

**ESTUDO DA MICROBIOTA DURANTE A
FASE II DA COMPOSTAGEM PARA
PRODUÇÃO DO SUBSTRATO DE CULTIVO
DO COGUMELO *Agaricus blazei***

SANDRA ELIZA GUIMARÃES

2006

SANDRA ELIZA GUIMARÃES

**ESTUDO DA MICROBIOTA DURANTE A FASE II DA
COMPOSTAGEM PARA PRODUÇÃO DO SUBSTRATO DE CULTIVO
DO COGUMELO *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**

Guimarães, Sandra Eliza

Estudo da microbiota durante a fase II da compostagem para produção do substrato de cultivo do cogumelo *Agaricus blazei*. / Sandra Eliza Guimarães. – Lavras: UFLA, 2006.
69 p. : il.

Orientador: Romildo da Silva.

Tese (Doutorado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Cogumelo. 2. Microbiota. 3. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-635.8

SANDRA ELIZA GUIMARÃES

**ESTUDO DA MICROBIOTA DURANTE A FASE II DA
COMPOSTAGEM PARA PRODUÇÃO DO SUBSTRATO DE CULTIVO
DO COGUMELO *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 05 de abril de 2006

Profa. Dr. Eustáquio Souza Dias

UFLA

Prof. Dra. Cristina Ferreira Batista

UNINCOR

Prof. Dr. Romildo da Silva
UFLA
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL

*Aos meus pais, João Batista e Maria Helena, pelas orações e conselhos.
Ao meu irmão, Lúcio Fabiano, pelo companheirismo.
A meu noivo, Jorge, pela ajuda e apoio.
A todos que contribuíram com seus esforços para a realização deste trabalho.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelas bênçãos dispensadas a mim e a meus familiares e por ter concedido força e saúde para a realização deste trabalho.

A CAPES, pela concessão de bolsa de estudos, sem a qual não atingiria meu objetivo.

Em especial, à professora Rosane Freitas Schwan, pela oportunidade e confiança para a realização deste curso.

Aos meus orientadores, Romildo da Silva e Eustáquio Souza Dias, pelos ensinamentos, apoio e atenção.

À minha mãe, Maria Helena, meu pai João e meu irmão Lúcio, que sempre acreditaram e apoiaram as minhas decisões.

Ao meu noivo, Jorge, que me acompanhou nesta jornada, obrigado pelo carinho e compreensão.

A todos os meus amigos conquistados durante esta etapa, valeu a pena os ter conhecido.

Aos funcionários do DBI/UFLA Irondina, Rosângela, Carla, Rafaela, Lamartine e Zélia.

À secretária de pós-graduação, Magda, pelo companheirismo, orientação e dedicação.

A meus amigos, colegas e companheiros de Laboratório: Evânia, Gilberto, Gisele, Patrícia, Rômulo, Nina, Emerson, Klenderson, Michele, João Borges, Débora, Whasley, Márcia, Caio, Luziane, Carla, Danielle, Milena e Fábio.

A minha amiga e companheira Cidinha, pelos ensinamentos, conselhos, dedicação e confiança.

Aos meus companheiros de luta, Grazielle, Ana Paula, Gabriela, Janaina e Maiara, que se dispuseram a ajudar na realização deste trabalho, muito obrigada. Serei eternamente grata a vocês.

Ao Professor Luis Roberto Batista do Departamento de Ciências dos Alimentos, muito obrigado pela ajuda e apoio e orientação na realização deste trabalho.

Ao Professor Disney Ribeiro Dias, pela atenção, ensinamentos e apoio. Ao Felix, pelo apoio e ajuda e compreensão em todos os momentos.

A Ivani, pela compreensão, ensinamento, apoio em todos os momentos, pessoa essencial e indispensável, muito obrigado.

A Professora Cristina Ferreira Batista, pelas orientações e por participar gentilmente na finalização deste trabalho.

A Valdirene pela atenção e apoio, muito obrigado.

Aos ex-colegas e ao recém-ingressados no mestrado em Microbiologia Agrícola, obrigado pela convivência e amizade.

Obrigado a todos aqueles que fizeram de suas vidas uma arte em ensinar e cultivar amigos.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
CAPÍTULO 1: Estudo da microbiota durante a fase II da compostagem para produção do substrato de cultivo do cogumelo <i>Agaricus blazei</i>	1
1 INTRODUÇÃO GERAL.....	2
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	4
2.1 Histórico.....	4
2.2 <i>Agaricus blazei</i>	5
2.3 Compostagem.....	6
2.4 Microrganismos do composto.....	8
2.4.1 Bactérias.....	9
2.4.1.1 Bactérias em compostos.....	10
2.4.2 Fungos benéficos.....	11
2.4.3 Fungos prejudiciais.....	12
2.5 Pragas.....	14
2.6 Doenças.....	14
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	15
CAPÍTULO 2: Isolamento e identificação de bactérias presentes na fase II no processo de compostagem para cultivo de <i>Agaricus blazei</i>	20
1 RESUMO.....	21
2 ABSTRACT.....	22
3 INTRODUÇÃO.....	23
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	25
4.1 Obtenção do material.....	25
4.2 Formulação dos compostos.....	25

4.3 Condições de pasteurização.....	78
4.4 Coletas das amostras.....	28
4.5 Preparo das amostras e plaqueamento.....	28
4.6 Análise dos morfotipos e isolamento.....	29
4.7 Identificação das espécies bacterianas.....	29
4.8 Análises estatísticas.....	30
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
5.1 Análise dos isolados.....	32
5.1.1 Isolamento do período final da fase II.....	32
5.1.2 Isolamento feito durante a fase II.....	36
5.2 Estatística.....	38
6 CONCLUSÕES.....	41
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42
CAPÍTULO 3: Isolamento e identificação de fungos filamentosos a partir de composto para o cultivo de <i>Agaricus blazei</i>	43
1 RESUMO.....	44
2 ABSTRACT.....	46
3 INTRODUÇÃO.....	48
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	50
4.1 Preparo e formulação dos compostos.....	50
4.2 Inoculação do fungo <i>Scytalidium thermophilum</i> no composto 1.....	52
4.3 Coleta das amostras.....	53
4.4 Preparo das amostras e plaqueamento.....	53
4.5 Análises dos morfotipos e isolamento.....	54
4.6 Confirmação dos isolados.....	54
4.7 Estatística.....	55

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	56
5.1 Análise da população do fungo <i>Scytalidium thermophilum</i> durante a fase II e colonização micelial pelo <i>Agaricus blazei</i>	56
5.2 Análise dos compostos 2, 3 e 4.....	58
5.3 Estatística.....	61
6 CONCLUSÕES.....	62
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63
ANEXOS.....	65

RESUMO

GUIMARÃES, Sandra Eliza. **Estudo da microbiota durante a fase II da compostagem para produção do substrato de cultivo do cogumelo *Agaricus blazei***. 2006, 69p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.¹

O estudo das diferentes populações microbianas ocorridas no composto de cultivo do *Agaricus blazei* é de fundamental importância para o entendimento das suas atuações sobre as propriedades finais do composto. Portanto, este trabalho foi dividido em três etapas distintas, envolvendo diferentes formulações de composto. Na primeira etapa, foram avaliadas as populações bacterianas da fase II em quatro formulações de composto, com concentrações finais de N: 1,0%; 1,5% e 2,0% quando foi possível observar a maior incidência do gênero *Bacillus* em ambos os compostos e também foram encontradas 22 espécies Gram-negativas diferentes, dentre elas, espécies patogênicas. Na segunda etapa, foi verificado o comportamento do fungo *Scytalidium thermophilum* inoculado em um composto com concentração final de N de 2,0%, no início da fase II, sendo observado a sua presença durante o condicionamento, aumentando a população. Porém, este já não foi mais encontrado ao 10 dias de colonização micelial pelo *A. blazei*. Finalmente, na terceira etapa, foram identificados os fungos filamentosos contaminantes de composto tradicional, que havia sido recentemente pasteurizado, utilizado no cultivo do *A. blazei* este se encontrava ainda sem inoculação do cogumelo e, outros dois compostos à base de resíduo de lixadeira de algodão com concentrações de 30% e 45% de algodão que se encontravam aos 40 dias de colonização pelo cogumelo. Neste isolamento foram encontradas as espécies *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niveus*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus terreus*, *Emericella nidulans*, *Penicillium funiculosum* e, *Penicillium oxalicum*. O composto com 30% de algodão apresentou somente as espécies *A. fumigatus*, *A. niveus* e *P. oxalicum*. O composto com 45% de algodão apresentou maiores índices de contaminação e a espécie *A. fumigatus* foi a que mais ocorreu em ambos os compostos.

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

ABSTRACT

GUIMARÃES, Sandra Eliza. **Study of the microbiota during fase II of composting for the production of substrate for the cultivation of *Agaricus blazei***. 2006, 69p. Dissertation (Maters degree in Agricultural Microbiology– Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.¹

The study of different microbial population occurring in the cultivation compost for *Agaricus blazei* is of fundamental importance for the understanding of their role in the final properties of the compost. Therefore, this work was divided in three distinct stages involving different compost formulation. In the first stage the bacterial population of fase II in four compost formulations with final concentration of N 1,0%; 1,5% and 2,0% were evaluated. It was possible to observe the highest incidence of the genus *Bacillus* in both composts. Also it was found that were 22 different Gram-negative species, among them, some pathogenic species. In the second stage the behavior of *Scytalidium thermophilum* was verified. The fungus was inoculated in compost with a final N concentration of 2,0%, at the start of fase II. The presence of this fungi was observed during the conditioning increasing its population. However this fungus was found at these days of mycelial colonization by *A. blazei*. Finally, in the third stage filamentous fungi were identified as contaminants of a traditional compost used for *A. blazei* cultivation after pasteurization and before inoculation. The filamentous fungus were also found in two other composts based in cotton residue with concentrations of 30% and 45% cotton at 40 days of mushroom colonization. Species of *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niveus*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus terreus*, *Emericella nidulans*, *Penicillium funiculosum*, and *Penicillium oxalicum* were found. The compost contends 30% cotton only presented *A. fumigatus*, *A. niveus* and *P. oxalicum*. The 45% cotton compost presented higher contamination indexes and the *A. fumigatus* species occurred most in both composts.

¹ Orientation committee: Romildo da Silva – UFLA (advisor), Eustáquio Souza Dias - UFLA

CAPÍTULO 1

. ESTUDO DA MICROBIOTA DURANTE A FASE II DA COMPOSTAGEM PARA PRODUÇÃO DO SUBSTRATO DE CULTIVO DO COGUMELO *Agaricus blazei*

1 INTRODUÇÃO GERAL

A compostagem é praticada desde a História Antiga, em diferentes formulações e finalidades. Atualmente, tem importância biológica e ecológica, uma vez que utiliza matéria orgânica resultante das atividades industriais e agroindustriais, reduzindo a poluição dos ambientes.

Além da grande importância do processo para a produção de fertilizantes orgânicos, a compostagem é também utilizada para a obtenção de substrato de cultivo das diferentes espécies de cogumelos comestíveis. Durante o processo de compostagem, diversos grupos de microrganismos atuam na transformação de compostos orgânicos, resultando num processo bioquímico altamente complexo.

Em países desenvolvidos, existem tecnologias avançadas para o cultivo de cogumelos *Agaricus*, mas, de forma geral, a produção de composto acontece em duas etapas, denominadas fase I e fase II, nas quais processos de transformações distintos ocorrem. Na fase I, que acontece em ambiente aberto em que há intensa atividade microbiana, microrganismos mesófilos e termófilos atuam em diferentes pontos da meda, em função dos diferenciais de temperatura, aeração e umidade. A fase II, conduzida em um ambiente controlado (túnel de pasteurização), resulta no melhor condicionamento do composto e eliminando microrganismos indesejáveis, nematóides e ovos de larvas de insetos.

Espécies de fungos, bactérias e actinomicetos vão se sucedendo durante a compostagem, variando de acordo com as condições físicas e químicas do composto. A ação destes microrganismos resulta em elevação da temperatura, em função da biodegradação, favorecendo determinados grupos termofílicos e eliminando populações patogênicas.

