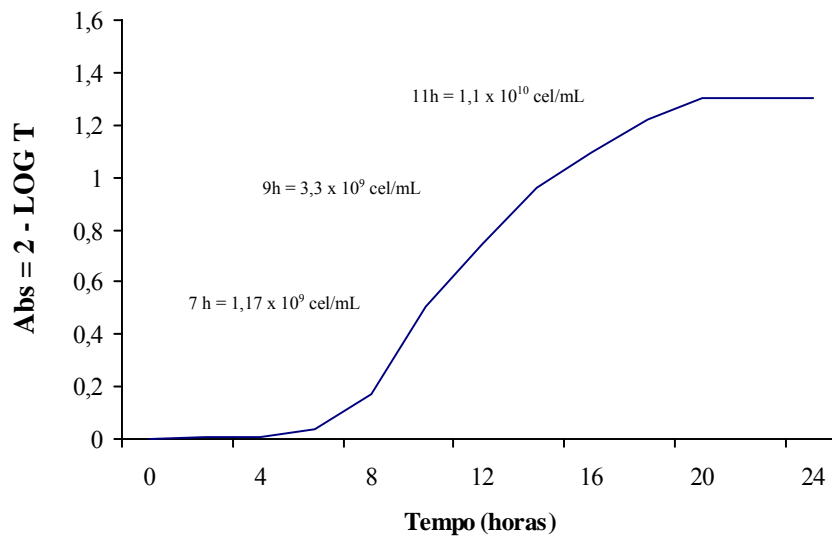


FIGURA 8 Curva de crescimento da bactéria *Pseudomonas stutzeri*.

A curva de crescimento de *A. faecalis* (Figura 6) mostra que esta bactéria tem um crescimento lento, com tempo de geração de 10,2 horas (Tabela 5) quando comparada com as *B. subtilis* (Figura 7) e *P. stutzeri* (Figura 8), que apresentaram tempo de geração de 9,6 e 1,3 horas (Tabela 5), respectivamente. Em 24 horas de crescimento, *A. faecalis* encontrou-se em plena fase LOG, enquanto as bactérias *B. subtilis* e *P. stutzeri*, no mesmo período, demonstraram estar na fase estacionária. Segundo Krieg et al. (1984), *Alcaligenes faecalis* é uma espécie de bactéria em forma de bacilo, gram-negativa, flagelada, com respiração aeróbica obrigatória e utiliza uma variedade de ácidos orgânicos e aminoácidos como fonte de carbono, de ocorrência natural em água e solos, sendo redutoras de nitrito. Segundo Balows et al. (1991), as bactérias do gênero *Alcaligenes*, entre as bactérias do solo, degradam e utilizam compostos xenobióticos e competem em eficiência com as bactérias do gênero *Pseudomonas*. São encontradas normalmente no solo, na água e no lodo de

esgoto. Segundo Otte et al. (1996) relataram também que linhagens de *A. faecalis* TUD são utilizadas como modelo para estudo de desnitrificação e obtiveram seu crescimento em meio de cultura com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ com fonte de nitrogênio. Castignetti & Hollocher (1984) relataram que *Alcaligenes faecalis* foi o segundo grupo mais numeroso na capacidade de assimilar nitrato por meio da desnitrificação. Em estudo realizado sobre *A. faecalis*, van Niel et al. (1992) relataram que a taxa de nitrificação aumentou com o acréscimo da concentração de amônia. You et al. (1995) relataram que a cepa de *A. faecalis* GM mostrou alta capacidade de assimilar N quando submetido a crescimento com alta concentração de amônia.

O uso de *Bacillus subtilis* na compostagem foi motivado por informações obtidas na literatura de que diversas espécies de *Bacillus* são assimiladores de amônia. Kanamori et al. (1987) relataram que *B. subtilis* possui um complexo enzimático assimilador de amônia, que foi observado quando foram utilizados diversos tipos de meio com variável fonte de nitrogênio. Sasaki et al. (2004) informaram que *Bacillus* sp. foi o isolado que obteve a maior assimilação de amônia na temperatura de 37°C em lagoas de água de esgoto de volumoso de gado leiteiro. O gênero *Bacillus* é o grupo de bactérias de maior presença durante a fase termofílica da compostagem de diversos tipos de materiais, como composto natural, resíduos de animais com palhas, entre outros, sendo presença de *B. subtilis* sempre mencionada (Strom, 1985; Peters et al., 2000; Zhang et al, 2002; Fang & Wong, 2000). Balows et al. (1991) relataram que as bactérias do gênero *Bacillus* são gram-positivas, formadoras de endósporos (estruturas de resistência), isoladas de diversos habitats, como solo e água, possuindo um catabolismo e biosíntese versátil.

O gênero *Pseudomonas*, segundo Martinotti et al. (1990), é um grupo comumente encontrado no processo de compostagem de resíduos de esgoto e *P. stutzeri*, *A. faecalis* e *Bacillus* sp foram os grupos mais isolados. Segundo

Balows et al. (1991), as bactérias do gênero *Pseudomonas* são gram-negativa, na forma de bastonetes com flagelo polar, com respiração aeróbica ou facultativa, capazes de usar H₂ ou CO₂ como fonte de energia. *P. stutzeri* tem crescimento em temperaturas até 43°C, sendo bactérias desnitrificantes e isoladas de solo e água.

4.2 N-total e relação C/N

A relação carbono/nitrogênio entre as matérias-primas constituintes da formulação básica para compostagem de todos os experimentos foi determinada pela divisão do somatório de C, pelo somatório de N, das matérias-primas, levando-se em conta a proporção de cada material, tendo o seguinte resultado: bagaço de cana (C=57,3% e N=0,33%), capim coast-cross (C=50% e N=1,06%) e farelo de trigo (C=52,9% e N=2,43%). Assim, a relação C/N ficou em 61/1, não considerando a quantidade de uréia, pois este suplemento variou entre os tratamentos. Os tratamentos tiveram, então, as seguintes relações C/N: T₁ = 61/1; T₂ = 35/1; T₃ = 28/1 e T₄ = 34/1, tendo a uréia apresentado 27% de C e 45% de N, quando utilizada nos tratamentos 2, 3 e 4. Kopytowsk Filho (2002) observou que a maior produtividade de *A. blazei* foi com a relação C/N inicial igual a 37/1 (produtividade \cong 100 g de cog/kg de substrato úmido), comparada com as relações 43/1 e 33/1, com valores de produtividade \cong 85 e 75 g/kg.

4.2.1 Nitrogênio (N) no E₁

No E₁T₁(Tabela 6), não recebeu uréia, portanto o teor inicial de N foi de 0,87%, ou seja, apenas o N contido nas matérias-primas. Os tratamentos 2 e 4 receberam a mesma quantidade de uréia, 1,5 kg, assim na formulação inicial o teor de N foi de 1,5 e 1,57%, respectivamente. O composto recebeu uma maior quantidade de uréia, 2,6 kg, ficando com N-total inicial de 2,04%.

TABELA 6 Nitrogênio-total (N) das matérias-primas e dos 4 tratamentos na fase inicial da compostagem do E₁, de acordo com a matéria-seca (MS) a 65°C.

Matéria prima	N matéria-prima (%)	T ₁ – 0,87% de N			T ₂ – 1,52% de N			T ₃ – 2,04% de N			T ₄ – 1,57% de N + Bactérias		
		MS (kg)	MU (kg)	N%	MS (kg)	MU (kg)	N%	MS (kg)	MU (kg)	N%	M (kg)	MU (kg)	N%
Bagaço de cana	0,33	45,5	52,3	0,16	43,5	49,7	0,14	46,0	55,4	0,15	42,9	47,1	0,15
Capim c. cross	1,06	41,8	47,5	0,46	51,0	54,4	0,52	43,8	47,2	0,47	43,3	49,9	0,48
Farelo de trigo	2,43	9,0	10,0	0,25	9,0	10,0	0,21	9,0	10,0	0,22	9,0	10,0	0,23
SUBTOTAL		96,3	109,8	0,87	103,5	114,1	0,87	98,8	112,6	0,84	95,2	107,0	0,86
Uréia	45,0	Sem adição de uréia			1,5	1,5	0,65	2,6	2,6	1,20	1,5	1,5	0,71
TOTAL		96,3	109,8	0,87	105,0	115,6	1,52	101,4	115,2	2,04	96,7	108,5	1,57

O teor de N-total também foi observado depois da pasteurização a vapor, para os 4 tratamentos de substratos, para o cultivo de *A. blazei* (Tabela 7). Todos os tratamentos apresentaram acima de 2% de N final. Deve-se destacar, porém, que quanto maior o teor de N inicial, maior foi a perda de matéria seca do composto. Isso pode ser explicado pelo fato da atividade microbiana ser maior em substratos mais ricos em N.

TABELA 7 Nitrogênio-total (N) dos 4 tratamentos do E₁ depois da pasteurização a vapor, de acordo com a matéria-seca (MS) a 65°C.

Tratamentos	Matérias-primas antes do			Depois da		
	início da compostagem			pasteurização		
	MS (kg)	MU (kg)	N (%)	MS (kg)	MU (kg)	N (%)
T ₁ – 0,87% de N	96,3	109,8	0,87	53,8	130,6	2,16
T ₂ – 1,52% de N	103,5	114,1	1,52	38,2	96,8	2,84
T ₃ – 2,04% de N	98,8	112,6	2,04	34,4	87,9	2,80
T ₄ – 1,57% de N + Bactérias	95,2	108,5	1,57	40,3	97,8	2,21

O T₃, que na sua formulação inicial recebeu maior quantidade de uréia, teve seu N-total inicial em 2,04%. Este tratamento apresentou, durante a compostagem, cheiro fortíssimo de amônia, principalmente no momento das reviragens. O metabolismo microbiano desse tratamento foi intenso com muita liberação de CO₂, tendo sua matéria seca reduzida no final processo de 98,8 para

34,4 kg. Segundo Eira (2003), formulações de composto com elevado teor inicial de nitrogênio e baixo teor de carbono assimilável redundam em maior perda por volatilização do NH_3 e menor incorporação de N na biomassa. Um substrato está ótimo antes da pasteurização quando tem o teor de umidade de 70% a 72%, nitrogênio total de 2,2% a 2,5%, pH de 7,0-7,5 e relação C/N de 14-18 (Molena, 1986; Eira, 2003; Urben, 2004). A perda de matéria seca ocorre, principalmente, pelo metabolismo microbiano dos carboidratos, podendo perder até 35%, porém, ocorrendo o aumento do teor de N-total em até 1% do valor inicial (Oei, 2003; Urben, 2004; Buth, 2004).

4.2.2 Nitrogênio (N) no E₂

O E2 foi executado por meio da compostagem de 4 semanas com pasteurização a vapor por 48 horas, teve 3 tratamentos, os quais tiveram como diferencial a adição dos inoculantes no composto (Tabela 8).

De forma similar ao experimento 1, todos os tratamentos apresentaram teor de N final igual ou superior a 2% (Tabela 9). O T₁, que não recebeu nenhum tipo de inoculante, apresentou menor perda de matéria, mostrando que a adição de inoculantes apresenta um efeito significativo sobre a atividade microbiana do composto. Segundo van Griensven (1988), os compostos sintéticos, à base de palhas, tendem a elevar o teor de N de 1,5% inicial para valores próximos de 2% de N em compostagem tradicional de 10 a 14 dias.

TABELA 8 Nitrogênio-total (N) das matérias-primas e dos três tratamentos na fase inicial da compostagem do E₂, de acordo com a matéria-seca (MS), a 65°C.

Matéria-prima	N matéria-prima (%)	T ₁ – Sem inoculante			T ₂ - Bactérias			T ₃ – <i>S. thermophilum</i>		
		MS (kg)	MU (kg)	N%	MS (kg)	MU (kg)	N%	MS (kg)	MU (kg)	N%
Bagaço de cana	0,33	38,3	45,1	0,14	39,3	46,2	0,14	39,6	46,6	0,14
Capim coast cross	1,06	42,2	47,6	0,50	41,9	46,6	0,49	42,6	47,3	0,50
Farelo de trigo	2,43	9,0	10,0	0,24	9,0	10,0	0,24	9,0	10,0	0,24
SUBTOTAL		89,5	102,7	0,88	90,2	102,8	0,87	91,2	103,9	0,88
Uréia	45,0	1,5	1,5	0,75	1,5	1,5	0,75	1,5	1,5	0,75
TOTAL		91,0	104,2	1,63	91,7	104,3	1,62	92,7	105,4	1,63

TABELA 9 Nitrogênio-total (N) dos três tratamentos do E₂ depois da pasteurização a vapor, de acordo com a matéria-seca (MS) a 65°C.

Tratamentos	Matérias-primas antes do início da compostagem			Depois da pasteurização		
	MS (kg)	MU (kg)	N (%)	MS (kg)	MU (kg)	N (%)
T ₁ – Sem inoculante	89,5	102,7	1,63	85,8	213,8	2,04
T ₂ - Bactérias	90,2	102,8	1,62	65,0	157,8	2,33
T ₃ – <i>S. thermophilum</i>	91,2	103,9	1,63	66,5	161,5	2,50

4.2.3 Nitrogênio (N) no E₃

Neste experimento, diferentes teores de N foram avaliados, porém, seguindo o sistema convencional de compostagem (fase I e fase II). Conforme observado nos experimentos anteriores, o teor de N estabilizou-se em torno de 2,2% no final da fase II (Tabela 10).

Segundo Oei (2003), o aumento de N na biomassa do composto está relacionado com a quantidade de N inicial. Assim, teores iniciais de 1,3% aumentam para 1,5% no fim da compostagem e chegam a 2,3% no final da fase II. Van Griensven (1988) relatou que teor inicial de 2,0% de N tende a chegar no início da fase de compostagem com o mesmo percentual, quando este teor inicial for de 2,5% tende a regredir para 2,0% no início da fase II.

Novamente, se verificou-se no presente trabalho, que menores concentrações de nitrogênio no composto reduzem a uma menor de matéria seca (Tabela 11). À medida que se aumenta o teor de N, maior a perda de matéria seca do composto.