Durante a fase II, as condições de temperatura, umidade e aeração são uniformizadas, de forma a permitir que os microrganismos termófilos,

desejáveis ao processo, colonizem todo composto. Para o cultivo do *Agaricus bisporus*, algumas espécies de actinomicetos e fungos termofílicos já foram isoladas e bem discutidas. No entanto, para o cultivo do *Agaricus blazei*, pouco se sabe ainda acerca desses microrganismos presentes no processo de compostagem. Portanto, este trabalho teve por objetivo estudar a comunidade microbiana do composto utilizado para o cultivo de *Agaricus blazei*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Histórico

Diferentes dos vegetais, os fungos, por serem aclorofilados, não podem formar açúcares, dependendo, então, do fornecimento de substâncias orgânicas que contenham açúcares, principalmente celulose hemicelulose e lignina, substâncias estas obtidas das fibras de gramíneas, folhas, bem como madeira, que serão degradadas após a colonização do fungo (Braga et al., 1998).

Os cogumelos são fungos conhecidos desde a Antiguidade, quando o homem já os utilizava como alimento e remédio. No entanto, na natureza existem centenas de espécies diferentes, sendo alguns comestíveis, alucinógenos e até mesmo venenosos.

Estima-se que o cultivo intencional dos cogumelos teve início por volta do século VI, no Oriente, a começar pelos chineses que cultivaram, primeiramente, a espécie *Auricularia auricula*, posteriormente *Flamulina velutipes* e a terceira espécie foi a *Lentinula edodes*, popularmente conhecida com “shiitake”.

Por volta de 1600, na França, foi cultivada a espécie *Agaricus bisporus*, o famoso “champignon”, o qual foi mundialmente difundido e atualmente tem alta tecnologia de produção (Braga et al., 1998).

Nos países da Ásia e Europa, os cogumelos mais cultivados e consumidos são *Agaricus bisporus* e *Lentinula edodes*, sendo, provavelmente, também os mais consumidos no mundo (Eira, 2003).

Os cogumelos são consumidos, principalmente, pelos europeus e asiáticos, em certos países, esse consumo chega a 4,0 kg por habitante/ano. No Brasil, este consumo é ainda muito baixo, chegando a cerca de 70 g por habitante/ano (Eira & Minhoni, 1991).

2.2 *Agaricus blazei*

A espécie *Agaricus Blazei* Murril, também chamada de cogumelo-do-sol, tem tido relatadas as suas propriedades medicinais e despertado o interesse da comunidade científica. Foi descoberta no Brasil pelo agricultor e pesquisador autônomo, Takatoshi Furomoto, na década de 1960, na região sul do estado de São Paulo, região de Mata Atlântica. Exemplares foram enviados ao Instituto Iwade de cogumelos, no Japão, para que fossem estudadas as suas propriedades medicinais. Os exemplares enviados ao Japão foram identificadas pelo cientista belga Dr. Heinemann, em 1967 (Braga et al., 1998).

No Japão, o *Agaricus blazei* tem o nome comercial de Himematsutake ou Kawariharatake (Mizuno et al., 1990), enquanto que, no Brasil, recebe o nome mais comum de ‘cogumelo-do-sol’ ou, simplesmente, cogumelo medicinal, além de outros nomes, atualmente em desuso, como cogumelo piedade, cogumelo princesa, cogumelo de Deus e cogumelo da vida (Mizuno, 1995). No Estados Unidos é chamado de royal *Agaricus*, royal sun *Agaricus* e almond portobello.

Atualmente, há muitas controvérsias taxonômicas, uma vez que isolados de diferentes regiões do Brasil apresentam diferenças comparados à espécie classificadas por Murril, a qual era nativa da Flórida. Diante disso, foi proposto que os isolados brasileiros sejam referenciados como *Agaricus blazei* (Murril) ss Heinemann ou como uma nova espécie, *Agaricus brasiliensis* (Wasser et al., 2002). Estudos no Japão revelaram que linhagens brasileiras são somaticamente diferentes das linhagens japonesas, devido a padrões distintos de isoenzima esterase e do DNAm das linhagens (Fukuda et al., 2003).

Tomizawa (2005) avaliou diferentes isolados de *A. Blazei* por RAPD e PCR/RFLP da região ribossomal e verificou que a maioria dos isolados apresentou pouca ou nenhuma diversidade genética. Um dos isolados, entretanto, apresentou apenas 60% de similaridade em relação aos demais.

Recentemente, estudos moleculares revelaram que, filogeneticamente, os isolados do Brasil são similares à espécie descrita em 1893, por C. H. Peck, como *Agaricus subrufescens* Peck (Kerrigan, 2005). Porém, como o assunto ainda está aberto à discussão, será utilizado, neste trabalho, o nome original atribuído à espécie, *Agaricus blazei*.

2.3 Compostagem

No Brasil, as técnicas de cultivo do *Agaricus blazei* baseiam-se nas técnicas utilizadas para o cultivo do *Agaricus bisporus*. Como esses cogumelos são decompositores secundários, podem ser cultivados em material compostado a partir de resíduos vegetais que apresentem disponibilidade e baixo custo. Estes compostos devem ser suplementados, a fim de proporcionar todos os nutrientes necessários ao crescimento do fungo *A. bisporus*. Segundo Ferri (1987), os substratos utilizados para o cultivo do cogumelo podem ser divididos em dois grupos: a – os que utilizam cama de cavalo e b – os que substituem este substrato total ou parcialmente por outros materiais, como as palhas, chamados de sintéticos. Toda formulação deve levar em consideração a relação de carbono e nitrogênio, nutrientes essenciais para o desenvolvimento do fungo. Straatsma et al. (2000), obtiveram um aumento na produtividade de 20% utilizando bagaço de cana e palha de trigo na formulação do composto em comparação com a formulação tradicional à base de palha de capim e esterco de cavalo fresco. O composto à base de bagaço de cana resulta em um aumento da densidade e as palhas favorecem a aeração devido à estruturação do material (Eira, 2003).

Todos os tipos de restos vegetais podem ser utilizados para a compostagem. Palhas de cereais são utilizadas por vários países como matéria básica do composto, por apresentarem fácil disponibilidade no mercado e de degradação pelo fungo (Gerrits, 1985). Esses materiais são ricos em carbono,

porém, pobres em nitrogênio e fósforo, havendo, por isso, a necessidade de suplementação com farelos e adubos (Eira, 2003).

As etapas que envolvem o preparo do substrato, em que ocorrem a compostagem e pasteurização, são, respectivamente, denominadas de fase I e fase II. Segundo Eira (2003), na fase I, ocorrem o empilhamento e umedecimento do material vegetal com o objetivo de propiciar as reações bioquímicas ativas, por meio da umidade adequada, por, aproximadamente, 14 dias. Neste período, a temperatura pode atingir 80°C, tornando obrigatória a revirada periódica do composto para evitar temperaturas muito elevadas e regiões de anaerobiose por um período de tempo muito longo. Além disso, a revirada do composto permite uma uniformização das suas propriedades físicas, químicas e biológicas. A suplementação, que objetiva adequar os níveis de nutrientes requeridos pelo fungo, deve ser feita preferencialmente no início da fase I, quando a palhada está suficientemente úmida, podendo ser feita com uréia, farelo de soja, superfosfato monocálcico, gesso, sulfato de amônia e calcário.

As fontes nitrogenadas, além de suprir as necessidades de N para a microbiota, são necessárias para baixar a relação C:N para, aproximadamente, 30:1. Várias espécies de fungos são incapazes de assimilar nitrogênio na forma de nitrato, por isso, recomenda-se a utilização de nitrogênio na forma de amônia e uréia (Flegg et al., 1985). No processo de compostagem, ocorrem diversas transformações e, apesar de parte do processo ocorrer em condições parciais de anaerobiose, as transformações ideais ocorrem em condições aeróbicas. Por isso, a meda de composto deve ser revolvido freqüentemente, para que ocorra a homogeneidade e aeração, a fim de não apresentar regiões anaeróbicas, o que acarretaria a presença de organismos indesejáveis, alterando as suas propriedades ideais (Braga et al., 1998).

A fase II, período também denominado de pasteurização e condicionamento final, acontece em ambiente controlado denominado túnel de pasteurização. Neste ambiente, ocorre um aumento da temperatura para aproximadamente, 60°C por 8 horas, no mínimo e continua com o condicionamento por 7 a 8 dias na temperatura aproximada de 45°C, com aeração constante. A pasteurização tem por finalidade erradicar insetos, nematóides e populações microbianas indesejáveis, enquanto que o condicionamento tem como objetivos favorecer o desenvolvimento de organismos termofílicos (actinomicetos e fungos) e eliminar excesso de amônia no composto (Braga et al., 1998).

2.4 Microrganismos do composto

O composto é uma mistura de matéria orgânica adicionada de vários elementos, tornando-se um ambiente favorável à proliferação de vários organismos. A incidência e a sucessão dos microrganismos no composto variam conforme as condições físicas e químicas. Na fase I, ocorre a maior incidência de microrganismos mesófilicos nas bordas da pilha de composto, enquanto os termófilos desejáveis predominam numa região intermediária ao centro (Figura 1). Altas temperaturas causadas pelas atividades microbianas aceleram a quebra de proteínas, gorduras, celuloses e hemiceluloses pelos microrganismos, tornando um material organicamente estruturado para o bom desenvolvimento do cogumelo (Trautman & Olynciw, 2006).

A fase II, que tem como uma das finalidades promover a seletividade microbiológica do composto, a partir da elevação da temperatura e aeração, favorece a predominância de determinados grupos, como os actinomicetos que, além de participarem da degradação da matéria orgânica, são importantes para o bom desenvolvimento do cogumelo, pois, favorecem o crescimento do micélio

devido à produção por estes microrganismos de substâncias como biotina, tiamina e outras vitaminas (Vijay & Gupta, 1994, citados por Eira, 2003).



FIGURA 1 Pilha do composto na fase I, sem a camada superficial, apresentando alo acinzentado de actinomicetos.

2.4.1 Bactérias

As bactérias são organismos altamente diversificados e habitam os mais variados ambientes, nas mais extremas condições físicas e químicas, participando de diferentes processos metabólicos. Estes organismos têm sobrevivido na Terra ao longo de 2 a 3 bilhões de anos e estima-se que sejam conhecidos de 1% a 10% do total existente, o que corresponde aproximadamente, a 110.000 espécies (Hawksworth, 1991).

O isolamento de bactérias requer um manuseio adequado da amostra e o sistema de identificação deve permitir eficiência e segurança, uma vez que se encontra disponível no mercado uma variedade de métodos químicos, físicos e moleculares (Melo & Azevedo, 1998).

2.4.1.1 Bactérias em compostos

As informações científicas das influências da população microbiana remanescente no composto, sobre o desenvolvimento do *A. blazei*, são escassas e inconclusivas, sendo, na maioria das vezes, para o cultivo do *Agaricus bisporus*. Sabe-se que determinados grupos são acometedores do cogumelo, como, por exemplo, *Pseudomonas tolaasii*, que causa necrose e manchas no basidioma (Godfrey et al., 2001); Outros são degradadores de celulose, assim como *Agrobacterium*, *Brucella*, *Zymomonas* e outras (Wenzel et al., 2000). Portanto, este grupo se encontra em abundância no solo devido à disponibilidade de material celulolítico e a sua resistência a determinados fatores físicos e químicos, sendo, portanto, de fácil isolamento (Aagot, et al., 2001). Estudos revelaram que, em altas temperaturas, as bactérias degradadoras de composto apresentam alta atividade enzimática (Miyatake & Iwabuchi, 2005). As bactérias são também importantes assimiladoras de amônia na compostagem, como os actinomicetos termofílicos isolados em cultivo de *A. bisporus* (Ross e Rarris 1983b). Grupos como *Pseudomonas*, *Brevibacterium* e *Streptomyces* apresentam altos índices de consumo da amônia em ambas as fases da compostagem (Sasaki et al., 2005).