TABELA 10 Nitrogênio-total (N) das matérias-primas e dos três tratamentos na fase inicial da compostagem do E₃, de acordo com a matéria-seca (MS), a 65°C.

Matéria-prima	N matéria-prima (%)	T ₁ – 0,99% de N			T ₂ – 1,50% de N			T ₃ – 1,90% de N		
		MS (kg)	MU (kg)	N%	MS (kg)	MU (kg)	N%	MS (kg)	MU (kg)	N%
Bagaço de cana	0,33	134,8	141,9	0,15	138,7	146,0	0,15	132,9	137,0	0,15
Capim c. cross	1,06	130,8	140,7	0,47	132,9	144,5	0,47	128,1	139,2	0,47
Farelo de trigo	2,43	27,0	30,0	0,22	27,0	30,0	0,22	27,0	30,0	0,23
SUBTOTAL		292,6	312,6	0,84	0,84	320,5	0,84	288,0	306,2	0,85
Uréia	45,0	1,0	1,0	0,15	4,4	4,4	0,66	6,7	6,7	1,05
TOTAL		292,6	313,6	0,99	298,6	324,9	1,50	288,0	312,9	1,90

TABELA 11 Nitrogênio-total (N) dos três tratamentos do E₃ depois da pasteurização, de acordo com a matéria-seca (MS), a 65°C.

Tratamentos	Matérias-primas antes do início da compostagem			Depois da pasteurização		
	MS	MU	N (%)	MS	MU	N (%)
	(kg)	(kg)		(kg)	(kg)	
T ₁ – 0,99% de N	292,6	313,6	0,99	277,7	477,6	2,25
T ₂ – 1,50% de N	298,6	324,9	1,50	241,8	428,3	2,22
T ₃ – 1,90% de N	288,0	312,9	1,90	216,2	417,1	2,26

* Matéria seca (MS) relacionada por meio da pesagem do material no momento de ensacamento (logo após pasteurização), para que fosse feita a inoculação do fungo *A. blazei*.

4.2.4 Nitrogênio (N) no E₄

O E₄ foi executado pelo do processo convencional de compostagem para *A. blazei* (fase I e II), tendo três tratamentos que difeririam entre si com relação ao uso de inoculantes durante as fases I e II. Os três tratamentos tiveram os teores de N-total inicial de aproximadamente 2,0% (Tabela 12), tendo, ao final da fase II, o teor de N ficado pouco acima de 2%. Outro aspecto importante é que a perda de matéria seca foi a mesma em todos os tratamentos, mostrando que a adição do inoculantes não teve um efeito significativo na atividade microbiana do composto para o sistema convencional.

TABELA 12 Nitrogênio-total (N) das matérias-primas e dos três tratamentos na fase inicial da compostagem do E₄, de acordo com a matéria-seca (MS), a 65°C.

Matéria-prima	N matéria-prima (%)	T ₁ – Sem inoculante			T ₂ - Bactérias			T ₃ – <i>S. thermophilum</i>		
		MS (kg)	MU (kg)	N%	MS (kg)	MU (kg)	N%	MS (kg)	MU (kg)	N%
Bagaço de cana	0,33	129,4	145,4	0,15	128,4	144,3	0,15	125,7	141,2	0,14
Capim c. cross	1,06	136,2	146,5	0,49	133,5	143,6	0,49	137,7	148,1	0,50
Farelo de trigo	2,43	27,0	30,0	0,22	27,0	30,0	0,23	27,0	30,0	0,23
SUBTOTAL		292,6	321,9	0,86	288,9	317,9	0,87	290,4	319,3	0,87
Uréia	45,0	7,7	7,7	1,18	7,7	7,7	1,20	7,7	7,7	1,19
TOTAL		292,6	329,6	2,04	288,9	325,6	2,07	290,4	327,0	2,06

Segundo Buth (2005), os carboidratos são facilmente quebrados no processo fermentativo da fase I pelos microrganismos mesofílicos, que também utilizam N nesta fase, porém os microrganismos termofílicos na fase II incorporam o N na biomassa do composto, aumentando os teores de N-total para faixas de 2,0% a 2,3%, quando o teor de N inicial for de entre 1,0% a 1,5%. Esta faixa de 2,3% N no final do processo permanece quanto se tem teor inicial de N de aproximadamente 2,0%.

TABELA 13 Nitrogênio-total (N) dos três tratamentos do E₄ depois da pasteurização/condicionamento, de acordo com a matéria-seca (MS) a 65°C.

Tratamentos	Matérias-primas antes do início da compostagem			Depois da pasteurização		
	MS	MU	N (%)	MS	MU	N (%)
	(kg)	(kg)		(kg)	(kg)	
T ₁ – Sem inoculante	292,6	329,6	2,04	275,9	467,5	2,48
T ₂ - Bactérias	288,9	325,6	2,07	274,4	459,7	2,16
T ₃ – <i>S. thermophilum</i>	290,4	327,0	2,06	275,8	456,3	2,59

4.3 Celulose, hemicelulose e lignina

O *Agaricus blazei* é um fungo decompositor secundário, ou seja, sua nutrição é baseada em matérias-primas lignocelulósicas. Portanto, é necessário conhecer os teores de celulose, hemicelulose e lignina da matéria-prima utilizada e se esses teores modificam-se ao longo do processo de compostagem, como também após a pasteurização, que antecede a inoculação do fungo. Os dados da tabela 14 mostram os teores de celulose, hemicelulose e lignina para bagaço de cana, capim coast-cross e farelo de trigo. Estas matérias-primas apresentaram teores lignocelulósicos similares aos apresentados por diversos autores na literatura (Rabelo, 2002; Reis, 2000; Nunes et al., 2001). Um dos fatores que determinam o rendimento de cogumelos é a proporção dos componentes fibrosos presentes no composto pasteurizado (Sharma, 1995; Stanek, 1972). Segundo Sharma (1995), celulose, hemicelulose e lignina são intermediários para que ocorram trocas covalentes na formação de novas estruturas. Assim, o conhecimento das proporções destes componentes pode prover melhores informações sobre a seletividade da nutrição de *Agaricus blazei*.

TABELA 14 Teores lignocelulósicos das matérias-primas utilizadas em todos os experimentos de compostagem para cultivo de *Agaricus blazei*, realizado no Laboratório de Zootecnia da UFLA.

Matéria-prima	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)
Bagaço de cana	44,10	32,49	15,23
Capim coast-cross	49,46	16,03	11,54
Farelo de trigo	9,15	41,23	4,76

4.3.1 Teores lignocelulósicos – E₁

Os dados da tabela 15 comparam o percentual do composto lignocelulósico de celulose, hemicelulose e lignina, desde a montagem das pilhas até o fim da pasteurização a vapor por 48 horas de vapor, que ocorreu após 6 semanas de compostagem.

A compostagem longa (6 semanas) apresentou uma perda de aproximadamente de 50% de celulose, disponibilizando, para nutrição do *A. blazei* em torno de 25% de celulose nos substratos pós-pasteurizados e prontos para a inoculação do fungo. Esta quantidade de celulose que foi disponibilizada para o *A. blazei* foi independente da quantidade de N-total utilizada na formulação inicial dos tratamentos. Observou-se, para a lignina (Tabela 15), um efeito de concentração, provavelmente em função da perda de matéria seca e a pequena degradação da mesma durante a compostagem. Butler & Bailey (1973) referem-se à lignina como um polímero, 3-metóxi-fenil-propenol e 3-5-dimetóxi-fenil-propenol, ligados em proporções variadas e em seqüência casualizada. Segundo Silva & Queiroz (2002), o teor de lignina em forrageiras pode variar de 4% a 12%, podendo chegar, nas forragens mais fibrosas, a 20% da matéria seca e como sendo a fração menos digestível da forrageira. Para hemicelulose (Tabela 15), verificou-se pequeno aumento no seu teor final, o que pode ser explicado pela quebra da celulose, gerando polímeros de cadeia mais curta, identificados na análise como hemicelulose. Provavelmente, o aumento não foi maior porque a microbiota presente atuou no composto, degradando parte da hemicelulose presente.

Segundo Jain et al. (1979), apud Fermor et al., (1985), a maioria dos microrganismos que se encontram no processo de compostagem demonstra habilidade em decompor a fração lignocelulósica do substrato. Alguns fungos e actinomicetos são capazes de degradar celulose; linhagens de *Thermomonospora* são geralmente celulolíticas, enquanto os gêneros *Thermoactinomyces* e

Saccharomonospora não são, degradando apenas xilanas (hemicelulose). Nenhum membro da microbiota do composto conseguiu isoladamente degradar a lignina. O conhecimento do valor nutritivo dos polissacarídeos e frações de lignina no composto para cogumelos são importantes para assegurar um composto de melhor qualidade (Wood & Fermor, 1985; Iiyama et al, 1994).

TABELA 15 Composição lignocelulósica dos tratamentos no início da compostagem e depois da pasteurização na compostagem longa para cultivo de *Agaricus blazei* (E₁). Celulose (Cel%), hemicelulose (Hem%) e lignina (Lig%).

Tratamentos	Matérias-primas antes do início da compostagem			Depois da pasteurização		
	Cel (%)	Hem (%)	Lig (%)	Cel (%)	Hem (%)	Lig (%)
T ₁ – 0,87% de N	50,90	26,16	12,70	24,54	26,88	25,18
T ₂ – 1,52% de N	50,86	25,13	11,55	25,83	31,70	25,84
T ₃ – 2,04% de N	50,80	25,97	12,10	21,99	32,34	27,67
T ₄ – 1,57% de N + Bactérias	51,00	25,83	12,56	23,56	32,25	26,67

4.3.2 Teores lignocelulósicos – E2

Os dados da tabela 16 comparam o percentual do composto lignocelulósico de celulose, hemicelulose e lignina, desde a montagem das pilhas até o fim da pasteurização por 48 horas de vapor, que ocorreu após 4 semanas de compostagem. Comportamento semelhante ao E₁ foi observado neste experimento para celulose, hemicelulose e lignina, ou seja, houve queda de celulose, pequeno aumento de hemicelulose, enquanto que o teor de lignina mais que dobrou.

TABELA 16 Composição lignocelulósica com base na matéria seca dos tratamentos no início da compostagem e depois da pasteurização na compostagem longa (4 semanas) para cultivo de *Agaricus blazei*, do E₂. Celulose (Cel%), hemicelulose (Hem%) e lignina (Lig%).

Tratamentos	Matérias-primas antes do início da compostagem			Depois da pasteurização		
	Cel (%)	Hem (%)	Lig (%)	Cel (%)	Hem (%)	Lig (%)
T ₁ - Sem inoculante	43,11	25,61	12,44	19,40	32,24	27,63
T ₂ - Bactérias	43,10	25,72	12,47	20,91	39,93	26,50
T ₃ - <i>S. thermophilum</i>	43,15	23,58	12,47	26,40	37,51	27,36

4.3.3 Teores lignocelulósicos – E₃

O experimento 3 teve três tratamentos com a mesma formulação de matérias-primas, porém, com concentrações diferenciadas de N, seguindo metodologia convencional de compostagem com a fase I (14 dias) e a fase II (14 dias). Os dados da tabela 17 comparam o percentual do composto lignocelulósico: celulose, hemicelulose e lignina, no momento da montagem da pilha, após a fase I e fase II. Apesar de seguir a metodologia convencional de compostagem, não se observou comportamento diferente na degradação desses polímeros quando comparado aos experimentos 1 e 2.

TABELA 17 Composição lignocelulósica com base na matéria seca dos tratamentos no início da compostagem e após as fases I e II, na compostagem para cultivo de *Agaricus blazei*, do E₃. Celulose (Cel%), hemicelulose (Hem%) e lignina (Lig%).

Tratamentos	Início da compostagem			Após fase I			Após fase II		
	Cel (%)	Hem (%)	Lig (%)	Cel (%)	Hem (%)	Lig (%)	Cel (%)	Hem (%)	Lig (%)
T ₁ – 0,99% de N	43,27	25,94	12,62	33,91	31,57	18,63	28,21	30,98	24,52
T ₂ – 1,50% de N	43,32	25,96	12,64	29,26	30,54	20,19	27,34	31,67	23,55
T ₃ – 1,90% de N	43,21	25,99	12,61	32,90	32,52	20,41	25,19	34,34	25,68

4.3.4 Teores lignocelulósicos – E₄

O teor inicial de N no experimento 4 foi de aproximadamente 2,0% para os três tratamentos, porém, em dois deles, foi feita a adição de inoculantes, um com bactérias e outro com o fungo termofílico *S. thermophilum*, seguindo-se a mesma metodologia de compostagem do E₃. Ao contrário do que se observou nos experimentos anteriores, verificou-se, neste experimento, que no tratamento sem adição de inoculantes a degradação de celulose foi menor do que nos tratamentos inoculados com bactérias ou *S. thermophilum*. Conseqüentemente, o teor de hemicelulose foi maior neste tratamento, enquanto que o teor de lignina foi menor em comparação aos demais tratamentos (Tabela 18).

4.4 Nitrogênio amoniacal (N-amoniacal)

Um dos objetivos da fase II de compostagem é o desprendimento da amônia do substrato ou a sua transformação em nitrogênio protéico, pois o amoníaco inibe o crescimento micelial de *Agaricus blazei*.

4.4.1 N-amoniacal – E₁

Os dados da tabela 19 mostram a quantidade de nitrogênio amoniacal (N-amoniacal) antes e depois da pasteurização dos 4 tratamentos submetidos a compostagem longa e pasteurização a vapor para cultivo de *Agaricus blazei*. A quantidade de N-amoniacal foi maior depois da pasteurização do que antes, o que pode ser explicado pelo aquecimento dos substratos, causando, assim, o maior desprendimento de amônio.

Como era esperado, a concentração de N-amoniacal após a pasteurização foi maior nos substratos com maior teor de N inicial. Por outro lado, mesmo no tratamento 1, que tinha 0,87% de N no início do processo, a concentração de N-amoniacal foi elevada, apresentando mais de 500 ppm. No tratamento que recebeu a inoculação com bactérias, houve uma pequena redução

TABELA 18 Composição lignocelulósica com base na matéria seca dos tratamentos no início da compostagem e após as fases I e II, na compostagem para cultivo de *Agaricus blazei*, do E₄. Celulose (Cel%), hemicelulose (Hem%) e lignina (Lig%).

Tratamentos	Início da compostagem			Após fase I			Após fase II		
	Cel (%)	Hem (%)	Lig (%)	Cel (%)	Hem (%)	Lig (%)	Cel (%)	Hem (%)	Lig (%)
T ₁ – Sem inoculante	43,36	25,63	12,54	34,47	36,73	19,38	32,24	39,37	22,91
T ₂ - Bactérias	43,25	25,70	12,55	21,42	36,24	27,33	20,33	36,50	28,00
T ₃ – <i>S.</i> <i>thermophilum</i>	43,39	25,49	12,50	22,31	34,93	28,40	21,06	35,06	29,07

TABELA 19 Teores de N-amoniaco antes e depois da pasteurização dos tratamentos de compostagem para cultivo de *Agaricus blazei* do E₁. Análises realizadas no Laboratório de Zootecnia daUFLA

Tratamentos	N-amoniaco antes da pasteurização		N-amoniaco depois da pasteurização	
	%	ppm	%	ppm
T1 – 0,87% de N	0,001	10	0,051	510
T2 – 1,52% de N	0,054	540	0,113	1.113
T3 – 2,04% de N	0,121	1210	0,187	1.870
T4 – 1,57% de N + Bactérias	0,054	540	0,097	970

na contração de N-amoniaco em relação ao tratamento 2, que tinha a mesma concentração inicial de N. Entretanto, essa redução foi pouco significativa porque o substrato apresentou ainda 970 ppm de N-amoniaco. Altas concentrações de N tendem a aumentar a taxa de formação de amônia, mas, a alta relação C/N propicia que a amônia seja rapidamente reabsorvida pela microbiota, que se nutre dos carboidratos abundantes (Burrows, 1951b). Segundo Flegg (1985), o micélio de *A. bisporus* morre ou é inibido com níveis de amoníaco livre no composto que podem ser sentidos pelo nariz humano, com valores entre 10 e 20 ppm. Considerando que os valores de N-amoniaco de todos os tratamentos foram muito superiores a 20 ppm, esperava-se um efeito negativo sobre a

capacidade de colonização do *A. blazei* sobre esses substratos. No entanto, essa expectativa não se confirmou porque apenas no tratamento 3 (2% N inicial) não houve colonização de todas as sacolas inoculadas. Enquanto que nos demais tratamentos houve 100% de colonização, de 10 sacolas inoculada, duas apresentaram colonização parcial ou ausência de colonização (Figura 9). Esses resultados mostram que, provavelmente, o *A. blazei* apresenta maior tolerância ao amoníaco do que o *A. bisporus*. Graças a essa maior tolerância, a tecnologia de compostagem longa com pasteurização a vapor pode ser utilizada para o *A. blazei*, porém, dificilmente funcionaria para o cultivo de *A. bisporus*.

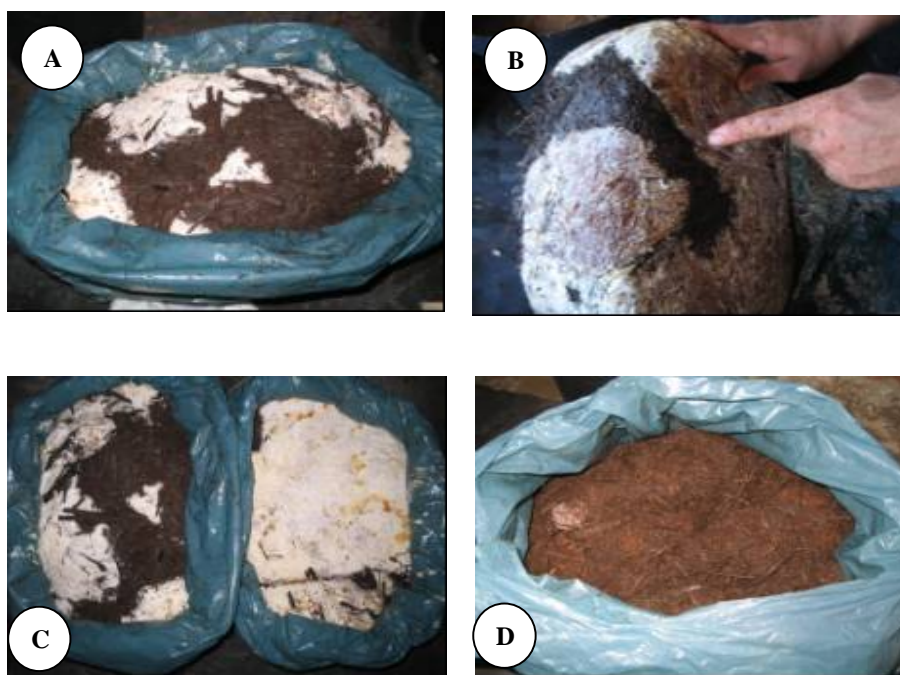


FIGURA 9 A) Composto parcialmente colonizado E_1T_3 ; B) detalhe dos pedaços não colonizados E_1T_3 ; C) Comparação entre o composto parcialmente colonizado, com um totalmente colonizado do E_1T_3 ; D) composto não colonizado E_1T_3 .

4.4.2 N-amoniaco – E₂

Com o objetivo de se avaliar o efeito dos inoculantes sobre a assimilação de amônia no composto, foi montado o experimento 2, no qual todos os tratamentos apresentavam concentração inicial de N de 1,6%, com uma compostagem mais curta (4 semanas), sendo que o tratamento 1 (controle) não recebeu nenhum tipo de inoculante, o tratamento 2 foi inoculado com as bactérias e o tratamento 3 foi inoculado com o *Scytalidium thermophilum*. Ao contrário do que se pensava, o tratamento 1 apresentou a menor concentração de N-amoniaco (210 ppm) (Tabela 20). No entanto, mesmo no tratamento 2, que apresentou maior concentração de N-amoniaco, ocorreu 100% de colonização do composto. Isso era, de certa, forma esperado porque essas concentrações de N-amoniaco estão dentro dos valores encontrados no experimento 1, que permitiram a colonização do composto.

TABELA 20 Teores de N-amoniaco antes e depois da pasteurização dos tratamentos de compostagem para cultivo de *A. blazei* do E₂. Análises realizadas no Laboratório de Zootecnia-UFLA.

Tratamentos	N-amoniaco antes da pasteurização		N-amoniaco depois da pasteurização	
	%	ppm	%	ppm
T1 Sem inoculantes	0,002	20	0,021	210
T2 Bactérias	0,064	640	0,109	1.090
T3 <i>S. thermophilum</i>	0,015	150	0,065	650

4.4.3 N-amoniaco – E₃

A Tabela 21 mostra os teores N-amoniaco dos tratamentos com diferentes concentrações de N inicial do experimento 3, seguindo o sistema tradicional (fase I e fase II da compostagem). Conforme pode ser observado pelos dados da Tabela 21, os valores de N-amoniaco ao final da fase I são comparativamente mais altos do que os encontrados no experimento I antes da pasteurização. Esses resultados eram esperados, uma vez que no E₁ seguiu-se uma compostagem longa de 6 semanas, enquanto que no E₃ seguiu-se uma fase I de duas semanas. Por outro lado, ao final da fase II, os níveis variaram de 40% a 300%, em função do N-inicial de cada tratamento, ou seja, o tratamento com maior concentração inicial de N teve maior quantidade de amônia livre no final de todo o processo.

A quantidade de sacolas de 10 kg de composto inoculadas neste experimento foi de 40 para cada tratamento. O tratamento 3, que teve maior concentração de N inicial, apresentou colonização parcial em 2 sacolas e em outras 3 não ocorreu colonização (12,5%). Nos demais tratamentos, a colonização foi total. Esses resultados confirmam aqueles obtidos no experimento 1, ou seja, a concentração inicial de 2% de nitrogênio não deve ser utilizada para o cultivo do *A. blazei*. Por outro lado, a concentração de N-amoniaco mesmo no tratamento 3, foi bastante inferior ao que foi observado nos experimentos anteriores, o que indica que provavelmente, além do efeito direto sobre a produção de amônia, maior teor de N inicial induz a outros fatores disponíveis à colonização do composto pelo cogumelo.

TABELA 21 Teores de N-amoniaco antes e depois da pasteurização dos tratamentos de compostagem para cultivo de *Agaricus blazei* do E₃. Análises realizadas no Laboratório de Zootecnia da UFLA.

Tratamentos	N-amoniaco antes da pasteurização		N-amoniaco depois da pasteurização	
	%	ppm	%	ppm
T1 – 0,99% de N	0,059	590	0,004	40
T2 – 1,50% de N	0,158	1.580	0,006	60
T3 – 1,90% de N	0,248	2.480	0,030	300

4.4.4 N-amoniaco – E₄

Os dados da Tabela 22 mostram os teores de N-amoniaco dos tratamentos com concentração de N inicial de 2%, tendo como diferencial a adição de inoculantes nos tratamentos 2 e 3, respectivamente, bactérias e *S. thermophilum*. A metodologia utilizada neste experimento foi a mesma utilizada no experimento 3, ou seja, com fase I e II.

Ao contrário do observado no experimento 2, o uso de inoculantes no experimento 4 (compostagem convencional) teve um efeito positivo na redução da amônia no composto. Deve-se ressaltar, porém, que neste experimento, preferiu-se utilizar 2% de N inicial com o objetivo de se avaliar o potencial desses microrganismos para a redução da amônia enquanto que, no experimento 2, utilizou-se 1,6% de N inicial. Apenas no tratamento 1 houve problemas de colonização, sendo que, de um total de 40 sacolas, uma não colonizou e duas apresentaram colonização parcial.

TABELA 22 Teores de N-amoniaco antes e depois da pasteurização dos tratamentos de compostagem para cultivo de *Agaricus blazei* do E₄. Análises realizadas no Laboratório de Zootecnia da UFLA.

Tratamentos	N-amoniaco antes da pasteurização		N-amoniaco depois da pasteurização	
	%	ppm	%	ppm
T1 - Sem inoculantes	0,226	2.260	0,087	870
T2 - Bactérias	0,202	2.020	0,054	540
T3 - <i>S. thermophilum</i>	0,214	2.140	0,069	690

4.5 Temperatura no processo de compostagem

As temperaturas foram observadas no centro da pilha, local de maior temperatura, pois o metabolismo microbiano intenso durante todo processo fermentativo da compostagem libera muito calor (termogênese), concentrando-se com maior intensidade no centro da meda.

4.5.1 Temperatura –E₁

O gráfico da Figura 11 demonstra a temperatura durante as seis semanas de compostagem. A temperatura na primeira reviragem ficou entre 61°C e 70°C nos quatro tratamentos, ocorrendo leve diminuição até o momento da suplementação. Após a adição do farelo de trigo e demais suplementos, a temperatura atingiu um pico de 78°C, quando passou a cair gradativamente. Na meda em compostagem, a atividade microbiana caracteriza-se pela elevação de temperatura que varia com o local, sendo que, na região central, as condições são parcialmente anaeróbias e a temperatura é elevada, podendo chegar a 80°C (Eira, 2003; Oei, 2003, Urban, 2004a).

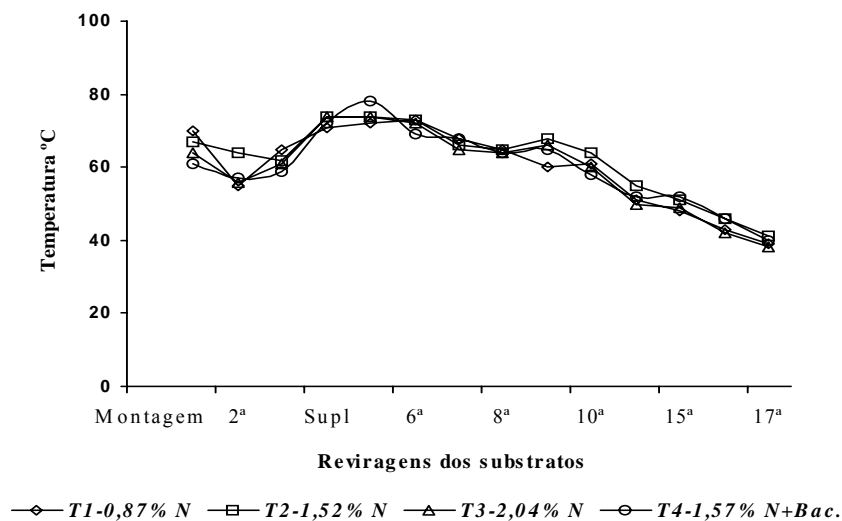


FIGURA 10 Temperatura dos substratos do E₁, durante 6 semanas de compostagem.

4.5.2 Temperatura -E₂

A temperatura do experimento 2 foi monitorada durante 4 semanas de compostagem, sendo 10 reviragens sucessivas nas segundas, quartas e sextas-feiras (Figura 11). As temperaturas apresentaram-se muito similares entre os tratamentos, pois todos tinham a mesma concentração de N inicial (1,5%), diferenciando os tratamentos apenas com a utilização de inoculantes. A temperatura no momento da entrada dos substratos na câmara de pasteurização a vapor era de aproximadamente 59°C nos três tratamentos.