Strom (1985) observou que, em composto à base de dejetos urbanos, também predominaram espécies termofílicas pertencentes ao gênero *Bacillus*, mas também ocorreram, em menor escala, espécies de *Pseudomonas* e *Clostridium*. Bactérias Gram-positivas são também as mais abundantes em solos, uma vez que este ambiente é, na maioria das vezes, rico em matéria orgânica em decomposição (Moreira & Siqueira, 2002). Segundo o Manual de Bergey de Determinação Bacteriológica (1994), a maioria das bactérias termofílicas pertence ao Gênero *Bacillus* e essas foram isoladas dos ambientes termofílicos e mesofílicos. Para Fermor et al. (1985), as bactérias que dominam a compostagem são as mesofílicas, principalmente *Flavobacterium* spp.,

Pseudomonas spp., *Serratia marscescens*; as termotolerantes, como espécies de *Pseudomonas* e as termofílicas como *Bacillus coagulans*, *B. steatothermophilus*, *B. subtilis* e *B. lichiniiformis*.

Para alguns autores, as bactérias que propiciam uma melhor interação com o cogumelo são as Gram-negativas. Elas auxiliam na formação do basidioma (por exemplo, *Pseudomonas* sp.) e são as mais abundantes no composto, no momento de desenvolvimento do micélio e na frutificação do cogumelo (Reddy & Patrick, 1990).

Já em composto à base de esterco animal, ocorrem grupos patogênicos de bactérias Gram-negativas, principalmente ao homem. Master et al. (1998) relataram a presença de *Salmonella* sp., *Shigella* sp., *Vibrio cholera*, *Mycobacterium tuberculosis*, *E. coli* e outras. No caso da *E. coli*, Gong et al. (2005) verificaram a sua resistência à pasteurização em composto para cultivo de cogumelo, tendo conseguido suportar temperatura de 54°C a 67°C.

2.4.2 Fungos benéficos

Determinados grupos de fungos desenvolvem-se no composto e participam dos processos metabólicos; alguns já têm sido observados favorecendo a produção.

Scytalidium thermophilum (Cooney & Emerson) Austwick é um ascomiceto anamórfico, apresentando as seguintes sinonímias: *Phaeoscopulariopsis paisii* (Pollacci) M. Ota, *Scopulariopsis paisii* (Pollacci) Nann., *Torula paisii* Pollacci, *Torula thermophila* Cooney & R. Emerson (www.antarctica.ac.uk/Resources/BSD/Fungi/flists.html acessado em 11/02/2006).

Este fungo foi isolado, primeiramente, de composto utilizado para cultivo de *A. bisporus*, nos estudos de Straatsma et al. (1994), apresentando-se como estimulador do crescimento micelial do cogumelo.

Os fungos termofílicos exercem um papel importante na compostagem. Estudos em meio de cultura e em composto revelaram que *S. thermophilum* favorece o crescimento micelial do cogumelo, além de suprimir competidores (Vijay et al., 1999; Weigant, 1992; Op Den Camp et al., 1990).

Para Weigant (1992), a presença de *S. thermophilum* é essencial à produção de cogumelo. Seus estudos revelaram que o uso deste fungo no composto, como inoculante, pode reduzir o tempo de pasteurização, uma vez que o *S. thermophilum* age como promotor de crescimento.

Em *A. bisporus*, a utilização de compostos pasteurizados requer a inoculação do fungo *S. thermophilum*, podendo dobrar a produção em comparação com compostos não inoculados (Straatsma et al, 1994). Payapanon & Pitukpriwan (2005), em trabalho com composto à base de dejetos de algodão e palha de arroz, utilizado para cultivo de *Volvariella volvacea*, verificaram que, quando inoculado com fungo *S. thermophilum*, houve um aumento nos níveis de nitrogênio de 2,19% a 2,90% em comparação com composto sem inoculação em que os níveis de nitrogênio ficaram em torno de 1,4% a 2,2%, aumentando, conseqüentemente, a produção.

Acredita-se que, no final da compostagem, de 50% a 70% da biomassa do composto são constituídos por fungos termofílicos. *S. thermophilum* se apresenta como dominante, podendo atingir, na fase II, cerca de 10^6 UFCg⁻¹ composto (Manoharachary et al, 2005).

2.4.3 Fungos prejudiciais

Por se tratar de um ambiente rico em matéria orgânica e minerais, o composto desenvolve uma microbiota amplamente variada, incluindo espécies mesofílicas e termofílicas. A variação de temperatura e processos metabólicos acaba por selecionar determinados grupos. A fase II, em que ocorre a pasteurização por meio da elevação da temperatura e também da aeração

constante, tem por objetivo uma seletividade física e biológica, eliminando organismos prejudiciais e selecionando microrganismos benéficos ao processo.

Os fungos são classificados, dentre outros, como excelentes decompositores da matéria orgânica no solo. *Penicillium* e *Aspergillus* estão entre os gêneros degradadores de celuloses, taninos, cutina e outras moléculas recalcitrantes (Moreira e Siqueira, 2002).

Segundo Eira (2003), os fungos cosmopolitas são os microrganismos mais frequentemente isolados em cultivos de *A. blazei*, entretanto, ainda não foram definitivamente estabelecidos como patógenos. Muitas das contaminações se dão com os chamados mofos verdes, verdes oliva e amarelos, tais como: *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp., *Trichoderma* sp. e outros, podendo ocorrer em diferentes fase do cultivo.

Hansgate et al. (2004) relataram a presença de *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp., *Hamigera* sp. e *Neurospora* sp. em maior quantidade nos estágios iniciais de compostagem, nas primeiras 48 a 60 horas iniciais.

Espécies de *Aspergillus* têm sido relatadas como patogênicas ao cultivo de *Agaricus* sp. (Eira, 2003), porém, este fungo é um excelente produtor enzimático, principalmente de celulasas, apresenta-se termoestável à temperaturas em torno de 65°C (Ximenes, 1996).

Determinadas espécies fúngicas acometem o composto, competindo por substrato e espaço com o micélio do cogumelo. Espécies mais incidentes são *Coprinus* sp., *Chaetomium* spp. (mofo verde oliva), *Geotrichum sporendonema* (mofo rosa), *Diehliomyces microspora* (falsa trufa), *Aspergillus* sp. e *Trichoderma* sp, que agem como contaminantes e *Verticillium fungicola* e *Mycogone pernicioso*, que são patogênicos ao cogumelo (Colauto & Eira, 1998; Coutinho, 1994; Eira, 2003). Um dos objetivos da fase II é a diminuição desses microrganismos, porém, a utilização de matéria-prima de má qualidade na fase I ou más condições de pasteurização e condicionamento na fase II levam muitas

vezes, à persistência de uma ou mais dessas espécies no composto ao final da fase II.

2.5 Pragas

No Brasil, o cultivo de *A. blazei* possui baixo desenvolvimento tecnológico, com cultivo em instalações rústicas, resultando em baixa produtividade. Entre os fatores que agravam esta situação estão: incidência de pragas (moscas, ácaros e nematóides), doenças e contaminação por populações microbianas (Braga et al., 1998; Colauto & Eira, 1998; Eira, 2003).

As moscas pertencentes às famílias Phoridae, Cecidomidae e Sciaridae atacam o basidioma e promovendo deformações, prejudicando a comercialização. Já nematóides e ácaros competem no substrato, uma vez que se alimentam de matéria orgânica em decomposição, promovendo o apodrecimento do composto e o desenvolvimento de bactérias indesejáveis (Eira, 2003), além de agir também como predadores do cogumelo.

2.6 Doenças

Espécies bacterianas, como *Pseudomonas tolaasii*, acometem a camada de cobertura e causa a podridão do basidioma (Colauto & Eira, 1998; Eira, 2003; Silva, 2005). O controle destes microrganismos se dá por meio da pasteurização eficiente, de infra-estrutura adequada, da sanitização e da higiene do ambiente, bem como a desinfestação da terra de cobertura. Hábitos adequados minimizam a incidência de doenças e pragas, favorecendo a produção e a comercialização (Braga et al., 1998; Silva, 2005).

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AAGOT, N.; NYBROE, O.; NIELSEN, P.; JOHNSEN, K. An altered *Pseudomonas* diversity is recovered from soil by using nutrient-poor *Pseudomonas*-selective soil extract media. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n. 11, p. 5233-5239, Nov. 2001.
- BRAGA, G. C.; EIRA, A. F.; CELSO, P. G.; COLAUTO, N. B. **Manual do cultivo de *Agaricus blazei* Murr. “Cogumelo-do-Sol”**. Botucatu: Fundação de Estudos e Pesquisas Agrícolas e Florestais, 1998. 44 p.
- COLAUTO, N. B.; EIRA, A. F. da, Avaliação quantitativa da comunidade na camada de cobertura de *Agaricus bisporus*. **Energia na Agricultura**, Botucatu, v. 13, n. 2, p. 15-26, 1998.
- COUTINHO, L. N. **Taxonomia e controle de *Verticillium* em *Agaricus bisporus* (Lange) Singer**. 1994. 130 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, S.P.
- EIRA, A. F. da **Cultivo de cogumelo medicinal *Agaricus blazei* (murril) ss Heinemann ou *Agaricus brasiliensis* (Wasser et al.)**. Viçosa: Aprenda Fácil, 2003. 398 p.
- EIRA, A. F. da; MINHONI, M. T. A.; **Manual teórico e prático de biotecnologia e microbiologia agrícola: cultivo de cogumelos comestíveis**. Fundação de Estudos e Pesquisas Agrícolas. Botucatu, 1991. 48 p.
- FEMOR, 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, 1985. cap. 6, p. 81-109.
- FLEGG, P. B.; SPENCER, D. M.; WOOD, D. A. **The Biology and technology of the cultivated mushroom**. Chichester: John Wiley, 1985. 177 p.
- FERRI, F. I. **Funghi – la coltivazione Del prataiolo**, Bologna Edagricole, 1987. 93p..
- FUKUDA, M.; OHNO, S.; KATO, M. Genetic variation in cultivated strains of *Agaricus blazei*. **Mycoscience**, Tokyo, vol. 44, p. 431-436, 2003.

GERRITS, J. P. G. Development in composting in the Netherlands: **Mushroom Journal**, St. Paul, v. 146, n. 1, p. 45-53, 1985.

GODFREY, S. A. C.; MARSHALL, J. W.; KLENA, J. D. Genetic characterization of *Pseudomonas* 'NZI7' – a novel pathogen that results in a brown blotch disease of *Agaricus bisporus*. **Journal of Applied Microbiology**, New Zealand, v.91, n. 3, p. 412-420, Sept. 2001.

GONG, C. M.; KOICHI, I.; SHUNJI, I.; TAKASHI, S. Survival of pathogenic bacterial in compost with special reference to *Escherichia coli*. **Journal of Environmental Sciences (China)**, Beijing, v. 17, n. 5, p. 770-774, 2005.

HANSGATE, A. M.; SCHLOSS, P. D.; HAY, A. G.; WALKER, L. P. Molecular characterization of fungal community dynamics in the initial stages of composting. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 51, n. 2, p. 209-214, Jan. 2005.

HAWKSWORTH, D. L. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance and conservation. **Mycological Resource**, New York, v. 95, n. 6, p. 641-655, June 1991.

HAWKSWORTH, D. L.; KIRK, P. M.; SUTTON, B. C.; PEGLER, D. M. **Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi**. 8. ed. Egham, United Kingdom: International Micological Institute, 1995.

HOLT, J. G.; KRIFG, M. R.; SMEATH, B. H. A.; STALEY, J. T.; WILLIAMS, S. T. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9. ed. Maryland, USA: Williams & Wilkins, 1994. 428 p.

KERRIGAN, R. W. *Agaricus subrufescens*, a cultivates edible and medicinal mushroom, and its synonyms. **Mycologia**. Lawrence, v. 27, n. 1, p. 12-24, Jan./Feb. 2005.

MANOHACHARY, C.; SRIDHAR, K.; SINGH, R.; ADHOLEYA, A.; SURYANARAYANAN, T. S.; RAWAT, S.; JOHRI, B. N. Fungal biodiversity: distribution, conservation and prospecting of fungi from India. **Current Science**, Bangalore, v. 89, n. 1, p. 58-71, July 2005 . Disponível em: <<http://www.iisc.ernet.in/currsci>>. Acesso em: 12 dez 2005.

MASTER, B. L.; HOLLYER, J. R.; SULLIVAN, J. L. Composted animal manures: precautions and processing. **Animal Waste Management**, Hawaii, jul. 1998. Disponível em: <<http://www.ctahr.hawaii.edu>>. Acesso em: 14 jan. 2006.

MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 1998. 486 p.

MIYATAKE, F.; IWABUCHI, K. Effect of high compost on enzymatic activity and species diversity of culturable bacteria in cattle manure compost. **Bioresource Thechnology**, Japão, n. 96, fev. 2005. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science>>. Acesso em: 25 fev. 2005.

MIZUNO, T. Kawariharatake, *Agaricus blazei* Murril: medicinal and dietary effects. **Foods Reviews International**, Madison, v. 11, n. 1 p. 167-172, 1995.

MIZUNO, T.; INAGAKI, R.; KANNO, 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* Murril. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokio, v. 54, n. 11, p. 141-199, Nov. 1990.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: Editora UFLA, 2002. 625 p.

OP DEN CAMP, H. J. M.; STUMM, C. K.; STRAATSMA, G.; DERIKX, P. J. L.; VAN GRIENSVEN, L. J. L. D. Hyphal and mycelial interations between *Agaricus bisporus* and *Scytalidium thermophilum* on agar media. **Microbial Ecology**, New York, v. 19, n. 3, p. 303-309, May 1990.

PAYAPANON, A.; PITUKPRIWAN, P. Inoculation of *Scytalidium thermophilum* in straw mushroom compost for promoting the production of *Volvariella volvacea*. P-INCOMM-17, Disponível em: <<http://knowledge.biotec.or.th>>. Acesso em: 16 jan. 2005.

REDDY, M. S.; PATRICK, Z. A. Effect of bacteria associated with mushroom compost and casing materials on basidiomate formation in *Agaricus bisporus*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Canada, v. 12, n. 2, p. 236-242, June 1990.

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.; YANO, H.; NAKAI, Y. A. Survey of ammonia-assimilating microorganisms in cattle manure composting. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 99, n. 6, p. 1356-1363, 2005 .

SILVA, V. A. **Isolamento e identificação de bactérias presentes na camada de cobertura e avaliação da contaminação cruzada sobre o cogumelo *Agaricus blazei***. 2005. 50 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

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

STRAATSMA, G.; SAMSON, R. A.; OLIJNSMA, T. W.; OP DEN CAMP, H. J. M.; GERRITS, J. P. G.; 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**, Washington, v. 60, n. 2, p. 454-458, Feb. 1994.

STROM, P. F. Identification of thermophilic bacteria in solid-waste composting. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 50, n. 4, p. 906-913, Oct. 1985.

TOMIZAWA, M. M. **Variabilidade genética de isolados de *Agaricus blazei* baseada em marcadores RAPD e PCR-RFLP**, 2005. 91 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

TRAUTMAN, N.; OLYNCIW, E. Compost microorganism, cornell composting, Science & Engineering, Disponível em: <<file:///A:\Compost%20microorganisms.htm>>. Acesso em: 16 jan. 2006.

VIJAY, B.; SHAARMA, S. R.; VERMA, R. N.; LAKHANPAL, T. N. Role of thermophilic fungi in compost production for white button mushroom (*Agaricus bisporus*) the 3rd ICMBMP. 24p., Oct 1999.

WASSER, S. P.; DIDUKH, M. Y.; AMAZONAS, M. A. L. A.; NEVO, E.; STAMETS, P.; EIRA, A. F. Is a widely cultivated culinary-medicinal Royal sun *Agaricus* (The Himemetsutake Mushroom) indeed *Agaricus blazei* Murril. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, New York, v. 4, n. 4, p. 267-290, Oct/Dec. 2002.

WEIGANT, W. M. Growth characteristics of the thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum* in relation to production of mushroom compost

Applied and Environmental Microbiology, Wageningen, v. 58, n. 4, p. 1301-1307, Apr. 1992.

WENZEL, M.; SCHONIG, I.; BERCHTOLD, M.; KAMPFER, P.; KONIG, H. Aerobic and facultatively anaerobic cellulolytic bacteria from the gut of the termite *Zootermopsis angusticollis*. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 92, n. 1, p. 2-40, July 2001.

XIMENES, E. A.; FELIX, C. R.; ULHOA, C. J. Production of cellulases by *Aspergillus fumigatus* and characterization of one β -glucanase. **Current Microbiology**, New York, v. 32, n. 3, p.119-123, Mar. 1996.

CAPÍTULO 2

ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS PRESENTES NA FASE II DO PROCESSO DE COMPOSTAGEM PARA CULTIVO DE

Agaricus blazei

1 RESUMO

GUIMARÃES, Sandra Eliza. **Isolamento e identificação de bactérias presentes durante a fase II do processo de compostagem para cultivo de *Agaricus blazei***. 2006. 69p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.¹

Durante o processo de compostagem, diferentes grupos bacterianos termofílicos se desenvolvem no composto. Objetivando isolar e identificar estes grupos, foram feitos isolamentos, ao final da fase II de compostos com concentração de N total de 1%, 1,5% e 2% e, durante a fase II do composto, com 2% de N. Para ambos os compostos, foram feitas 5 amostragens para cada isolamento de bactérias. Foi preparada uma suspensão do composto em água peptonada 0,1%, a qual foi desintegrada em liquidificador. Foram feitas diluições seriadas e plaqueadas nas diluições 10^{-6} , 10^{-7} e 10^{-8} em meio ágar nutriente (extrato de carne 0,3%, peptona 0,5% e ágar 1,5%) em triplicata. Após 24 horas, foram feitas contagens das colônias e isolamento dos morfotipos diferentes. Os isolados foram purificados, submetidos aos testes de gram, catalase, oxidase e motilidade. Os isolados gram-negativos, foram analisados utilizando-se o kit Bac Tray I, II e III (Difco). Os isolados gram-positivos foram analisados por testes bioquímicos acrescidos do teste de esporulação e identificados quanto ao gênero. A população bacteriana não variou muito em função da concentração de N no composto, ficando entre $7,8$ e $8,2 \times 10^9$ UFC/g de composto úmido para as três concentrações testadas. Dentre os isolados gram-positivos, foram encontrados os gêneros *Bacillus* spp., em maior número, além de *Corynebacterium* spp. e *Lactobacillus* spp. Dentre as várias espécies (Gram-negativas) identificadas, foram encontradas algumas consideradas patogênicas. A espécie que teve maior ocorrência foi *Shigella dysenteriae*. Pode-se constatar que, entre todos os compostos analisados, houve maior incidência, de isolados gram-positivos.

¹ Comitê orientador: Romildo da Silva – UFLA (orientador), Eustáquio Souza Dias – UFLA

2 ABSTRACT

GUIMARÃES, Sandra Eliza. **Isolation and identification of bacteria present during fase II of the composting process for the cultivation of *Agaricus blazei***. 2006, 69p. Dissertation (Masters degree in Agricultural Microbiology– Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.¹

During the composting process, different thermophilic bacterial groups developed in the compost. With the objective of isolating and identifying these groups, isolations were done at the end of compost fase II with total N concentrations of N 1,0%; 1,5% and 2,0% and, during fase II with N at 2%. For both composts 5 samplings were taken for bacteria isolation. A suspension of the compost was prepared in 0,1% peptonizade water which was disintegrated in a blender and diluted in series. Platings at the dilution of 10^{-6} , 10^{-7} and 10^{-8} in nutrient agar medium (0,3% meat extract, 0,5% peptone and 1,5% agar) were done in triplicate. After 24 hours the counting and isolation of morphotypes was done. The isolate were purified and submitted to Gram, catalase, oxidase and mobility tests. The Gram-negative isolates were analyzed using Bac-tray I, II and III (Difco) kit. The Gram-positive were analyzed by biochemical tests, the sporulation tests and identified. The bacterial population did not varied in relation to N concentration, being between 7,8 and $8,2 \times 10^9$ CFU/g of the humid compost for the three concentrations tested. Within the Gram-positive isolates, besides *Corynebacterium* spp. and *Lactobacillus* spp. the genus *Bacillus* spp., was found. Some pathogenic bacteria were found among the Gram-negative isolates. The species with highest occurrence was *Shigella dysenteriae*. It could be observed that among all the composts analyzed there was a higher incidence of Gram-positive isolates.

¹ Orientation committee: Romildo da Silva – UFLA (advisor), Eustáquio Souza Dias - UFLA

3 INTRODUÇÃO

Com as tendências de queda no preço do cogumelo *Agaricus blazei* no mercado internacional, o produtor brasileiro precisa, de forma urgente, reduzir os custos de produção. Uma vez que a estrutura de produção utilizada no Brasil já é bastante simples, o maior potencial para a redução dos custos está no aumento da produtividade. Considerando que a tecnologia de cultivo desse cogumelo ainda é bastante empírica, vários estudos devem ser conduzidos para abordar as diferentes etapas do processo. Neste contexto, um dos pontos básicos é o desenvolvimento de uma tecnologia apropriada para a produção do composto de cultivo, sendo o isolamento e a identificação dos microrganismos presentes no processo de compostagem uma das etapas mais importantes.

Durante o processo de compostagem, diferentes grupos de microrganismos se desenvolvem no composto, tais com fungos, bactérias e actinomicetos. Esta microbiota se altera conforme as condições físicas e químicas do composto, participando de varias transformações metabólicas, resultando em um hábitat propício ao desenvolvimento do fungo.

A incidência de bactérias tem sido relatada na maioria das vezes, para o período de produção, como é o caso de *Pseudomonas tolaasii*, que causa necrose e manchas no basidioma de *Agaricus bisporus*. Porém, pouco se sabe sobre bactérias que incidem durante o período de compostagem para o cultivo de *A. blazei* (Eira, 2003; Godfrey et al., 2001). Portanto, o conhecimento da diversidade bacteriana presente no composto é de grande necessidade, pois pode vir reduzir o tempo gasto para a compostagem, evitando perdas, a fim de otimizar a produção.

Colauto & Eira (1998) citam vários autores que utilizam determinados grupos de bactérias durante a compostagem para o cultivo de *A. bisporus*.

Segundo os autores, quando inoculadas no composto ou na camada de cobertura, essas bactérias induzem primórdios precoces, propiciando um aumento na produção. Segundo o Manual Bergey de Determinação Bacteriológica (1994), a maioria das bactérias termofílicas pertence ao Gênero *Bacillus*. As bactérias que dominam a compostagem são as mesofílicas, principalmente *Flavobacterium* spp., *Pseudomonas* spp. e *Serratia marcescens*; as termotolerantes, como espécies de *Pseudomonas* e as termofílicas, como *Bacillus coagulans*, *B. steatothermophilus*, *B. subtilis* e *B. lichiniiformis* (Fermor et al., 1985).

Para melhor conhecer e desenvolver futuras alternativas para aumentar a produção de cogumelos, este trabalho objetivou isolar e identificar a população bacteriana termofílica presente nos compostos utilizados no cultivo de *A. blazei* durante a fase II da compostagem.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção do material

A pesquisa foi realizada no Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras (DBI/UFLA), em Lavras, Minas Gerais. O material para produção do composto foi obtido na região de Lavras. A seleção e o preparo do material foram feitos no mês de janeiro de 2004 e a montagem e o desenvolvimento da compostagem, nos meses de fevereiro e março de 2004. O segundo experimento foi conduzido nos meses de outubro e novembro, do mesmo ano.

4.2 Formulação dos compostos

Os compostos tradicionalmente utilizados na UFLA para o cultivo de *A. blazei*, acrescidos com três concentrações diferentes de nitrogênio, foram ajustados com, aproximadamente, 1%, 1,5% e 2% de N, sendo denominados de composto 1, 2 e 3, respectivamente. O ajuste às concentrações esperadas de nitrogênio foi feito com adição de uréia, conforme Tabelas 1 e 2.

O isolamento foi feito ao final da fase II, para os três compostos, 1, 2 e 3, simultaneamente e posteriormente, o segundo experimento feito apenas com o composto com formulação de, aproximadamente, 2% de nitrogênio, sendo este denominado composto 4 (Tabela 2), sendo os isolamentos feitos durante a fase II. Foram observadas também as condições físicas do composto: umidade e temperatura.