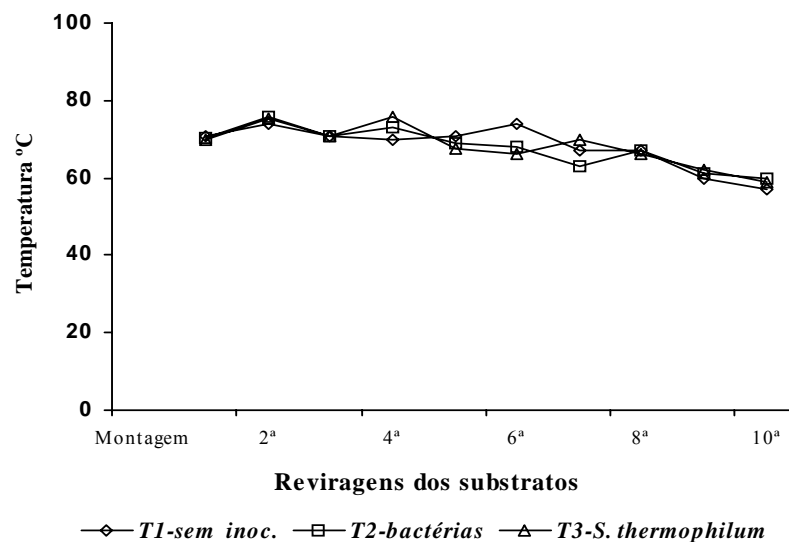


FIGURA 11 Temperatura dos substratos do E₂, durante 4 semanas de compostagem.

4.5.3 Temperatura – E₃

A temperatura do experimento 3 foi monitorada durante duas semanas de compostagem na fase I e também durante a fase II no túnel (Figura 12). As temperaturas durante a compostagem antes da suplementação atingiram um pico de aproximadamente 72°C nos três tratamentos, caindo para valores próximos a 64°C. Após receberem os suplementos na 3ª reviragem, os tratamentos tiveram elevação na temperatura, principalmente o T₃, que recebeu maior quantidade de uréia, chegando a 79°C. No momento anterior à transferência do composto para o túnel de pasteurização, a temperatura estava em torno de 64°C. Antes de ligar o exaustor centrífugo, o composto foi deixado em repouso por 12 horas, aproximadamente, para recuperação da temperatura, a qual ficou entre 62°C e 65°C. Após este período, o motor foi ligado, produzindo um fluxo contínuo de

ar, passando pelos tratamentos que ficaram por 13 dias dentro do túnel. As temperaturas no início do condicionamento (primeira semana) foram de aproximadamente 47°C, diminuindo, no final (segunda semana), para 41°C, em média.

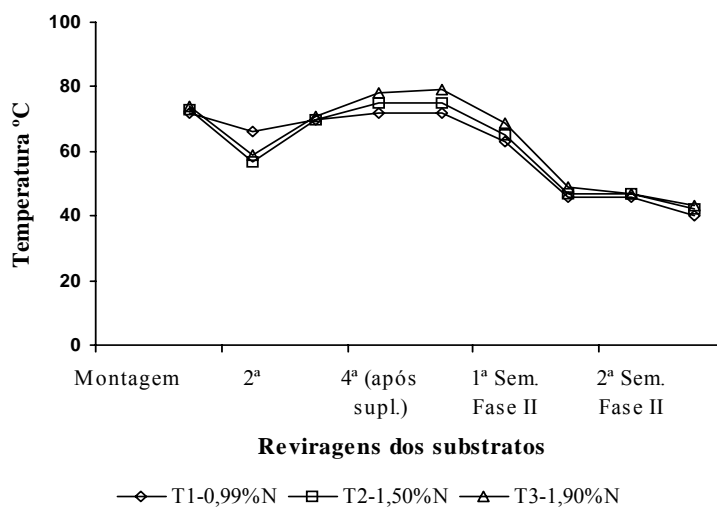


FIGURA 12 Temperatura dos substratos do E₃ durante duas semanas da fase I e duas semanas da fase II.

4.5.4 Temperatura –E₄

No experimento 4, o teor de N inicial para todos os tratamentos foi de 2,0%, porém, foram adicionados inoculantes durante a compostagem e ou pasteurização. Dessa forma, foi feito o monitoramento da temperatura durante as fases I e II (Figura 13). As temperaturas, durante a compostagem antes da suplementação, (3ª reviragem) foram próximas de 74°C nos três tratamentos. Após a suplementação, a temperatura atingiu um pico de 80°C, dois dias antes da transferência dos substratos para o túnel de pasteurização. A pasteurização foi de 12 horas, com temperaturas entre 57°C e 60°C, caindo para faixas entre 51°C e 53°C, do final da primeira semana para o início da segunda. No final da fase II, a temperatura apresentou valores de, aproximadamente, 40°C.

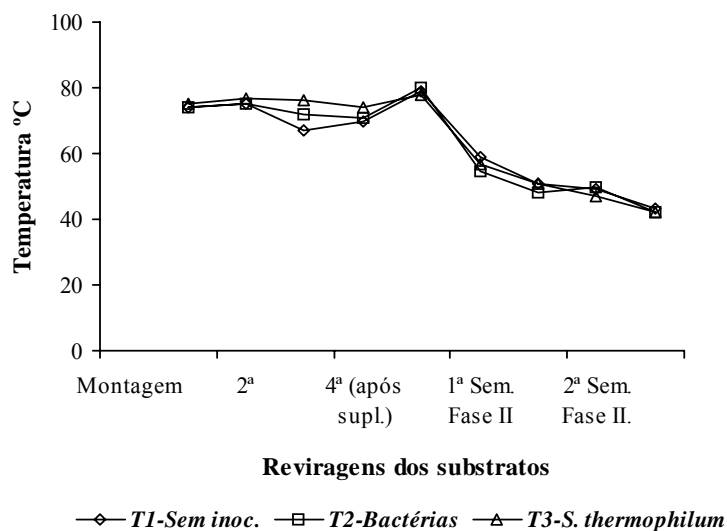


FIGURA 13 Temperatura dos substratos do E₄ durante duas semanas na fase I e duas semanas da fase II.

4.6 Umidade no processo de compostagem

A umidade foi monitorado pela retirada de amostras durante as reviragens e secadas a 65°C em estufa com ventilação forçada por 24 horas.

4.6.1 Umidade – E₁

O gráfico da Figura 14 mostra que a umidade foi elevada no início da compostagem, chegando a valores de 78%, porém, após a suplementação, ocorreu uma estabilidade em torno de 65% e 70%. Na suplementação ocorre adição de gesso agrícola que, além de fonte de cálcio, promove uma estabilidade estrutural do composto (Oei, 2003). Apesar da capacidade de muitos fungos de colonizarem substratos com baixa umidade, para o sucesso do cultivo de cogumelos, o composto deve possuir água suficiente para garantir o seu suprimento durante todo o ciclo produtivo, uma vez que 70% a 90% da água necessária são extraídos direta ou indiretamente do composto, via terra de cobertura (Buth, 2004; Oei, 2003).

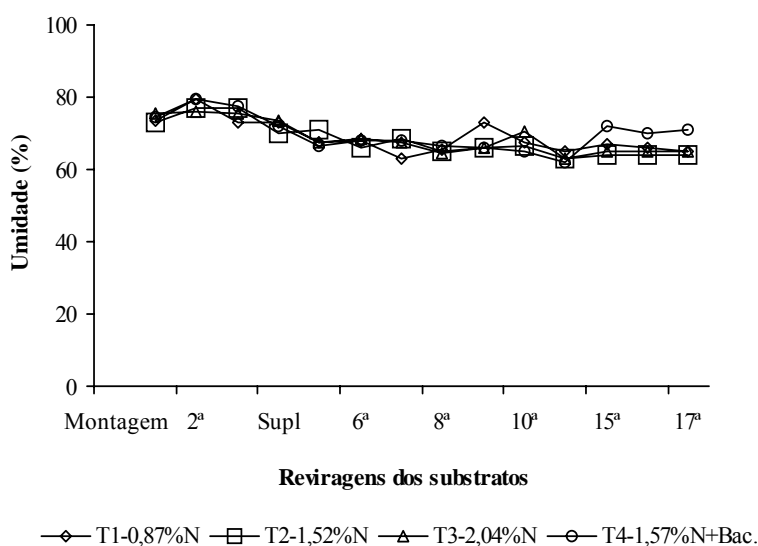


FIGURA 14 Umidade dos substratos do E₁ durante 6 semanas de compostagem e pasteurização a vapor.

4.6.2 Umidade –E₂

O experimento 2 foi conduzido em 4 semanas de compostagem com pasteurização a vapor por 48 horas. A umidade durante a compostagem mostrou uma variação, durante as primeiras reviragens, entre 45% e 50%, porém, antes da suplementação foram registrados os maiores valores, chegando a 75%. Porém, logo após o suplemento com gesso, calcário, entre outros, os valores foram se estabilizando, até chegar ao final da compostagem com valores médios de 65% entre os três tratamentos (Figura 15). O teor de N deste experimento não variou no início da formulação, ficando com aproximadamente 1,6%, variando apenas os inoculantes entre os tratamentos.

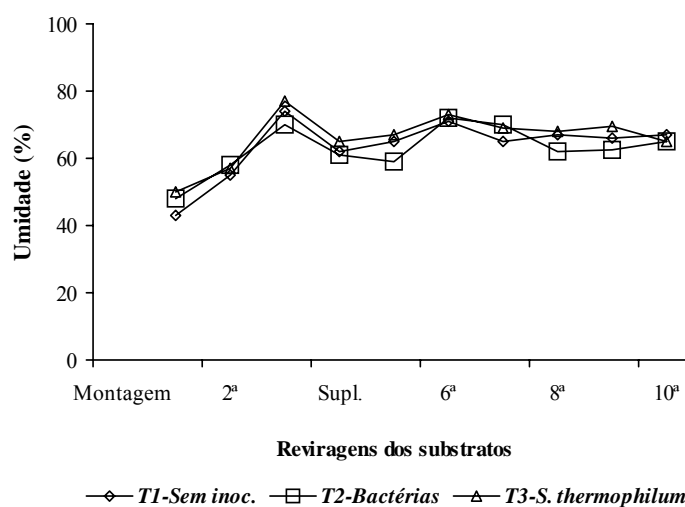


FIGURA 15 Umidade dos substratos do E₂ durante 4 semanas de compostagem até o início da pasteurização.

4.6.3 Umidade – E₃

O experimento 3 foi montado em sistema convencional de compostagem (fases I e II) e com diferentes concentrações de N inicial, entre três tratamentos. A umidade deste experimento foi monitorada durante a fase I até o momento de entrar para fase II, apresentando, na maioria, valores acima de 70% antes da suplementação (3ª reviragem) e, após, valores entre 65% e 68% até o momento de iniciar a fase II (Figura 16).

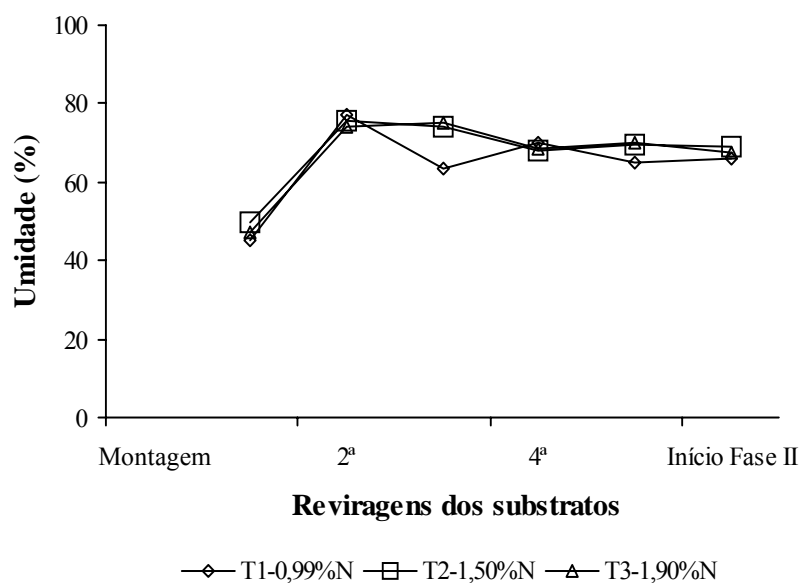


FIGURA 16 Umidade dos substratos do E₃ durante 2 semanas de compostagem (fase I) até o início da fase II.

4.6.4 Umidade –E₄

O experimento 4 teve três tratamentos com aproximadamente 2% de N inicial cada um, porém, com a inoculação de bactérias e fungo termófilo nos tratamentos 2 e 3, respectivamente. Montado da mesma forma que o E₃, apresentou um gráfico de umidade muito similar ao da Figura 16. A umidade antes da pasteurização foi de cerca de 73%, ocorrendo estabilização após o uso de suplementos (3^a reviragem), em torno de 70%, até o momento de entrada para o túnel de pasteurização (Figura 17).

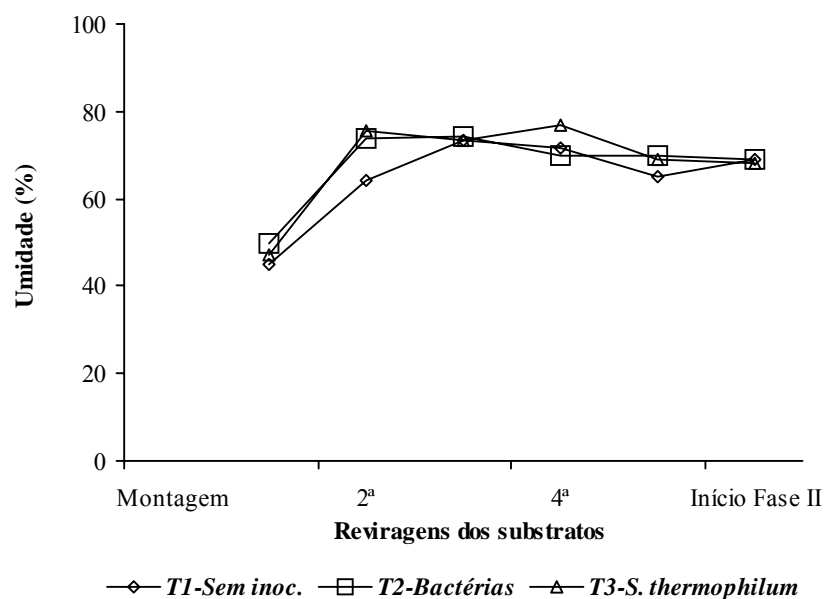


FIGURA 17 Umidade dos substratos do E₄, durante compostagem (fase I), até o início da pasteurização (fase II)

4.7 pH

O pH foi monitorado por meio de retiradas de amostras diluídas em água em todos os momentos em que ocorreram as reviragens das pilhas, em todos os experimentos.