TABELA 1 Matérias-primas dos compostos 1, 2 e 3, com aproximadamente 1%, 1,5% e 2% de nitrogênio, considerando a matéria-seca (MS) e teores de nitrogênio (N) referentes ao primeiro isolamento.

Tratamentos	Matéria-prima															
	Bagaço de cana		Capim Coast-cross		Farelo de trigo		Calcário		Gesso agrícola		Super_ fosfato simples		Uréia		Total	
	MS (kg)	N (kg)	MS (kg)	N (kg)	MS (kg)	N (kg)	MS (kg)	N (kg)	MS (kg)	N (kg)	MS (kg)	N (kg)	MS (kg)	N (kg)	MS (kg)	TN (Kg)
Composto 1 (~1%N)	134,8	0,44	130,8	1,38	27	0,66	6	-	5,9	-	3	-	1	0,45	292,6	2,93
Composto 2 (~1,5%N)	138,7	0,46	132,9	1,41	27	0,66	6	-	5,9	-	3	-	4,4	1,98	298,6	4,51
Composto 3 (~2%N)	132,9	0,44	128,1	1,36	27	0,66	6	-	5,9	-	3	-	6,7	3,02	288,0	5,48

TABELA 2 Matérias-primas do composto 4 com, aproximadamente, 2% de nitrogênio, considerando a matéria-seca (MS) e teores de nitrogênio (N) referentes ao segundo isolamento.

Matéria-prima	Composto 4 (~2%N)	
	MS (kg)	N (kg)
Bagaço de cana	134,2	0,44
Capim coast-cross	137	1,45
Farelo de trigo	27,0	0,66
Calcário	6,0	-
Gesso agrícola	6,5	-
Super simples	3,0	-
Uréia	7,9	3,56
TOTAL	321,6	6,11

Os compostos foram montados com capim coast-cross (*Cynodon dactylon*) e bagaço de cana, revolvidos a cada dois dias e suplementados com os demais produtos após a 4ª reviragem. Esta etapa, denominada fase I, teve duração de 14 dias. Posteriormente, foram transferidos para o pasteurizador, no qual foram submetidos à pasteurização e ao condicionamento por mais 14 dias, período denominado fase II.

4.3 Condições da pasteurização

A pasteurização foi monitorada para os compostos 1, 2 e 3 ao mesmo tempo e em um único pasteurizador. Ela teve duração de 12 horas, com temperatura em torno de 62°C a 69°C, seguida do condicionamento por 13 dias, com temperaturas iniciais do condicionamento em torno de 47°C, chegando

41°C no final do processo. A umidade foi avaliada no início da fase II, quando encontrava em torno de 65% a 68%, chegando ao final em torno de 60%.

Para o composto 4, a pasteurização também teve duração de 12 horas, com temperatura em torno de 64°C a 69°C, seguida pelo condicionamento, com temperaturas em torno de 45°C, chegando a 41° no final da fase II. A umidade foi avaliada, mantendo-se nos mesmos níveis dos compostos anteriores.

4.4 Coletas das amostras

Ambas as coletas foram feitas na fase II do processo de compostagem. Para os isolamentos dos compostos 1, 2 e 3, foi feita apenas uma coleta, ao fim da pasteurização, no momento em que foi aberto o pasteurizador para a retirada do material.

Para o isolamento das bactérias do composto 4, foram feitas três coletas: no momento inicial da pasteurização, 1º dia; aos 7 dias de condicionamento e no final do condicionamento (14 dias). Foram realizadas, para cada amostra, em ambas as coletas, 5 repetições aleatórias, em diferentes pontos do composto.

4.5 Preparo das amostras e plaqueamento

Para cada repetição, foram pesado 20g de composto, aos quais foram adicionados 180mL de água peptonada 0,1%. A mistura foi desintegrada em liquidificador por 10 segundos, para promover melhor desagregação do composto e ressuspensão dos microrganismos.

Posteriormente, foram feitas diluições seriadas (10^{-6} , 10^{-7} e 10^{-8}) e plaqueadas em meio ágar nutriente (extrato de carne 0,3%, peptona 0,5% e ágar 1,5%), em triplicata.

4.6 Análise dos morfotipos e isolamento

Após 24 horas, foram feitas contagens das UFC, a caracterização morfológica das colônias dos morfotipos diferentes presentes na diluição em que a contagem prevaleceu entre 30 e 300 UFC. Os morfotipos diferentes foram isolados para posteriores análises.

4.7 Identificação das espécies bacterianas

Os isolados foram purificados e posteriormente, separado conforme teste de Gram em positivas e negativas. Foram feitos também os testes de KOH (apresentação de goma ou viscosidade em solução de KOH 3%) para confirmação do Gram, catalase em peróxido de hidrogênio (formação de gás em solução de peróxido de hidrogênio) e oxidase (N, N, N, N-tetrametil-p-fenilonodiamina 1%), para todos os isolados. Os isolados gram-negativos, foram submetidos ao kit comercial Bac Tray (Difco) I, II e III, conforme resultado do teste de oxidase, da seguinte maneira: oxidase positiva – Bactay III e oxidase negativa – Bactray I e II.

Para as bactérias Gram-positivas, foram feitos os testes de catalase e oxidase. Foram feitos também os testes de motilidade (bacto triptona 1%, cloreto de sódio 0,5% e ágar 0,5%) em que foi observada a migração das células para as regiões fora da linha de inoculação, e o teste de esporulação em caldo PCA (triptona 0,5%, extrato de levedura 0,25% e glicose 0,1%). Após 24 horas de crescimento, os isolados foram submetidos a tratamento térmico (– 80°C por 10 minutos) e, posteriormente, feita a coloração de Gram para a observação da formação de endósporos. Posteriormente, os isolados foram avaliados visando à seleção de espécies pertencentes ao Gênero *Bacillus*, o qual é relatado na literatura como o de maior incidência em compostos (Figura 1).

4.8 Análise estatística

Os resultados obtidos no primeiro isolamento, referentes aos compostos 1, 2 e 3, foram submetidos à análise estatística de variância (ANAVA), e ao teste de Tukey, a 5% de probabilidade, para avaliar a população total nos diferentes compostos, utilizando o programa SISVAR Versão 4.6 da UFLA.

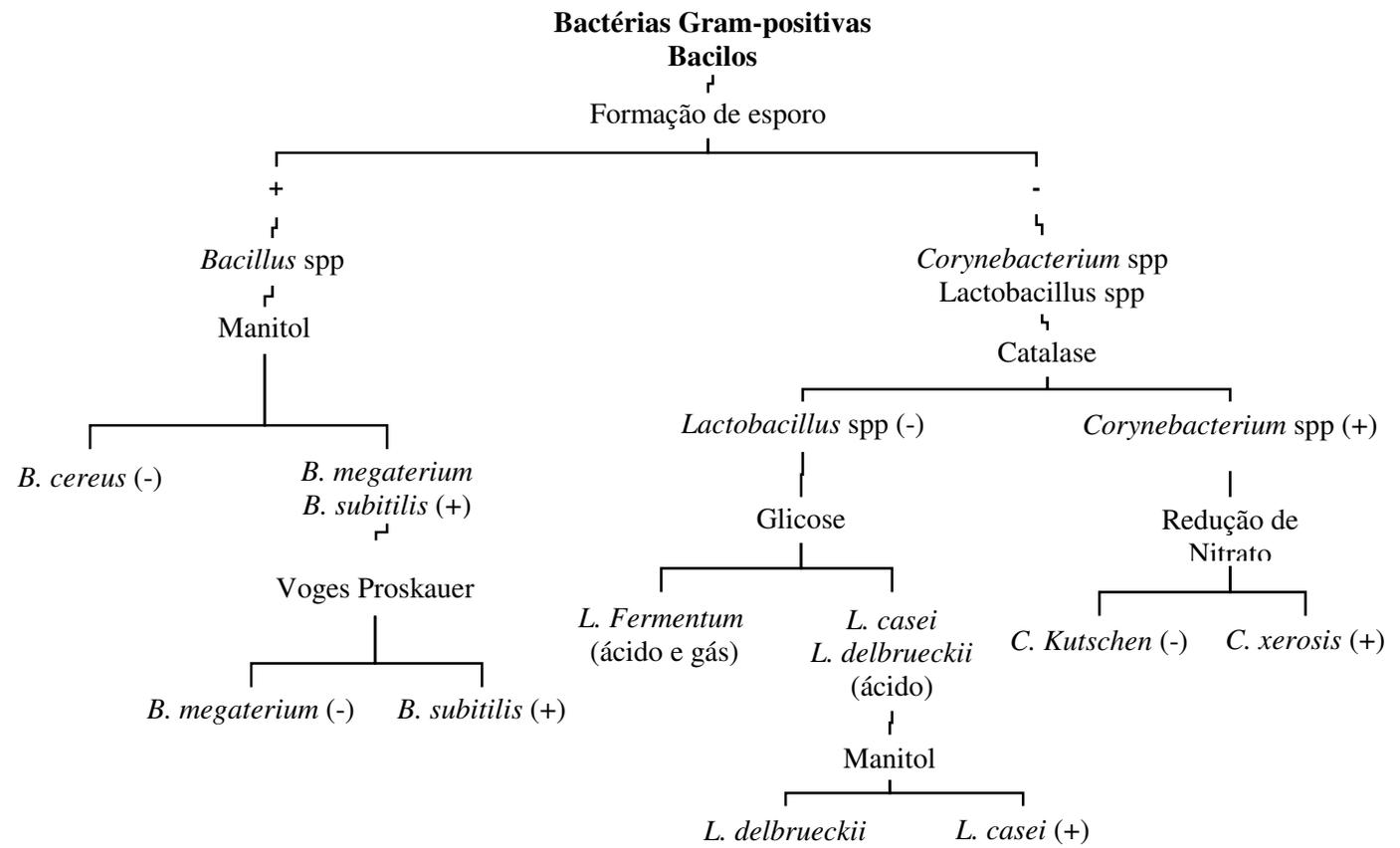


FIGURA 1 Diagrama de testes bioquímicos para separação de espécies Gram-positivas

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análise dos isolados

Foram isolados, na primeira coleta, 110 morfotipos aparentemente diferentes, sendo 50 pertencentes ao composto 1, 21 ao composto 2 e 38 ao composto 3. Destes, 60 foram identificados como gram-positivos e 50 como gram-negativos (Tabela 3). Na contagem total de UFC, foi encontrada para o composto 1, uma população média de $8,2 \times 10^{10}$, para o composto 2, $7,9 \times 10^{10}$ e, para o composto 3, uma população de $7,8 \times 10^{10}$ UFC/g de composto fresco.

Para o composto 4, foram isolados 166 morfotipos, sendo 39 pertencentes ao 1º dia de pasteurização, 37 aos 6 dias de condicionamento e 90 ao 14 dias de condicionamento (final da fase II). Destes, 97 foram identificados como gram-positivos e 69 como gram-negativos (tabela 4). Na contagem de UFC, foi encontrada uma população média de $6,1 \times 10^{10}$ no primeiro dia de pasteurização, $3,7 \times 10^{10}$ no 6º dia de condicionamento e $8,1 \times 10^{10}$ UFC/g de composto fresco ao final da fase II (14º dia).

5.1.1 Isolamento do período final da fase II

Foi encontrado, para este isolamento, um total de 60 isolados gram-positivos. O que apresentou maior número de isolados foi o composto com 1% de N (Tabela 3). Deste total, 37 se apresentaram esporulantes, sendo identificados como pertencentes ao gênero *Bacillus* spp. e o composto com 1% de N foi o que apresentou o maior número de isolados pertencentes a este gênero, cerca de 18 isolados (Figura 2). Os isolados que não apresentaram esporos (23 isolados) foram submetidos ao teste de catalase. Posteriormente à análise de catalase, os que apresentaram catalase positiva foram identificadas como pertencentes ao gênero *Corynebacterium* spp. Os que se apresentaram não

TABELA 3 Número de morfotipos isolados e contagem total de UFC dos compostos com 1% de N (C1), 1,5% de N (C2) e 2% de N (C3).