4.7.1 pH -E₁

O pH inicial das pilhas foi em torno de 6,5, chegando a valores acima de 8, com exceção do tratamento 1, nos primeiros dias de compostagem. Porém, após a suplementação, o pH caiu até estabilizar em valores entre 6,2 e 7,0, provavelmente em função da adição calcário calcítico e gesso. O pH do T₁, que não recebeu uréia, manteve o pH constante em torno de 7,0 e 7,5, mesmo após a suplementação, enquanto que os demais sofreram maiores oscilações do pH (Figura 18).

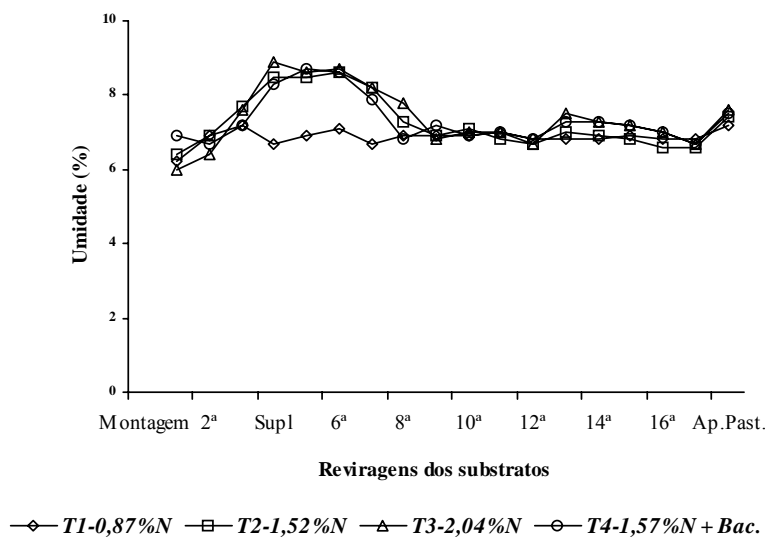


FIGURA 18 pH dos substratos do E₁ durante 6 semanas de compostagem e pasteurização a vapor.

4.7.2 pH – E₂

No experimento 2, os tratamentos foram montados com os mesmos teores de N inicial (1,6%), tendo como fator diferencial os inoculantes utilizados durante a compostagem e a pasteurização. O pH foi muito variável entre os tratamentos, até a 8ª reviragem. A partir disso, o pH dos 3 tratamentos passou a ter o mesmo comportamento, com uma tendência de queda. Após a pasteurização, o pH dos três tratamentos subiu, ficando entre 7,2 e 7,5 (Figura 19).

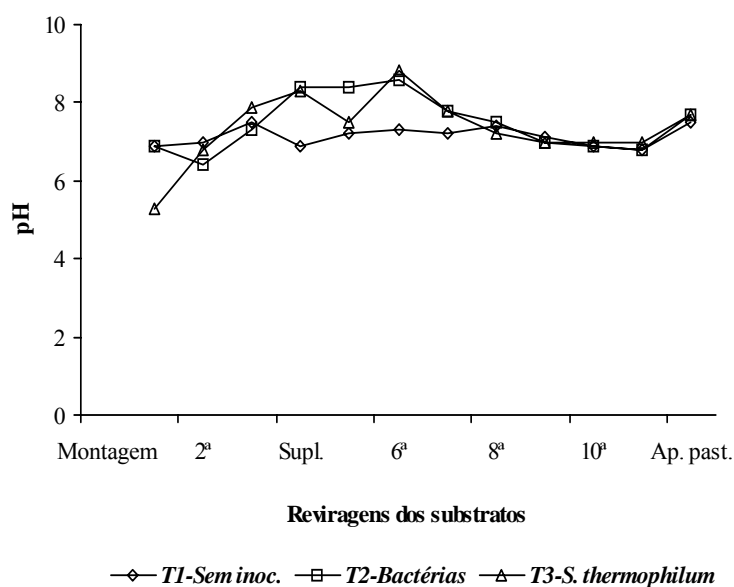


FIGURA 19 pH dos substratos E₂ do durante 4 semanas de compostagem e pasteurização a vapor.

4.7.3 pH –E₃

Os tratamentos do experimento 3 foram montados sobre a metodologia tradicional de compostagem, com teores de N inicial diferentes. Os valores de pH foram acompanhados durante a fase I e após a fase II, os quais tiveram comportamento similar entre os tratamentos durante todo o processo. No início da compostagem, os valores de pH foram abaixo de 7, aumentando para valores acima ou próximos de 7 até a suplementação (3^a reviragem). O T₃ apresentou maior variação após a suplementação, tendo valores próximos de 8 até o início da fase II. Ao final da fase II, o pH de todos tratamentos estabilizou entre 7,5 e 7,7 (Figura 20).

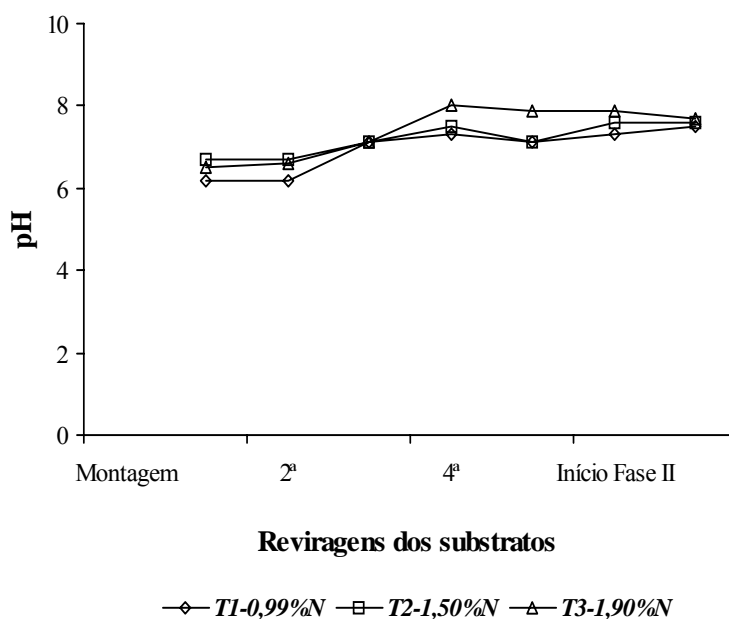


FIGURA 20 pH dos substratos E₃ durante 2 semanas de compostagem (fase I) e após a fase II, em sistema convencional.

4.7.4 pH – E₄

Os valores de pH dos três tratamentos do experimento 4, que tiveram a mesma concentração de 2% de N inicial na compostagem, mostraram-se muito similares. Os valores de pH aumentaram de valores em torno de 7,0 até 8,3, na 5ª reviragem, poucos dias após a suplementação dos substratos. Antes da pasteurização, os tratamentos apresentaram pH de aproximadamente 7,8, tendo, após a pasteurização/condicionamento por duas semanas, ficado entre 6,3 e 6,7 (Figura 21).

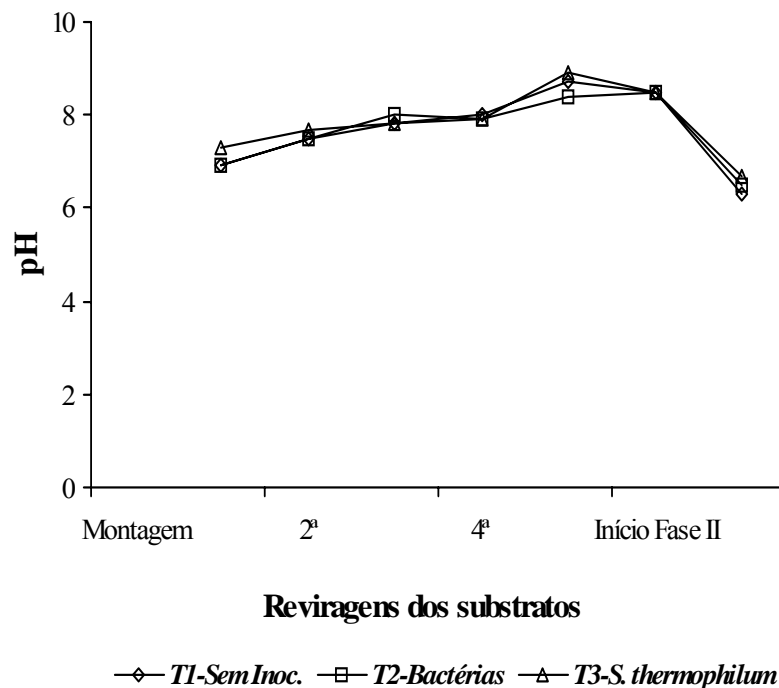


FIGURA 21 pH dos substratos E₄ do durante 2 semanas de compostagem (fase I) e após fase II, em sistema convencional.

4.8 Crescimento micelial, produtividade e eficiência biológica do E₁

O experimento 1 foi realizado por meio da metodologia de compostagem longa (6 semanas) e pasteurização a vapor para o cultivo de *Agaricus blazei*.

4.8.1 Efeito da concentração de N no composto

Os tratamentos 1, 2 e 3 com, respectivamente 0,87%; 1,52% e 2,04% de N foram estatisticamente diferentes entre si, segundo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade, realizado pelo sistema de análise de variância SISVAR-UFLA, com relação ao crescimento micelial durante a fase de colonização (Tabela 23). Considerando apenas o teor de N inicial, verificou-se o melhor crescimento micelial no substrato com 2% de nitrogênio. Por outro lado, a produtividade [(gramas de cogumelos frescos/g de substrato úmido) x 100] mostrou que o T₂ (1,5% de N inicial) teve melhor resultado que o T₃ (2% de N inicial). Deve-se observar também que, no T₂, os cogumelos foram significativamente maiores do que nos demais tratamentos (Tabela 23). Por outro lado, no T₃, apesar de um número menor de cogumelos por vaso, não houve um aumento correspondente do tratamento dos mesmos, mostrando que o composto com 2% de N inicial é de fato, nutricionalmente inferior ao composto com 1,5% de N inicial.

O gráfico da Figura 22 mostra os resultados após cinco ciclos de produção de cogumelos que iniciou 32 dias após a indução. Os resultados revelam que a maior massa de cogumelos é produzida entre 30 e 45 dias contados a partir do primeiro cogumelo colhido. O gráfico da Figura 22 demonstra que, 60 dias após o início da produção, foram colhidos mais de 90% dos cogumelos, revelando que o ciclo de produção não deve durar mais do que 3 meses, contados a partir da indução da frutificação. Dependendo do clima da região, isso poderia permitir 3 ciclos anuais de produção.

TABELA 23 Produtividade, eficiência biológica, crescimento micelial, número médio e massa média dos cogumelos *Agaricus blazei* CS1, nos tratamentos do E₁.

Tratamentos	Crescimento micelial (mm/dia)	Produtividade (%)*	Eficiência biológica (%)**	Nº médio de cogumelos (por/vaso)	Massa média dos cogumelos (g)
T ₁ -0,87% N	3,67 c	6,36 c	21,21 c	18,0 b	19,0 b
T ₂ -1,52% N	4,43 b	8,52 b	28,39 b	16,4 b	26,5 a
T ₃ -2,04% N	7,90 a	6,08 c	20,25 c	12,5 b	22,2 b
T ₄ -1,57%N + Bactérias	7,99 a	10,36 a	34,52 a	22,7 a	20,8 b

‘ As médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si, pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade.

* Produtividade = [(g de cogumelos frescos/g de substrato úmido) x 100].

** Eficiência biológica (EB) = [(g de cogumelos frescos/g de substrato seco) x 100].

4.8.2 Efeito de bactérias assimiladoras de amônia na compostagem

As bactérias *Alcaligenes faecalis*, *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas stutzeri* foram adicionadas, cada uma, na concentração de 10⁴ células por grama de composto do tratamento 4 (experimento 1), o qual recebeu quatro aplicações durante a compostagem e duas na pasteurização. Este tratamento foi comparado ao tratamento 2, que teve o mesmo teor de N inicial, porém, não recebendo a adição das bactérias. Os resultados foram estatisticamente diferentes entre todos os itens avaliados (Tabela 23). O crescimento micelial de 7,99 mm/dia para o T₄ foi muito superior ao T₂, que teve 4,43 mm/dia. O T₄ também teve maior quantidade de cogumelos, porém, com menos massa por cogumelo em relação ao T₂, o que pode ser explicado pelo maior número de cogumelos

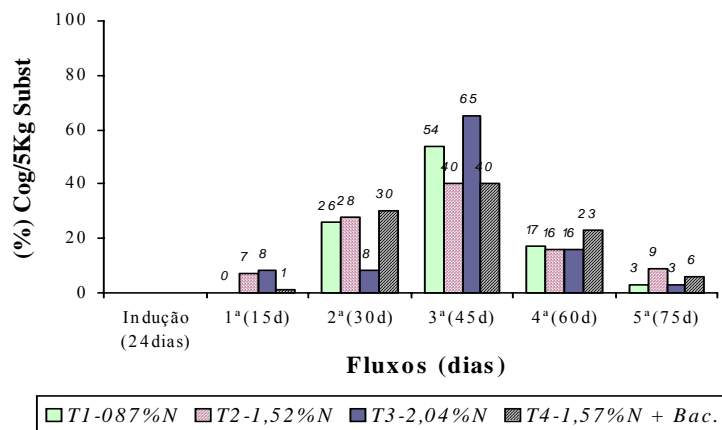


FIGURA 22 Massa de cogumelos *A. blazei* CS1 colhidos (%) em cinco ciclos de 15 dias cada nos 4 tratamentos do E₁.

produzidos. A produtividade e EB do T₄ foram de 10,36% e 34,52%, respectivamente, sendo superior aos apresentados pelo T₂, que foi de 8,52% e 28,39%.

A maior EB para o T₄, aponta que a utilização de inoculantes a base de bactérias na produção de composto com a metodologia de pasteurização a vapor fez diferença na produtividade do cogumelo comestível *Agaricus blazei*. Assim, a metodologia de compostagem longa de 6 semanas com sucessivas reviragens e a utilização de pasteurização a vapor mostrou ser uma eficiente metodologia com a utilização das bactérias na formulação do composto com 1,5% N. Os resultados apontam que o teor de 1,5% de N é o ideal para o cultivo de *Agaricus blazei* CS1 em compostagem longa (seis semanas) com pasteurização a vapor. Teor inicial de nitrogênio acima de 2% mostrou-se pouco eficiente nesta metodologia de compostagem e pasteurização. Oei (2003) relatou que, em cultivo de *Agaricus bisporus* na Holanda, o composto de modo geral possui o N inicial em torno de 2%, obtendo resultados significativos para esta espécie de cogumelo. Eira (2003) relatou que a EB de *Agaricus blazei* variou de 33,8%

para 58,7%, dependendo da terra de cobertura utilizada. Isso mostra que os resultados obtidos neste trabalho usando a metodologia de compostagem longa com pasteurização a vapor pode ser promissora com a inoculação de bactérias. Isso abre perspectivas de estudos, principalmente para definir a importância de cada espécie e o momento de sua adição ao composto.

4.9 Crescimento micelial, produtividade e eficiência biológica do E₂

O E₂ foi montado com três tratamentos com teor inicial de N de 1,5% para todos, sobre metodologia de compostagem longa de 4 semanas e pasteurização a vapor. Além da redução do tempo de compostagem, avaliou-se a utilização do fungo termófilo *S. thermophilum* em um dos tratamentos e as mesmas bactérias do experimento 1 em outro tratamento. O T₁ foi utilizado como testemunha, ou seja, com 1,5% de N sem adição de inoculantes durante todo o processo.

Os dados da tabela 24 mostram os resultados obtidos nos três tratamentos, comparando produtividade e eficiência biológica. Nesta mesma tabela foi demonstrado que o crescimento micelial entre os tratamentos foi estatisticamente diferente, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade, segundo a análise de variância do SISVAR-UFLA, que também foi utilizado em todos os itens da tabela. O T₂, que teve adição das bactérias, mostrou melhor crescimento micelial com 7,2 mm/dia, seguido do T₃ (6,4 mm/dia) e o T₁ (5,2 mm/dia). Em termos de produtividade, os melhores resultados foram obtidos nos tratamentos que receberam os inoculantes, os quais apresentaram quase o dobro de produtividade em relação à testemunha. É interessante observar também que, mesmo produzindo menor número de cogumelos, o composto produzido sem a utilização de inoculantes produziu cogumelos com praticamente a mesma massa daqueles produzidos pelos demais tratamentos, mostrando que a presença dos inoculantes teve um efeito marcante na nutrição e fisiologia do cogumelo.

TABELA 24 Produtividade, eficiência biológica, crescimento micelial, número médio e massa média dos cogumelos *Agaricus blazei* CS1 nos três tratamentos do E₂.

Tratamentos	Crescimento micelial (mm/dia)	Produtividade (%)*	Eficiência biológica (%)**	Nº médio de cogumelos (por vaso)	Massa média dos cogumelos (g)
T ₁ - Sem inoculantes	5,2 c	5,98 b	19,93 b	15,2 b	19,9 a
T ₂ - Bactérias	7,2 a	10,14 a	33,79 a	27,2 a	18,6 a
T ₃ - <i>S. thermophilum</i>	6,4 b	10,40 a	34,66 a	28,9 a	18,6 a

‘ As médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade.

* Produtividade = [(g de cogumelos frescos/g de substrato úmido) x 100].

** Eficiência biológica (EB) = [(g de cogumelos frescos/g de substrato seco) x 100].

Straatsma et al. (1994b) relataram, em experimento com a inoculação de *Scytalidium thermophilum* em composto para *Agaricus bisporus*, comparando-o com a utilização de outros fungos termofílicos, que a produtividade do composto com *S. thermophilum* foi quase três vezes maior que o controle, quando inoculado durante a fase II. Gill et al. (2005) relataram que, na produção de *Agaricus bisporus* no Canadá, usando a metodologia de fase I e II no mesmo túnel, é feito o uso de uma bactéria especial e *Scytalidium thermophilum* no 9º dia de compostagem. Eira (2003) relatou que a inoculação de isolados de *S. thermophilum* em composto para produção de *Agaricus bisporus* não resultou em maior produtividade que o controle, porém, a afirmação foi feita com base em resultados parciais.

No experimento 2, a produtividade no T₃, que usou *S. thermophilum*, teve bom resultado, da mesma forma que o uso das bactérias *A. faecalis*, *B. subtilis* e *P. stutzeri*, que mostraram, novamente, como no experimento 1, um bom rendimento da produtividade e EB. Desse modo, pode-se observar que o uso destes inoculantes na metodologia de 4 semanas de compostagem e pasteurização a vapor fez diferença na produtividade, comparando-se com a testemunha com 1,5% de N inicial e que não teve adição de nenhum tipo de inoculante. Esses resultados confirmam aqueles obtidos no E₁ e mostram que, além das bactérias assimiladoras de amônia, o uso do fungo *Scytalidium thermophilum* é importante na produção do composto, segundo a metodologia testada.

O gráfico da Figura 23 compara cinco fluxos de produção de 15 dias, após o surgimento do primeiro cogumelo, que ocorreu 31 dias após a indução. Os resultados mostraram mais uma vez, que, após 60 dias de colheita, são produzidos mais de 90% dos cogumelos.

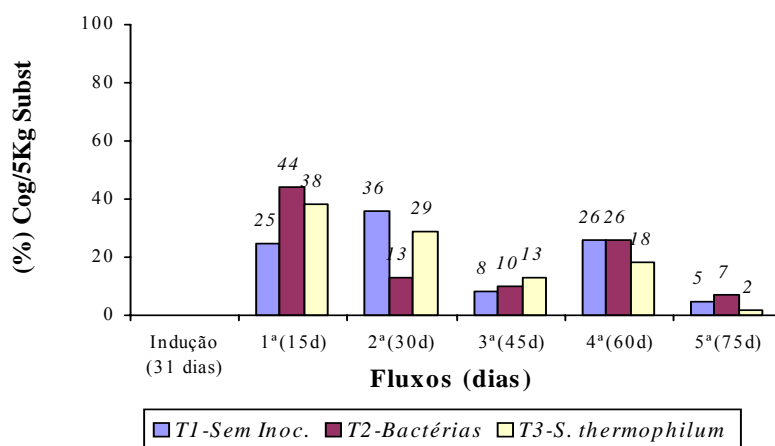


FIGURA 23 Massa de cogumelos *A. blazei* CS1 colhidos (%) em cinco ciclos de 15 dias cada nos 3 tratamentos do E₂.

4.10 Crescimento micelial, produtividade e eficiência biológica do E₃

O experimento 3 foi desenvolvido com a metodologia tradicional de compostagem (fase I e fase II) para substratos no cultivo de *Agaricus blazei*. Dessa forma, foram observados três tratamentos com diferentes concentrações de N inicial de 0,99%, 1,50% e 1,90%, para os tratamentos 1, 2 e 3, respectivamente. O crescimento micelial, nos três tratamentos, foi estatisticamente diferente entre si, segundo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade, realizado pelo sistema de análise de variância SISVAR-UFLA, sendo este teste aplicado nos demais itens avaliados deste experimento. Dessa forma, o crescimento micelial no tratamento 1, com 1,0 de N, foi o que teve melhor resultado, com 6,1 mm/dia, enquanto que os tratamentos 2 e 3 tiveram 5,2 e 3,8 mm/dia, respectivamente (Tabela 25). O T₃, com maior concentração de N (2,0%), apresentou menor crescimento micelial. Quando observado o número médio de cogumelos por vaso/repetição e a massa dos cogumelos, conclui-se que os tratamentos não apresentaram divergência estatística.

TABELA 25 Produtividade, eficiência biológica, crescimento micelial, número médio e massa média dos cogumelos *Agaricus blazei* CS1 nos tratamentos do E₃.

Tratamentos	Crescimento micelial (mm/dia)	Produtividade (%)*	Eficiência biológica (%)**	Nº médio de cogumelos (por vaso)	Massa média dos cogumelos (g)
T ₁ - 0,99% de N	6,1 a	13,28 a	44,28 a	22,1 a	30,1 a
T ₂ - 1,50% de N	5,2 b	13,15 a	43,82 a	21,6 a	29,5 a
T ₃ - 1,90% de N	3,8 c	10,36 b	34,52 b	19,0 a	25,4 a

‘ As médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade.

* Produtividade = [(g de cogumelos frescos/g de substrato úmido) x 100].

** Eficiência biológica (EB) = [(g de cogumelos frescos/g de substrato seco) x 100].

A produtividade, para os tratamentos 1 e 2, foi estatisticamente igual, enquanto que o T₃ apresentou a menor produtividade. Esses resultados contrariam afirmações de alguns produtores e empresas de que a concentração ideal de nitrogênio para o composto de cultivo do *Agaricus blazei* é de 2%. Considerando os resultados desse experimento e do experimento 1, pode-se concluir que teor de N inicial para o cultivo do *A. blazei* deve ficar entre 1% e 1,5%.

Segundo Noble & Gaze (1995), o aumento do teor de N inicial pela adição de novos ingredientes ao composto para cultivo de *Agaricus bisporus* de 1,6% até 3,1% de N, não resultou em boa produtividade, porém, ocorreu perda de matéria seca e o volume liberado de NH₃ foi maior, quando aumentava-se a

quantidade de N. González-Matute & Rinker (2005) relataram que, utilizando diferentes supressores comerciais de amônia em diferentes concentrações de N inicial em composto para cultivo de *Agaricus bisporus*, o teor de N inicial de 1,83% foi a concentração ideal encontrada para este tipo de cogumelo. Eira (2003) relatou que o composto com larga relação C/N inicial não teve muita eficiência, produzindo 27,5 g de cogumelos fresco/kg de composto e número médio de 18 cogumelos, com massa de aproximadamente 22,9 g. Esse mesmo autor informou que, em temperatura de 25°C, o *Agaricus blazei* mostrou uma produtividade de aproximadamente 10% em base úmida, porém, não relatou o teor de N inicial utilizado na formulação.

O gráfico da Figura 24 mostra cinco ciclos produção após o surgimento do primeiro cogumelo, que ocorreu 24 dias após a indução. Conforme verificado também nos experimentos anteriores, após 60 dias de colheita, mais de 90% dos cogumelos foram produzidos.

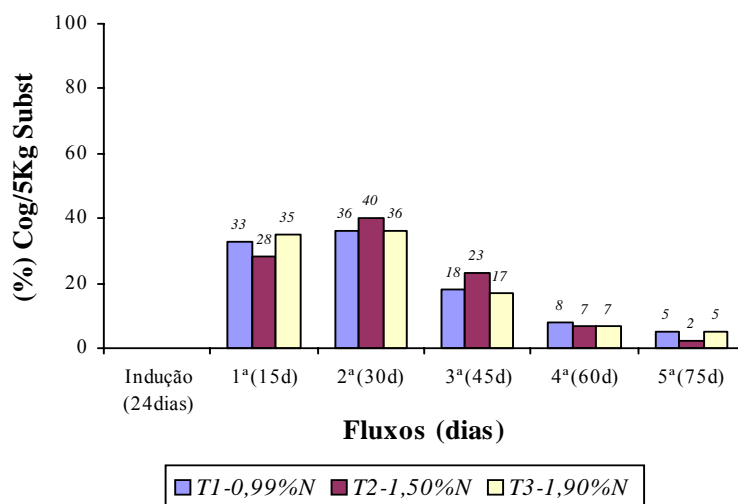


FIGURA 24 Massa de cogumelos *A. blazei* CS1 colhidos (%) em cinco ciclos de 15 dias cada, nos 3 tratamentos do E₃.

4.11 Crescimento micelial, produtividade e eficiência biológica do E₄

Neste experimento seguiu-se o mesmo método utilizado no E₃. O teor inicial de N dos três tratamentos foi de aproximadamente 2,0%, porém, foram utilizados dois tipos de inoculantes para dois tratamentos. O T₁ foi considerado como testemunha, sem receber qualquer tipo de inoculante; o T₂ recebeu as bactérias *A. faecalis*, *B. subtilis* e *P. stutzeri* durante a compostagem e pasteurização, e o T₃ teve como inoculante o fungo termofílico *S. thermophilum*, durante a fase II. O crescimento micelial entre os três tratamentos mostrou diferenças significativas, sendo que o T₂ teve maior crescimento micelial com 8,0 mm/dia e os tratamentos 2 e 3 tiveram 5,8 e 6,6 mm/dia, respectivamente (Tabela 26). O número médio de cogumelos e a massa média de cada cogumelo colhido por vaso/repetição dos três tratamentos foram estatisticamente iguais. Da mesma forma, os três tratamentos foram estatisticamente idênticos quanto à produtividade e EB.

TABELA 26 Produtividade, eficiência biológica, crescimento micelial, número médio e massa média dos cogumelos *Agaricus blazei* CS1, nos tratamentos do experimento 4.

Tratamentos	Crescimento micelial (mm/dia)	Produtividade (%) *	Eficiência biológica (%)**	Nº médio de cogumelos (por vaso)	Massa média de cogumelos (g)
T ₁ – Sem inoculantes	5,8 c	11,37 a	37,89 a	36,2 a	17,7 a
T ₂ – Bactérias	8,0 a	9,81 a	32,69 a	27,2 a	19,6 a
T ₃ – <i>S. thermophilum</i>	6,6 b	9,76 a	32,53 a	25,4 a	18,9 a

‘ As médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si, pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade.

* Produtividade = [(g de cogumelos frescos/g de substrato úmido) x 100].

** Eficiência biológica (EB) = [(g de cogumelos frescos/g de substrato seco) x 100].

O gráfico da Figura 25 mostra que os três tratamentos também produziram mais de 90% dos cogumelos após 60 dias de colheita, a partir do surgimento do primeiro cogumelo, que ocorreu 24 dias após a indução.