ISOLADOS	COMPOSTOS			TOTAL
	C1 (1%N)	C2 (1,5% N)	C3 (2%N)	
Gram-positivo	28	9	23	60
Gram-negativo	22	13	15	50
TOTAL	50	22	38	110
Contagem total UFC/g de composto fresco	$8,2 \times 10^{10}$	$7,9 \times 10^{10}$	$7,8 \times 10^{10}$	

TABELA 4 Número de morfotipos isolados e contagem total de UFC do composto com 2% de N (C4).

ISOLADOS	COMPOSTO 4			TOTAL
	1º dia	6º dia	14º dia	
Gram-positivo	29	19	49	97
Gram-negativo	10	18	41	69
TOTAL	39	37	90	166
Contagem total UFC/g de composto fresco	$6,1 \times 10^{11}$	$3,7 \times 10^{10}$	$8,1 \times 10^{10}$	

esporulantes e catalase negativa foram identificados como *Lactobacillus* spp.. O composto com 2% de N foi o que apresentou maior número de isolados de *Corynebacterium* sp., e o composto com 1% de N apresentou maior número de *Lactobacillus* sp. (Figura 2).

As espécies Gram-positivas de maior ocorrência são as pertencentes ao gênero *Bacillus* spp. Segundo o Manual Bergey de Determinação Bacteriológica (1994), espécies pertencentes a este gênero são resistentes às condições adversas, sendo, portanto, resistentes às variadas condições físicas e químicas ocorridas durante a compostagem. Provavelmente, isso ocorre em função da capacidade de esporulação dessas bactérias. Este grupo também é o mais abundante no solo, devido à alta disponibilidade de matéria orgânica (Moreira e Siqueira, 2002). Naturalmente os resíduos são “contaminados” por essas bactérias no contato com o solo e já vem para o pátio de compostagem com esses microrganismos

Para os gram-negativos, foram encontrados 50 isolados em todas as formulações, tendo o composto com 1% de N sido o que apresentou maior número de isolados (Tabela 3). Destes, foram identificadas 13 espécies, tendo o composto com 2% de N foi, o que apresentou maior número de isolados identificados como espécies diferentes. As espécies *Pseudomonas mendocina*, *Shigella flexiner*, *Vibrio alginolyticus* e *Vibrio cholera* foram encontradas somente no composto com 2% de N (Tabela 5).

O composto com 1,5% de N foi o que apresentou menor número de espécies identificadas, embora algumas não tenham sido. Este dado pode ser comparado com os isolados gram-positivos, em que este mesmo teor de N apresentou poucos isolados. Já para o composto com 1% de N, apesar de apresentar maior número de isolados, 5 deles não puderam ser identificados, pois não foi encontrado código referente ao kit Bactray. Porém, também

apresentou espécie distinta das demais formulações, como *Enterobacter agglomerans* (Tabela 4).

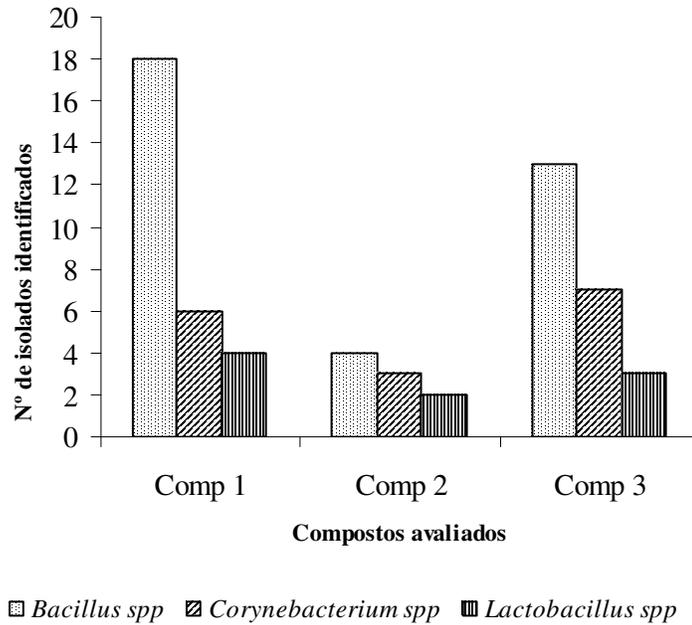


FIGURA 2 Incidência dos gêneros *Bacillus* spp., *Corynebacterium* spp. e *Lactobacillus* spp., em compostos com diferentes concentrações de N. Comp. 1: 1%, comp. 2: 1,5% e comp. 3: 2%

TABELA 5 Espécies e número de isolados identificados e não identificados referentes ao compostos com 1%, 1,5% e 2% de N do primeiro isolamento

Espécie	1º isolamento		
	C 1%N	C 1,5 %N	C 2%N
<i>Enterobacter agglomerans</i>	2		
<i>Escherichia coli</i>	1		1
<i>Flavobacterium meningosepticum</i>	2		1
<i>Flavobacterium odoratum</i>			1
<i>Pasteurella mutocida</i>		1	1
<i>Pleisomonas shigelloides</i>			1
<i>Pseudomonas mendocina</i>			1
<i>Pseudomonas vesicularis</i>	3	1	2
<i>Salmonella enterobacter</i>			1
<i>Shigella dysenteriae</i>	5	3	4
<i>Shigella flexiner</i>			1
<i>Vibrio alginoliticus</i>			1
<i>Vibrio cholera</i>			1
Não identificadas	7	5	6

5.1.2 Isolamento feito durante a fase II

Foram encontrados 97 isolados gram-positivos, sendo que a maior incidência refere-se ao período inicial da pasteurização (Tabela 4). Do total de isolados gram-positivos, 46 eram esporulantes, sendo identificados como pertencentes ao gênero *Bacillus* spp. e cuja incidência ocorreu na fase final do condicionamento. (Figura 3). Com relação ao resultado do teste de catalase, os gêneros *Corynebacterium* spp. e *Lactobacillus* spp. também foram encontrados em maior número, ao final do condicionamento (Figura 3).

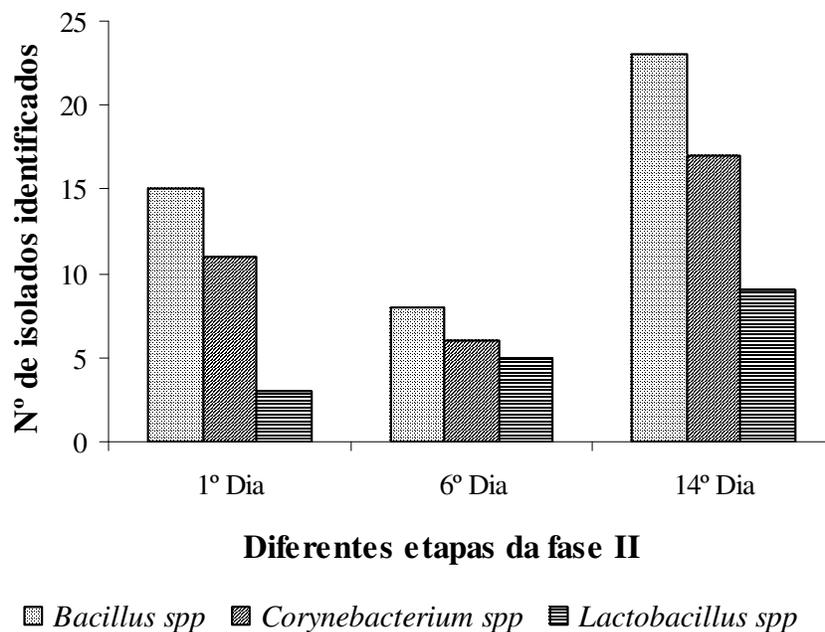


FIGURA 3 Incidência dos gêneros *Bacillus* spp., *Corynebacterium* spp. e *Lactobacillus* spp., durante a fase II da compostagem, do composto com 2% de nitrogênio

Para os isolados gram-negativos, foram encontrados 69 morfotipos, tendo a maior incidência foi no período final do condicionamento, quando há uma redução da temperatura, favorecendo, assim, o desenvolvimento de vários grupos, como é o caso de *Escherichia coli*, *Flavobacterium IIB*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas paucimobilis*, *Pseudomonas putrefaciens*, *Vibrio auginoliticus* e *Tatumella tyseo*, encontradas somente neste período (Tabela 6).

A espécie *Pleisomonas shigelloides* foi encontrada somente no início do condicionamento, porém, não se pode afirmar que ela não esteja presente nas demais etapas, uma vez que não foram identificados todos os isolados. Já as espécies *Flavobacterium meningosepticum* e *Shigella dysenteriae* foram encontradas no decorrer de toda a fase II.

A maior incidência foi de *Flavobacterium meningosepticum*, correspondendo a 25% dos isolados em todos os compostos e isolamentos (Tabela 6). As espécies *Salmonella enterobacter*, *Pseudomonas vesicularis*, *Flavobacterium odoratum*, *Pasteurella mutocida*, *Pseudomonas mendocina* e *Enterobacter agglomerans* foram encontradas apenas no primeiro isolamento. Provavelmente, isso ocorreu em função do baixo número de isolados submetidos à identificação.

A presença de espécies patogênicas, como *E. coli*, *Salmonella enterobacter*, *Vibrio cholera*, *Shigella dysenteriaeae* e outras, tem sido relatadas em compostos, porém, em composto à base de esterco animal (Master et al., 1998). No caso da *E. coli*, isolada de composto, Gong et al. (2005), observaram sua resistência a altas temperaturas, durante o processo de pasteurização. No presente trabalho, o composto foi pasteurizado a temperaturas entre 62°C a 69°C, as quais também não foram suficientes para eliminar esse grupo de bactérias.

Em ambos os compostos, as bactérias que dominam a compostagem são as mesofílicas, principalmente *Flavobacterium* spp., *Pseudomonas* spp., as termotolerantes, como espécies de *Pseudomonas* e as termofílicas, como as pertencentes ao gênero *Bacillus* Gong et al. (2005).

5.2 Estatística

Foram feitas análises estatísticas das populações para os compostos com 1%, 1,5% e 2% de N. Os resultados mostram que não houve diferenças significativas sobre a população total de bactérias entre as diferentes formulações do composto (Tabela 7).

TABELA 6 Espécies e número de isolados identificados e não identificados, referentes isolamento durante a fase II do cogumelo com 2% de N.

Espécie	2º isolamento - pasteurização		
	1º dia	6º dia	14º dia
<i>Aeromonas hydrophila</i>	1		2
<i>Acinetobacter sp</i>	1		1
<i>Escherichia coli</i>			1
<i>Flavobacterium IIB</i>			2
<i>Flavobacterium meningosepticum</i>	1	2	7
<i>Flavobacterium odoratum</i>	1		
<i>Pleisomonas shigelloides</i>		2	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			1
<i>Pseudomonas paucimobilis</i>			2
<i>P. pseudoalcaligenes</i>		1	
<i>Pseudomonas putrefaciens</i>			2
<i>Shigella dysenteriae</i>	2	4	5
<i>Shigella flexiner</i>	1		1
<i>Vibrio alginoliticus</i>			2
<i>Vibrio cholera</i>	1		1
<i>Tatumella ptyseo</i>			1
Não identificados	4	8	1

TABELA 7 Incidência de população bacteriana em compostos com 1%, 1,5% e 2% de N, com suas respectivas médias.

Tratamentos	População média (log)	População
C 1,0% de N	9,820200 a	8,2 x 10 ¹⁰
C 1,5% de N	9,917200 a	7,9 x 10 ¹⁰
C 2,0% de N	10,032800 a	7,8 x 10 ¹⁰
CV %	2,46	

Teste de Tukey, a 5% de probabilidade, SISVAR UFPA

6 CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos neste trabalho, pode-se concluir que, estatisticamente, não houve diferenças entre as populações dos compostos analisados.

Dentre os morfotipos isolados e identificados como Gram-positivos, prevaleceram espécies pertencentes ao gênero *Bacillus*.

Embora a pasteurização tenha ocorrido em temperatura entre 62°C a 69°C, consideradas elevadas para a maioria das bactérias, ela não foi suficiente para eliminar vários grupos bacterianos, inclusive de espécies potencialmente patogênicas.

Dentre os vários isolados obtidos, foram identificadas espécies que podem ter grande potencial para a sua utilização no processo de compostagem, como as dos gêneros *Bacillus*, *Flavobacterium* e *Pseudomonas*.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

COLAUTO, N. B.; EIRA, A. F. da, Avaliação quantitativa da comunidade na camada de cobertura de *Agaricus bisporus*. **Energia na Agricultura**, Botucatu, v. 13, n. 2, p. 15-26, 1998.

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

FEMOR, 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, 1985. cap. 6, p. 81-109.

GODFREY, S. A. C.; MARSHALL, J. W.; KLENA, J. D. Genetic characterization of *Pseudomonas* 'NZI7' – a novel pathogen that results in a brown blotch disease of *Agaricus bisporus*. **Journal of Applied Microbiology**, New Zealand, v.91, n. 3, p. 412-420, Sept. 2001.

GONG, C. M.; KOICHI, I.; SHUNJI, I.; TAKASHI, S. Survival of pathogenic bacterial in compost with special reference to *Escherichia coli*. **Journal of Environmental Sciences (China)**, Beijing, v. 17, n. 5, p. 770-774, 2005.

HOLT, J. G.; KRIFG, M. R.; SMEATH, B. H. A.; STALEY, J. T.; WILLIAMS, S. T. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9. ed. Maryland, USA: Williams & Wilkins, 1994. 428 p.

MASTER, B. L.; HOLLYER, J. R.; SULLIVAN, J. L. Composted animal manures: precautions and processing. **Animal Waste Management**, Hawaii, jul. 1998. Disponível em: <<http://www.ctahr.hawaii.edu>>. Acesso em: 14 jan. 2006.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: Editora UFLA, 2002. 625 p.

CAPÍTULO 3

ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS A PARTIR DE COMPOSTO PARA O CULTIVO DE *Agaricus blazei*

1 RESUMO

GUIMARÃES, Sandra Eliza. **Isolamento e identificação de fungos filamentosos a partir de composto para o cultivo de *Agaricus blazei***. 2006. 69p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.¹

A obtenção de um composto de cultivo de qualidade e eficiente ao desenvolvimento do *A. blazei* é ainda uma das necessidades para melhoria do processo tecnológico. Por se tratar de um hábitat rico em nutrientes, o composto torna-se o ambiente favorável ao desenvolvimento de microrganismos indesejáveis. Por isso, a inoculação do composto com microrganismos benéficos durante o processo de compostagem pode ser muito importante para promover uma seletividade e um equilíbrio na população microbiana do composto. Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da inoculação do fungo *Scytalidium thermophilum* sobre a população de outros fungos filamentosos em comparação ao composto não inoculado. Para avaliar o desenvolvimento do fungo *Scytalidium thermophilum*, foi utilizado um composto com concentração de N final de 2%, o qual foi inoculado com o *S. thermophilum* na concentração final de $5,5 \times 10^6$ esporos/g de composto úmido, no momento inicial da fase II e no início da fase III. Foram feitos isolamentos no início e no final do condicionamento (aos 6 e 14 dias) e no decorrer da colonização micelial do cogumelo (10 dias após a pasteurização). Os isolados foram submetidos à análise morfológica por comparação com os isolados estoque (cor, textura, crescimento) e da morfologia das estruturas reprodutivas para confirmação da espécie. Foi possível constatar uma população de $3,8 \times 10^7$ UFC/g de composto fresco aos 6 dias de pasteurização, enquanto que, após 10 dias de colonização do composto pelo *A. blazei*, a população de *S. thermophilum* foi de $1,1 \times 10^7$ e, no terceiro isolamento, $5,4 \times 10^7$ UFC/g de $6,7 \times 10^7$ UFC/g de composto. Neste último isolamento, a população encontrada não se refere ao *S. thermophilum*, conseqüentemente, não foi encontrado mais este fungo nas mesmas diluições, podendo este ter sido assimilado pelo *Agaricus blazei*. Para os fungos que foram observados contaminando os compostos foram feitos os isolamentos de compostos com formulação básica para cultivo de *A. blazei*, porém, um com a formulação tradicional 1:1 de bagaço-de-cana e os demais utilizando resíduo de algodão como matéria-prima nas concentrações de 30% e 45% de algodão. As contaminações foram isoladas dos compostos colonizados com *A. blazei* usando dois diferentes meios de cultura DG18 e MA, incubados a 25°C por 7 dias para analisar as características morfológicas. Posteriormente, foram transferidos para os meios a 25°C e 30°C e Extrato de Malte Ágar a 25°C, incubados por 7 dias para a confirmação das características dos fungos. Posteriormente, foram

analisados em chave de identificação. Foi possível encontrar, para o composto tradicional, uma população de $3,8 \times 10^7$ UFC/g de composto fresco, $5,4 \times 10^7$ UFC/g para o composto com 30% de algodão e $6,7 \times 10^7$ UFC/g de composto com 45% de algodão, diferindo estatisticamente entre si. Foram encontradas as seguintes espécies *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niveus*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus terreus*, *Emericella nidulans*, *Penicillium funiculosum* e, *Penicillium oxalicum*, tendo *A. fumigatus* sido a que mais ocorreu em ambos os compostos e o composto 2 apresentou somente as espécies *A. fumigatus*, *A. niveus* e *P. oxalicum*. O composto com 30% de algodão não diferiu dos demais compostos, porém, os compostos tradicional e com 45% de algodão foram estatisticamente diferentes na avaliação da população total.

¹ Orientation committee: Romildo da Silva – UFLA (advisor), Eustáquio Souza Dias - UFLA

2 ABSTRACT

GUIMARÃES, Sandra Eliza. **Isolation and identification of filamentous fungi from compost for the cultivation of *Agaricus blazei***. 2006, 69p. Dissertation (Masters degree in Agricultural Microbiology– Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.¹

The development of a efficient and the pool quality of compost for *Agaricus blazei* is one of the challenge for technological research. The compost is a rich substrate for microorganisms which enable different species that desirable to grow. For this reason the inoculation of the compost with beneficial microorganisms during the composting process could be very important in the promoting selectivity and balance in the microbial population of the compost. This objective a this work was, to evaluate the effect of the inoculation by the fungus *Scytalidium thermophilum* on the population of other filamentous fungi, in relation to non-inoculated compost. To evaluate the development of *S. thermophilum*, a 2,0% N compost was used which was inoculated with *S. thermophilum* at a final concentration of $5,5 \times 10^6$ spores/g of humid compost at the start of fase II and III. Isolations were done at the start and end of conditioning (at 6 and 14 days) and during the mycelial colonization of the mushroom (days after pasteurization). The isolates were submitted to morphological analysis for comparasion to standard isolates (color, texture, growth) and the morphology of reproductive structures for confirmation of species. It was possible to confirm a population of $3,8 \times 10^7$ CFU/g of fresh composts at 6 days of pasteurization for *Agaricus blazei*. The population of *S. thermophilum* was $1,1 \times 10^7$ and in the third isolation the population found did not refer to *S. thermophilum*, consequently the fungus was no longer found at the some dilutions, possibly having been assimilated by *A. blazei*. For the fungi that found contaminating the composts, isolations of the basic composts for the cultivation *A. blazei* were done on with a traditional 1:1 formulation of sugarcane husk and the other using cotton residue as row material at concentration of 30% and 45% cotton. Contaminants were isolated from the composts colonized by *A. blazei* using two different culture media mediums (Dicloran glycerol 18% - DG; Malt agar - MA) incubated at 25°C for 7 days to verified the morphological characteristics. After, they were transferred to CYA (Czapek yeast agar) medium at 25°C and 30°C and Malt Extract Agar at 25°C, incubated for 7 days for confirmation of the fungi characteristics. It was possible to find a population of $3,8 \times 10^7$ CFU/g of fresh compost, $5,4 \times 10^7$ CFU/g, for 30% cotton compost and $6,7 \times 10^7$ CFU/g for the 45% cotton compost, differing statically from each other. The following species were found *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niveus*, *Aspergillus ochraceus* *Aspergillus terreus*,

Emericella nidulans, *Penicillium funiculosum*, *Penicillium oxalicum*, *A. fumigatus* occurred in both composts. Being the *A. fumigatus* the predominant specie. Compost 2 presented the *A. fumigatus*, *A. niveus* e *P. oxalicum* species. The 30% cotton compost did not differ from the other composts, however, the traditional composts and the 45% cotton compost were statistically different in total population evaluation.

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

3 INTRODUÇÃO

O processo de compostagem propicia a sucessão de diversas populações microbianas, sendo os fungos os que apresentam maior biomassa em compostos. Determinadas espécies são de fundamental importância na realização da transformação e degradação das moléculas complexas, além de promoverem uma seletividade física e biológica do composto; outras agem como contaminantes e ou competidores, pois são organismos capazes de se desenvolverem nos mais diversos ambientes, com hábitos alimentares dos mais variados, além de suportarem condições físicas, químicas e biológicas adversas. Estes microrganismos, normalmente, crescem através do composto destruindo o micélio ou agindo como competidores por substrato e espaço, impedindo o desenvolvimento de cogumelo (Peil et al., 1996).

Dentre esses microrganismos, o fungo termofílico *Scytalidium thermophilum* é apontado, na literatura, como um dos agentes microbianos mais importantes para a obtenção de um composto apropriado para o cultivo de *Agaricus bisporus*, auxiliando o seu crescimento micelial.

Os fungos termofílicos exercem um papel importante na compostagem, promovendo melhor texturização das fibras, devido à degradação destas pelos fungos. Estudos em meio de cultura e em composto revelaram que, *S. thermophilum* favorece o crescimento micelial do cogumelo, além de suprimir competidores e auxiliar no desaparecimento da amônia (Vijay et al., 1999; Weigant, 1992; Op Den Camp et al., 1990; Straatsma et al., 1994).

Em *A. bisporus*, o uso de compostos pasteurizados necessita de inoculação do fungo, podendo dobrar a produção em comparação com compostos não inoculados (Straatsma et al., 1994). Acredita-se que no final da compostagem, cerca de 50% a 70% da biomassa do composto são constituídos

por fungos termofílicos. *S. thermophilum* é dominante, podendo atingir, na fase II, cerca de 10^6 UFC.g⁻¹ composto (Manoharachary et al., 2005).

Mesmo sabendo-se que um dos propósitos da pasteurização é propiciar o desenvolvimento de uma microbiota específica no composto e uma seletividade biológica, eliminando organismos indesejáveis, determinadas espécies de fungos, apesar de serem fungos mesofílicos são capazes de resistir à pasteurização e podem competir com o cogumelo na colonização do composto ou, no caso dos patogênicos, causar doenças.

Segundo Eira (2003), os fungos cosmopolitas são os microrganismos mais freqüentemente isolados em cultivos de *A. blazei*, entretanto, ainda não foram definitivamente estabelecidos como patógenos. Muitas das contaminações ocorrem com os chamados mofos verdes, verde-oliva e amarelos, tais como *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp., *Trichoderma* sp. e outros, podendo ocorrer em diferentes fase do cultivo.

Diante das diferentes condições em que os fungos ocorrem em compostos, este trabalho visou avaliar a persistência do *Scytalidium thermophilum* ao final da fase II da compostagem, bem como a incidência de fungos indesejáveis (contaminantes) que ocorreram em diferentes compostos utilizados para o cultivo do *Agaricus blazei*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Preparo e formulação dos compostos

Os compostos foram feitos seguindo-se a formulação básica para cultivo de *A. blazei*, sendo um com de 2% de nitrogênio (composto 1), no qual foi analisado o fungo *Scytalidium thermophilum*, outro simples, denominado composto tradicional (composto 2) com formulação de 1:1 de bagaço de cana e capim coast-cross e outros dois à base de resíduos de lixadeira de algodão, com 30% e 45% de algodão (compostos 3 e 4). Nos três últimos compostos, foram avaliadas as contaminações identificadas após a pasteurização (Tabela 1, 2, 3 e 4).

TABELA 1 Matéria-prima utilizada na formulação do composto com 2% de N, considerando-se os valores de matéria seca (MS) e teor de nitrogênio (N).

Matéria prima	MS (kg)	N (kg)
Bagaço-de-cana	125,70	0,41
Capim coast-cross	137,70	1,46
Farelo de trigo	27,00	0,66
Calcário	6,00	-
Gesso agrícola	5,90	-
Superfosfato simples	3,00	-
Uréia	7,70	3,46
Total	313,00	5,99

TABELA 2 Matéria-prima utilizada na formulação do composto tradicional (composto 2), considerando a matéria seca (MS) e o teor de nitrogênio (N).