Eira (2003) utilizou dois isolados de *Scytalidium thermophilum*, J71111 e J9121, no substrato para cultivo de *Agaricus blazei*, inoculando-os durante a fase II com 1% da base úmida do composto. Para fazer essa inoculação, o autor citou que os isolados foram cultivados em grãos de trigo esterilizados e incubados a 45% e 50°C. Os resultados não apresentaram diferenças significativas entre a testemunha e os tratamentos. Segundo Buth (2004), a presença do fungo *S. thermophilum* no composto estimula o crescimento micelial e a melhor seletividade do substrato, sendo sua presença um dos fatores mais importantes para essa seletividade no composto de cultivo de *A. bisporus*.

Entretanto, no experimento 4, não houve resultados significativos quanto à aplicação das bactérias ou fungo termofílico *S. thermophilum* na metodologia convencional de compostagem, ao contrário do observado nos experimentos 1 e

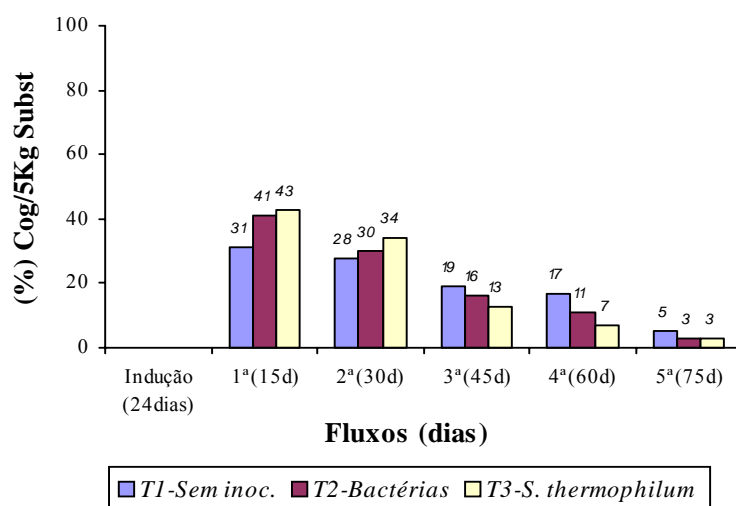


FIGURA 25 Massa de cogumelos *A. blazei* CS1 colhidos (%) em cinco ciclos de 15 dias cada, nos 3 tratamentos do E₃.

2. Deve-se ressaltar, porém, que a quantidade de aplicações de bactérias ou fungo termofílico nos experimentos 1 e 2 foi superior ao número de aplicações feitas neste experimento. Talvez esta seja um dos fatores que limitaram melhores resultados de produtividade e eficiência biológica. Segundo et al. (1994b), foram obtidos bons resultados com algumas cepas de *S. thermophilum* quando aplicado na fase II do composto para *Agaricus bisporus*, utilizando 2 litros de inoculante à base de grão de milho colonizado pelo fungo termofílico, com aproximadamente 10^{10} propágulos. Por outro lado, pode ser também que, para o *A. blazei*, a inoculação desses microrganismos não seja tão importante para essa metodologia, talvez em função de uma menor sensibilidade do *A. blazei* à amônia ou a outros fatores ainda desconhecidos.

É possível, também, que o composto produzido no sistema de compostagem longa, seguida de pasteurização a vapor, responda melhor à inoculação com esses microrganismos, exatamente porque não há uma fase II propícia à colonização uniforme por termofílicos importantes para o seu condicionamento. Em contrapartida, na compostagem convencional, a fase II permite boas condições para o crescimento uniforme de microrganismos termofílicos naturais.

Apesar disso, novos estudos devem ser conduzidos com o objetivo de se avaliar diferentes concentrações desses microrganismos, bem como novas espécies de bactérias e actinomicetos.

5 CONCLUSÕES

- A metodologia de preparo de substratos para cultivo de *Agaricus blazei* de compostagem longa e pasteurização a vapor foi eficiente, do ponto de vista da produtividade e eficiência biológica, somente quando ocorreu adição das bactérias *Alcaligenes faecalis*, *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas stutzeri*, ou quando adicionado o fungo termofílico *Scytalidium thermophilum*. Para esta metodologia, o melhor teor de N inicial foi de 1,5%.
- Na metodologia convencional de preparo de substrato (fase I e fase II), o teor de N inicial deve ser de 1,0% a 1,5%, considerando produtividade e eficiência biológica.
- Nas condições testadas, a utilização das bactérias *Alcaligenes faecalis*, *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas stutzeri* ou do fungo termofílico *Scytalidium thermophilum* não apresentou efeito positivo sobre o composto produzido pelo método convencional, nas condições testadas.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Sugerem-se outros estudos com relação a bactérias e actinomicetos com compostagem em concentração de 1,5% de N, usando a metodologia de pasteurização tradicional em túnel ventilado, como também aumentando a quantidade de inóculo por grama de composto. Quanto ao uso da metodologia de compostagem longa e pasteurização a vapor, sugere-se diminuir o tempo de compostagem, fazendo-se uso das bactérias e do fungo termofílico usados neste trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. **Introductory mycology**. 4. ed. New York: J. Wiley, 1996. 866 p.
- ALVES DE LIMA, P. L.; DENADAI, R.; SALVADORE, D. M. F.; EIRA, ^a F.; RIBEIRO, L. R. Mushroom “Shiitake” (*Lentinus edodes*) as a modulator of clastogenic effects in mice. In: CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE MUTAGÊNESE E TERATOGÊNESE AMBIENTAL, 5, 1998, Curitiba. **Anais...** Curitiba. p. 248. 1998.
- AMAZONAS, M. A. L. de. A. *Agaricus brasiliensis* (= *Agaricus blazei* ss. Heinem.): última visão sobre a polêmica questão da identidade taxonômica de um dos cogumelos mais promissores no mercado mundial. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE COGUMELOS NO BRASIL, 2., 2004, Brasília. 2004, Brasília, DF. **Anais...** Brasília, 2004. p. 78-80. (Documentos, 116).
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC. **Official methods of analysis**. 15^a ed, Washington D. C. 1141p. 1990.
- ATKEY, P. T.; WOOD, W. A. An electron microscope study of wheat straw composted as a substrate for the cultivation of the edible mushroom (*Agaricus bisporus*). *Journal Applied Bacteriology*. v. 55. p. 293-304. 1983.
- AZEVEDO, R. S. **Caracterização física-química e microbiológica no processo da compostagem na produção do cogumelo *Agaricus blazei* e a utilização do composto de *Pleurotus* spp. na suplementação em ração de frango de corte**. Dissertação de Tese em Doutorado em Ciências dos Alimentos na Universidade Federal de Lavras – UFLA, Lavras, 2004.
- BALOWS, A.; TRÜPER, H. G.; DWORKIN, M.; HARDER, W.; SCHLEIFER, K.-H. In: **The Prokaryotes – second edition**. Springer-Verlag. 1991.
- BRAGA, G. C.; EIRA, A. F. **Cultivo de cogumelo do sol (*Agaricus blazei*)**. Viçosa: CPT, 1997. 160 p.
- BURROWS, S.S. The chemistry of mushroom composts. **Journal Science Food Agricultural**. v. 2, p. 403–410, 1951.

BUTH, J. The indoor composting process for *Agaricus* cultivation . In: V CONGRESSO LATINO AMERICANO DE MICOLOGIA, Brasília, 2005. Brasília, DF **Anais...** Brasília, 2005. p. 147-154.

BUTH, J. The indoor composting process for *Agaricus* cultivation. In SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE COGUMELOS NO BRASIL, 2., 2004, Brasília. 2004, Brasília, DF. **Anais...** Brasília, 2004. p. 100-117. (Documentos, 116).

BUTLER, G. W.; BAILEY, R. W. **Chemistry and Biochemistry of Herbage**. Academic Press, London, Vol. I, 1973, 416p.

CASTIGNETTI, D.; HOLLOCHER, T. C. Heterotrophic Nitrification Among Denitrifiers. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 47, n. 4, p. 620-623. 1984.

CELSO, P. G. Interações entre *Agaricus bisporus* e microrganismos termófilos isolados do substrato de cultivo do cogumelo. Dissertação de Mestrado, IQ/UNESP, Araraquara, SP, 84p + CDROM (apêndice). 1999.

COONEY, D.G.; EMERSON, R. **Thermophilic fungi, Eumycota**. San Francisco: W H. Freeman, 1964.

CRISAN, E. V.; SANDS, A. Nutritional value. In: CHANG, S. T.; HAYES, W. A. (Eds.) **The biology and cultivation of edible mushroom**. London: Academic Press. Cap. 6. p. 137-168. 1978.

DENADAI, R., ALVES DE LIMA, P. L.; SALVADORE, D. M. F.; EIRA, A. F.; BAZO, A. P.; RIBEIRO, L. R. The protective effect of mushroom (*Agaricus blazei*) teas on the genotoxicity induced by cyclophosphamide. In: CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE MUTAGÊNESE E TERATOGENÊNESE AMBIENTAL, 5, 1998, Curitiba. **Anais...** Curitiba, 1998. p. 247.

DIAS, E. S.; LABORY, C. R. G.; SILVA, R. **Cultivo de cogumelos comestíveis**. Lavras, MG: FAEPE/DBI/UFLA, 2002. 50 p.

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

EIRA, A. F.; BRAGA, G. C. Técnicas de cultivo do champignon. In: EIRA, A. F.; MINHONI, M. T. A. (Coord.) **Manual teórico-prático de cultivo de cogumelos comestíveis**. 2 ed. Botucatu: FEPAF, 1997. p. 34-57.

EMBAIXADA DO BRASIL EM TOQUIO SETOR DE PROMOÇÃO COMERCIAL. **Boletim de Mercado** – atualizado em janeiro/2005. (www.brasemb.or.jp/porutogatu/relac/secom/agaricus.PDF)

FANG, M.; WONG, J. W. C. Changes in thermophilic bacteria population and diversity during composting of coal fly ash and sewage sludge. **Water, Air, and Soil Pollution**. v. 124, p. 333-343, 2000.

FERGUS, C. L. The heat resistance of some mesophilic fungi isolated from mushroom compost. **Mycologia**, v. 75, p. 149-152, 1982.

FERGUS, C. L. Thermophilic and thermotolerant molds and actinomycetes of mushroom compost during peak heating. **Mycologia**, v. 56, p. 267-284, 1964.
FERMOR, T. R.; RANDLE, P. E.; SMITH, J. F. Compost as a substrate and its preparation. In: FLEGG, P. B.; SPENCER, D. M.; WOOD, D. A. (Ed.) **The biology and technology of the cultivated mushroom**. Chichester: John Wiley and Sons, 1985. cap. 6, p. 81-109.

FERMOR, T. R.; SMITH, J. F.; SPENCER, D. M. The microflora of experimental mushroom composts. **Journal of Horticultural Science**, n. 54, p. 137-147, 1979.

FERMOR, T. R.; WOOD, D. A. Degradation of bacteria by *Agaricus bisporus* and other fungi. **Journal of General Microbiology**, v. 126, p. 377-387, 1981.

FERRATO, J. A.; PROLA, G. Análisis económico de la producción de champiñones com destino a la comercialización en fresco. **Horticultura Argentina**, v. 33, n. 13, p. 50-57, 1994.

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

GERRITS, J. P. G. Nutrition and compost. In: **The cultivation of mushrooms** (Ed.) L. J. L. D. van Griensven. Darlington Mushroom Laboratories, Sussex, pp. 29-72. 1988.

GILL, P.; ELMEKKAWY, T.; STRONG, D. Productivity improvement in mushroom plants. **The Canadian Society for Engineering in Agricultural, Food, and Biological Systems**. Paper n° 05-101. Winnipeg, Manitoba, 2005.

GONZÁLEZ-MATUTE, R.; RINKER, D. L.; Compatibility of ammonia suppressants used in poultry litter with mushroom compost preparation and production. **Bioresource Technology**. 2005.

GRIFFITHS, A. J. F. Natural plasmids of filamentous fungi. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 59, n. 4, p. 673-685, 1995.

GULLIVER, A. et al. Environmentally controlled composting on a commercial scale in Australia. In: MAHER, M. J. (Ed.) **Science and cultivation of edible fungi**. Rotterdam: Balkema, v. 1, p. 155-164, 1991.

HARVEY, C. L.; WEST, P. J.; SCHISLER, L. C. Diseases, weed molds, indicator molds, and abnormalities of the commercial mushroom. In: WUEST, P. J., BENGSTON, G. D. (Ed.) **PennState Handbook for Commercial Mushroom Growers**. Philadelphia: Pennsylvania State University, p. 19-34. 1982.

HIGAKI, M.; EGUCHI, F.; WATANABE, Y. A stable culturing method and pharmacological effects of the *Agaricus blazei*. **Nippon Yakurigaku Zasshi**, Tokyo, v. 110, p. 98-103, 1997. Supplement 1.

HOUDEAU, G.; OLIVIER, J. M.; CHABBERT, B. Improvement of indoor short composting. In: MAHER, M. J. (Ed.) **Science and cultivation of edible fungi**. Rotterdam: Balkema. v. 1. p. 215-220. 1991.

ILYAMA, K.; STANE, B. A.; MACAVLEY, B. J. Compositional changes in compost during composting and growth of *Agaricus bisporus*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 60, n. 5, p. 1538-1546. 1994.

ITO, H.; SHIMURA, K.; ITOH, H.; KAWADE, M. Antitumor effects of a new polysaccharide-protein complex (ATOM) prepared from *Agaricus blazei* (Iwade strain 101) "Himematsutake" and its mechanism in tumor-bearing mice. **Anticancer Research**, Athens, v. 17, n. 1A, p. 277-284, Jan./Feb. 1997.

ITOH, H.; ITO, H.; AMANO, H.; NODA, H. Inhibitory action of a (1→6)-beta-D-glucan protein complex (F III-2-b) isolated from *Agaricus blazei* Murrill (“Himematsutake”) on Meth A fibrosarcoma-bearing mice and its antitumor mechanism. **Japanese Journal of Pharmacology**, Kyoto, v. 66, n. 2, p. 265-271, Oct. 1994.

IWADE, I.; MIZUNO, T. Cultivation of Kawariharatake (*Agaricus blazei* Murrill). **Food Review International**, v. 13, n° 3. p 383-390. 1997.

KANAMORI, K. WEISS, R. L.; ROBERTS, J. D. Ammonia Assimilation in *Bacillus polymyxa* – 15N NMR and enzymatic studies. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 262, n. 23. p. 11038-11045. 1987.

KAWAGISHI, H.; INAGAKI, R.; KANAO, T.; KANAO, T.; SHIMURA K.; ITO, H.; HAGIWARA, T.; NAKAMUJRA, T. Fractionation and antitumor activity of the water-insoluble residue of *Agaricus blazei* fruiting bodies. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 186, n. 2, p. 267-273, Mar. 1989.

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

KAWAGISHI, H.; NOMURA, A.; YUMEN, T.; MIZUNO, T.; HAGIWARA, T.; NAKAMURA, T. Isolation and properties of a lectin from the fruiting bodies of *Agaricus blazei*. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 183, n. 1, p. 150-154, 1988.

KERRIGAN, R. W. *Agaricus subrufescens*, a cultivated edible and medicinal mushroom and its synonyms. **Mycologia**, New York, v. 97, n. 1, p. 12-24, Jan./Feb. 2005.

KIEHL, E. J. **Fertilizantes orgânicos**. Editora Agronomica “Ceres” Ltda. São Paulo, SP – Brasil. 492p. 1985

KIEHL, E. J. **Manual de compostagem – Maturação e qualidade do composto**. Edição: Edmar Jose Kiehl, Piracicaba, 4ª edição, 2004. 173p.

KOPYTIOWSKI FILHO, J. **Relação C/N e proporção das fontes nitrogenadas na produtividade de *Agaricus blazei* e poder calorífico do composto**. Dissertação de Mestrado, PG em Energia na Agricultura, Botucatu, FCA/UNESP, 101p. 2002.

KRIEG et al (1984): In: KRIEG, N. R.; HOLT, J. G. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology** – Volume 1. 1984.

LABORDE, J.; LANZI, G.; FRANCESCUTTI, B.; GIORDANI, E. Indoor composting: general principles and large scale developments in Italy, p. 93-133. In: S. Chang, J. A. Buswell, and S. Chiu (Ed.) **Mushroom biology and mushroom products**. Chinese University Press, Hong Kong. 1993.

LABORDE, J.; OLIVIER, J. M.; HOUDEAU, G.; DELPECH, P. Indoor static composting for mushroom (*Agaricus bisporus* Lange Sing.) cultivation. In: **Cultivating Edible Fungi**, (Eds.) P. J. Wuest, D. J. Royse & R. B. Beelman. Elsevier, Amsterdam, pp. 91-100. 1987.

LEVANON, D.; DANAI, O.; MASAPHY, S. Chemical and physical parameters in recycling organic wastes for mushroom production. **Biological Wastes**, v. 26, n. 4, p. 341-348, 1988.

LIMA, L. M. Q. Compostagem. In: **Tratamento de lixo**. São Paulo: Hemus, 1990. cap. 4, p. 71-116.

MARTINOTTI, M. G.; PUPPO, M.; VARESE, G. C.; GAUTIER, E.; BERTOLOTTI, A. Phenotypic and functional characterization of the microbial communities isolated from a compost. **Seventh International Waste Management and Landfill Symposium**. Margherita di Pula, Cagliari, Italy. October, 1990.

MILLER, F. C.; HARPER, E. R.; MACAULWY, B. J. Field examination of temperature and oxygen relationships in mushroom composting stacks. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v. 29, p. 741-750, 1989.

MIZUNO, T.; HAGIWARA, T.; NAKAMURA, T.; ITO, H.; SHIMURA, K.; SUMIYA, T.; ASAKURA, A. Antitumor activity and some properties of water-soluble polysaccharides from “Himematsutake”, the fruiting body of *Agaricus blazei* Murrill. **Agricultural Biological Chemistry**, Tokyo, v. 54, n. 11, p. 2889-2896, Nov. 1990.

MIZUNO, T. K. *Agaricus blazei* Murrill: Medicinal and dietary effects. **Food Review International**, v. 11, n. 1 p. 172-197. 1995a.

MIZUNO, T. K. Shiitake, *Lentinus edodes*: functional properties for medicinal and food purposes. **Food Review International**. Madison, v. 11, n. 1 p. 111-128. 1995b.

MIZUNO, T.; Kawariharatake, *Agaricus blazei* Murrill: medicinal and dietary effects. **Food Reviews International**, Madison, v. 11, n. 1, p. 167-172, 1995.
MOLENA, O. **O moderno cultivo de cogumelos**. São Paulo-SP: Nobel, 1986. 170 p.

MORAIS, M. H.; RAMOS, A. C.; MATOS, N.; SANTOS-OLIVEIRA, E. J. Note: production of shiitake mushroom (*Lentinus edodes*), on ligninocellulosic residues. **Food Science Technology**, int. 6, p. 123-128. 2000.

NOBLE, R.; GAZE, R. H. Preparation of mushroom (*Agaricus bisporus*) composts in controlled environments: factors influencing compost bulk density and productivity. **Horticulture Research International**, Department of Microbial Biotechnology, Wellesbourne, UK. P. 93-100. 1995.

NUNES, R. V.; ROSTAGNO, H. S.; ALBINO, L. F. T.; GOMES, P. C. ; TOLEDO, R. S. Composição bromatológica, energia metabolizável e equações de predição da energia do grão e de subprodutos do trigo para pintos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v. 30, n. 3, 13p. 2001.

OEI, P. **Mushroom cultivation – Appropriate technology for mushroom growers**. 3rd edition. Backhuys Publishers Leiden, The Netherlands, 2003. 429p.

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

OTTE, S.; GROBBEN, N. G.; ROBERTSON, L. A.; JETTEN, M. S. M.; KUENEN, J. G. Nitrous oxide production by *Alcaligenes faecalis* under transient and dynamic aerobic and anaerobic conditions. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 62. n. 7, p. 2421-2426, 1996.

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

PENTEADO, S. R. **Adubação orgânica: preparo fácil de compostos orgânicos e biofertilizantes**. Campinas-SP. Ed. Agrorganica. 2000. 50p.

PEREIRA NETO, J. T. **Conceitos modernos de compostagem**. Revista Engenharia Sanitária, v. 28, n. 2, p. 104-109, 1989.

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

QUIMIO, T. H.; CHANG, S. T.; ROYSE, D. J. **Technical guidelines for mushroom growing in the tropics**. Rome: FAO, 1990. 155p.

RABELO, M. M. A. **Efeitos de fontes e níveis de fibra íntegra, em dietas contendo bagaço de cana-de-açúcar tratado sob pressão e vapor, sobre a digestibilidade, desempenho e comportamento ingestivo de bovinos de corte**. Dissertação de Mestrado em Agronomia, ESALQ/USP, Piracicaba, São Paulo, 2002.

RANDLE, P. E.; SMITH, J. F. Formulations for short-duration mushroom composts. **Scientia Horticulturae**, v. 28, p. 37-45, 1986.

RANZANI, M. R.; STURION, G. L. Amino acid composition evaluation of *Pleurotus* spp cultivated in banana leaves. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 48, p. 339-348. 1998.

REIS, S. T. **Valor nutricional de gramíneas tropicais em diferentes idades de corte**. Dissertação de Mestrado, DZO/UFLA. Lavras, Minas Gerais. 2000. 99p.

RINKER, D. L. **Commercial mushroom production**. Horticultural Research Institute of Ontario Vineland Station. Ontario Ministry of Agriculture and Food. 1993.

ROSEMBERG, S. L. Temperature and pH optima for 21 species of thermophilic and thermotolerant fungi. **Canadian Journal of Microbiology**, n. 21, p. 1535-1540, 1975.

ROSS, R. C.; HARRIS, P. J. An investigation into the selective nature of mushroom compost. **Scientia Horticulturae**, v. 19, p. 55-64, 1983a.

ROSS, R. C.; HARRIS, P. J. Some factors involved in phase II of mushroom compost preparation. **Scientia Horticulturae**, v. 17, n. 3, p. 223-229, 1982.

ROSS, R. C.; HARRIS, P. J. The significance of thermophilic fungi in mushroom compost preparation. **Scientia Horticulturae**, v. 20, p. 61-70, 1983b.
SASAKI, H.; KITAZUME, O.; SASAKI, T.; NAKAI, Y. Ammonia-assimilating microbes in microbial community in a lagoon for wastewater from paddock of dairy cattle. **Animal Science Journal**. v. 75, n. 1, p. 79-84, 2004.

SAVOIE, J. -M.; MINVIELLE, N.; CHALAUX, N. Changes in N availability and effects of ammonia during composting. In: ELLIOTT, T. J.; (Ed.) **Science and cultivation of edible fungi**. Rotterdam: Balkema, v. 1, p. 275-282, 1995.

SHARMA, H. S. S. Thermogravimetric analysis of mushroom (*Agaricus bisporus*) compost for fibre components. In: Elliot T. (Ed.) **Proceedings of the 14th International Congress on the Science and Cultivation of Edible Fungi**. Balkema, Rotterdam, pp. 267-273. 1995.

SILVA, D. J.; QUEIROZ, A. C. **Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos – 3^a edição**. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa-MG. Editora UFV, 2002.

SIQUEIRA, P. O uso dos cogumelos na alimentação e na gastronomia brasileira. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE COGUMELOS NA ALIMENTAÇÃO, SAÚDE, TECNOLOGIA E MEIO AMBIENTE NO BRASIL, 1. Brasília, DF. **Anais...** Brasília, 2002. p. 88-92. (Documentos, 88).

SMITH, J. F.; WOOD, D. A.; THURSTON, C. F. Growth measurement of *Agaricus* mycelium in composted substrates as an indicator of compost selectivity and mushroom productivity. In : ELLIOT, T. J. (Ed.) **Science and cultivation of edible fungi**. Rotterdam: Balkema, v. 1, p. 293-301. 1995.

STANEK, M. Microorganisms inhabiting mushroom compost during fermentation. **Mushroom Science**, v. 8, p. 797-811. 1972.

STEINECK, H. **Cultivo comercial del champiñon**. 2ed., Zaragoza: Acribia, 1987. 142p.

STIJVE, T.; AMAZONAS, M. A. L. de A.; GILLER, V. Flavor and taste components of *Agaricus blazei* ss. Heinenm: a new gourmet and medicinal mushroom. **Deutsche Lebensmittel-Rundschau**, Stuttgart, v. 98, p. 448-453, 2002.

STÖLZER, S.; GRABBLE, K. Mechanisms of substrate selectivity in the cultivation of edible fungi. In: MAHER, M. J. (Ed.) **Science and cultivation of edible fungi**. Rotterdam: Balkema, v. 1, p. 141-146, 1991.

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

STRAATSMA, G.; OLIJNSMA, T. W.; GERRITS, J. P. G.; et. al. Microbial interactions in composts: comercial aspects. **Canadian Journal of Botany**. v. 73, p. 1019-1024, 1995.

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

STROM, P. F. Identification of thermophilic bacteria in solid-waste composting. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 50. n. 4, p. 906-913, 1985.
SUMMERFIELD, L. The demise of compost turnersorus rex. **Mushroom News**. v. 44, n. 1. p. 18-19, 1996.

TAKAKU, T.; KIMURA, Y.; OKUDA, H. Isolation of an antitumor compound from *Agaricus blazei* Murrill and its mechanism of action. **Biochemical and Molecular Action of Nutrients**. p. 1409-1473, 2001.

TILL, O. Champignonkultur auf sterilisiertem naehrsubstrat und die wiederverwendung von abgetragendem kompost. **Mushroom Science**, n. 5, p. 127-133, 1962.

URBEN, A. F. Caracterização morfológica e fisiológica de acessos de *Agaricus blazei* e *A. sylvaticus*. In: V CONGRESSO LATINO AMERICANO DE MICOLOGIA, Brasília 2005. **Anais...** Brasilia 2005. p. 203-205.

URBEN, A. F. **Produção de cogumelos por meio de tecnologia chinesa modificada**. 2ª edição, revista e ampliada. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília. 2004. 187 p.

van GRIENSVEN, L. J. L. D. **The cultivation of mushrooms**. Darlington Mushroom Lav. Ltda. Rustington, Sussex, England, Somycel S. A. e Langeais, France Ed. 1988. 515p.

van NIEL, E. W.; BRABER, K. J.; ROBERTSON, L. A.; KUENEN, J. L. Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification in *Alcaligenes faecalis* strain TUD. **Antonie Van Leeuwenhoek**. v. 62, n. 3, p. 231-237, 1992.

VEDDER, P. J. C. **Cultivo Morderno Del Champiñon**. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa. 1991. 370p.

VIJAY, B.; GUPTA, Y. Microflora of *Agaricus bisporus* compost. In: NAIR, M. C. (Ed.) **Advances in mushroom biotechnology**. Jodhpur: Scientific Publishers, p. 91-99, 1994.

WASSER, S. P.; DIDUKH, M. Y.; AMAZONAS, M. A. L. de A.; NEVO, E.; STAMETS, P.; EIRA, A. F. da. Is a widely cultivated culinary-medicinal Royal Sun Agaricus (the Himematsutake Mushroom) indeed *Agaricus blazei* Murrill. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, Dordrecht, v. 4, p. 267-290, 2002.

WOOD, D. A.; FERMOR, T. R. In: **The biology and technology of the cultivated mushrooms**, John Wiley and Sons, Chichester, 1985.

YOU, C. B.; LIN, M.; FANG, X. J. Field release of genetically engineered associative diazotrophs and risk assessment. **Journal Agriculture Biotechnology**. v. 1. p. 34-41. 1995.

ZHANG, Y. C.; RONIMUS, R. S.; TURNER, N.; ZHANG, Y.; MORGAN, H. W. Enumeration of thermophilic *Bacillus* species I composts and identification with a Random Amplification Polymorphic DNA (RAPD) protocol. **System Applied Microbiology**. v. 25, n. 4, p. 618-626, 2002.