Matéria-prima	MS (kg)	N (kg)
Bagaco de cana	425,90	1,41
Capim coast-cross	459,00	4,86
Farelo de trigo	100,00	2,43
Calcário	20,00	-
Gesso agrícola	20,00	-
Super fosfato simples	10,00	-
Uréia	1,55	0,70
Total	1.036,45	9,40

TABELA 3 Matéria-prima utilizada na formulação do composto à base de resíduo de algodão, utilizando-se 30% de algodão (composto 3), considerando a matéria seca (MS) e teor de N (N).

Matéria-prima	MS (kg)	N(kg)
Algodão	92,10	0,28
Capim coast-cross	179,30	1,90
Farelo de trigo	30,00	0,73
Calcário	6,00	-
Gesso agrícola	6,00	-
Super fosfato simples	3,00	-
Uréia	0,60	0,27
Total	317,00	3,18

TABELA 4 Matéria-prima utilizada na formulação dos compostos, à base de resíduo de algodão, com 45% de algodão (composto 4), considerando a matéria seca (MS) e teor de N (N).

Matéria-prima	MS (kg)	N(kg)
Algodão	139,60	0,42
Capim coast-cross	138,20	1,46
Farelo de trigo	30,00	0,73
Calcário	6,00	-
Gesso agrícola	6,00	-
Super fosfato simples	3,00	-
Uréia	1,30	0,59
Total	314,30	3,20

A pasteurização teve duração de 12 horas, com temperatura em torno de 65°C e foi seguida por 13 dias de condicionamento com temperatura inicial em torno de 57°C a 60°C chegando 40°C no final do processo. A umidade foi avaliada no início da fase II, apresentando-se em torno de 70% e, no final da pasteurização, estava em torno de 60%.

4.2 Inoculação do fungo *Scytalidium thermophilum* no composto 1

O fungo cedido pelo Prof. Dr. João Atílio Jorge, da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP. Foi cultivado em meio ágar Aveia (aveia 4%, Ágar 2%, enriquecido com L-sorbose 2%) por, aproximadamente, sete dias. Após a contagem dos esporos em câmara de Neubauer, foi preparada uma suspensão de células para inoculação no composto na concentração final de $5,5 \times 10^6$ esporos/g de composto úmido.

A inoculação ocorreu no momento em que foi transferido o composto para o pasteurizador e após o resfriamento, ou seja, quando o composto estava para ser ensacado.

4.3 Coletas das amostras

Para o composto 1, as amostras foram coletadas na fase II, aos 6 dias e aos 14 dias de pasteurização e ao 10 dias após a inoculação do fungo no composto com *A. blazei*. Para o composto 2, as amostras foram coletadas ao final da fase II, no qual ainda não havia sido inoculado o fungo (*Agaricus blazei*). Para os compostos 3 e 4, as coletas foram feitas aos 40 dias de colonização micelial pelo *Agaricus blazei*. Para ambos os compostos, as coletas foram realizadas em diferentes pontos do composto heterogeneamente, com 5 amostragens por coleta.

4.4 Preparo das amostras e plaqueamento

Para cada amostra, foram pesados 20g de composto, os quais foram misturados a 180mL de água peptonada 0,1% e, posteriormente, triturados em liquidificador por 10 segundos, para promover melhor desagregação.

Posteriormente, foram feitas diluições seriadas e plaqueadas as diluições 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} em meio ágar aveia (aveia 40g, ágar 20g, enriquecido com L-sorbose 20g), adicionado de cloranfenicol, para o composto 1. Para os demais compostos em meio DG-18 (glicose 8g, peptona 4g, KH_2PO_4 0,8g, MgSO_4 0,4g, glicerol 95% 185 mL, dicloran 0,1% 1 mL, cloranfenicol $10\mu\text{g/mL}$, ágar 15g e água destilada 1 L). As diluições foram plaqueadas em triplicata e as placas foram incubadas a 45°C ao composto 1 e a 25°C para os demais compostos, ambos por 7 dias.

4.5 Análise dos morfotipos e isolamento

Após 7 dias, foram feitas contagens das colônias, seguidas da caracterização morfológica e do isolamento dos morfotipos da diluição em que a contagem prevaleceu entre 30 e 300 colônias. Os morfotipos foram caracterizados e isolados conforme raiz quadrada do número total dos morfotipos iguais. Para os compostos 2, 3 e 4, após a contagem e caracterização morfológica, os morfotipos diferentes foram isolados em meio MA (extrato de malte 12g, peptona de soja 0,5g, ágar 15g e água destilada 1L), conforme a raiz quadrada do número de morfotipos iguais. Posteriormente, foram incubados por 7 dias a 25°C, para diferenciar os isolados, e reisolados em meios CYA (NaNO₃ 3g, K₂HPO₄ 1g, KCl 0,5g, MgSO₄ 7H₂O 0,5g, FeSO₄ 7H₂O 0,01g, extrato de levedura 5g, sacarose 30g, ágar 15g, água 1L, pH: 6,0 - 6,5) incubados a 25°C e a 37°C e meio MEA (extrato de malte 20g, peptona de soja 1g, glicose 20g, ágar 15g, pH:5,5), incubados a 25°C, ambos por 7 dias.

4.6 Confirmação dos isolados

Para os isolados do composto 1, foram feitas análises morfológicas por comparação com os isolados estoque (cor, textura, crescimento), e microscópica das morfologias das estruturas reprodutivas para confirmação da espécie. Para os isolados dos demais compostos, foram feitas também análises morfológicas e microscópicas, no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Ciência dos Alimentos da UFLA, seguindo-se uma ficha de identificação (Figuras 1A e 2A, anexos) para espécies pertencentes ao gênero *Aspergillus* e *Penicillium* em que foram observadas as colônias nos meios CYA 25°C, 37°C e MEA a 25°C, quanto às seguintes características: medidas de diâmetros, cor, micélio, exsudatos, reverso, pigmentação solúvel, cleistotecio e escleródios. Com relação às características microscópicas, foram observadas: estruturação (unisseriado e bisseriado), conidióforo (comprimento, largura, textura), vesícula

(diâmetro e forma), conídios (diâmetro, forma textura), cleistótecio e escleródios (diâmetro, forma cor) e ascósporos (dias de maturação, comprimento, largura, forma) (Figuras 1 e 2). Posteriormente, as características foram analisadas em guias de identificação – *Identification of Common Aspergillus Species* (Klich, 2002) e *A Laboratory Guide to Common Penicillium Species* (Pitt, 2000).

4.7 Estatística

Os resultados obtidos para os compostos 2, 3 e 4 foram submetidos à análise estatística de variância (ANAVA), ao teste de Tukey, a 5% de probabilidade, para avaliar a população nos diferentes compostos, utilizando-se o programa SISVAR versão 4.6, da UFLA.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análise da população do fungo *Scytalidium thermophilum* durante a fase II e colonização micelial pelo *Agaricus blazei* no composto 1

Ao 6 dias da fase II, foi possível contar uma população total de fungos de $3,8 \times 10^7$ UFC/g de composto fresco. Ao final da pasteurização, 14 dias, a população se encontrava em torno de $5,4 \times 10^7$. Após 10 dias de colonização do composto pelo *A. blazei*, foi observada uma população de $6,7 \times 10^7$ UFC/g de composto fresco, porém, neste último isolamento, não foram encontrados morfotipos referentes ao *Scytalidium thermophilum* (Figura 1). Portanto, nas diluições testadas, observou-se que este fungo não persistiu no composto após o término da fase II.



FIGURA 1 Fotomicrografia de conídios do *Scytalidium thermophilum* com aumento de 100x em microscópio óptico comum.

Verificou-se que, aos 6 dias da fase II, a população de *S. thermophilum* se apresentou dominante, havendo apenas 5 morfotipos diferentes de fungos filamentosos, além do *Scytalidium thermophilum* (Figura 2). Após 14 dias da fase II, foi constatada a presença de 6 morfotipos diferentes, o que pode ser atribuído à temperatura elevada durante esta fase, agindo com seletor de microrganismos e ao fato já relacionado na literatura de que o fungo *S. thermophilum* inibe o desenvolvimento de competidores.



FIGURA 2 Colônias do isolamento do fungo *Scytalidium thermophilum* na primeira coleta - início do condicionamento, aos 6 dias da fase II.

Não foi detectada a presença do *S. thermophilum* a partir do isolamento do composto colonizado com *A. blazei*, considerando as diluições 10^{-4} a 10^{-6} . Esses resultados indicam uma queda acentuada da população de *S. thermophilum* após a inoculação do composto com *A. blazei*. Essa redução pode ser explicada pela redução da temperatura do composto para 25°C a 28°C. Além disso, em composto para cultivo de *A. bisporus*, os termófilos entram em latência a 25°C e a sua biomassa é assimilada pelo *Agaricus* (Straatsma et al., 1994), sendo, provavelmente, o que ocorreu também com o *A. blazei*. De 427

colônias totais obtidas desse isolamento, verificou-se a presença de 6 morfotipos diferente de fungos. Estes resultados demonstram também que mesmo possuindo uma alta população de *S. thermophilum* ao final da fase II, o composto não fica livre de outros fungos contaminantes, ainda que poucas espécies possam aparecer.

5.2 Isolamento de fungos filamentosos a partir de compostos com diferentes formulações

Os compostos à base de algodão (compostos 3 e 4) apresentaram-se ao final II com intenso crescimento de um bolor verde na sua superfície, o qual foi posteriormente identificado como *Aspergillus fumigatus*. A região superficial do composto, mais infestada por esporos do fungo, foi descartada antes do ensacamento e inoculação com o *A. blazei*.

Na contagem total de fungos, encontrou-se para o composto tradicional (composto 2), uma população de $3,8 \times 10^7$ UFC/g de composto fresco, $5,4 \times 10^7$ UFC/g para o composto com 30% de algodão (composto 3) e $6,7 \times 10^7$ UFC/g de composto com 45% de algodão (composto 4), conforme pode ser visto na Tabela 4. Apesar das diferenças não serem significativas, observou-se uma tendência de aumento da população de fungos em função da utilização do resíduo de algodão. As espécies encontradas nos compostos estão descritas na Tabela 5. Os resultados indicam que a utilização do resíduo de lixadeira proporcionou melhores condições para o desenvolvimento do *A. fumigatus*. A análise visual desses compostos permitiu verificar também que, o resíduo de algodão, ao ser umedecido, forma placas compactadas, as quais possuem alta capacidade de retenção de água. Verificou-se também que o maior índice de infestação de *A. fumigatus* ocorreu exatamente nessas placas de algodão com umidade excessiva. Com isso, pode-se concluir que, para a utilização desse tipo de resíduo, será importante utilizar outra forma de distribuição do mesmo na pilha de compostagem. Uma boa opção poderia ser a dissolução do resíduo, o

qual é extremamente fino, na água a ser utilizada no composto, de forma a permitir uma distribuição mais uniforme do resíduo de algodão entre as fibras do capim.

As contagens totais de colônias (incluindo as 5 repetições) foram de 580 para o composto tradicional, 817 para o composto com 30% de algodão e 1.010 para o composto com 45% de resíduo de algodão. Segundo uma análise visual, o composto com 45% de algodão se apresentava com maior infestação de bolor verde, seguido pelo composto com 30% de algodão. Por outro lado, o composto tradicional não apresentou sinais visíveis de colonização por *A. fumigatus*, apesar do mesmo ter sido isolado também desse composto.

TABELA 4 Incidência de população fúngica em composto tradicional, composto com 30% e 45% de resíduo de algodão, com suas respectivas médias.

Espécie	Número de isolados por composto		
	Composto 1	Composto 2	Composto 3
<i>Aspergillus fumigatus</i>	10	5	13
<i>Aspergillus niveus</i>	4	1	4
<i>Aspergillus ochraceus</i>	2		3
<i>Aspergillus terreus</i>			3
<i>Emericella nidulans</i>	2		1
<i>Penicillium funiculosum</i>	1		
<i>Penicillium oxalicum</i>	3	1	1

TABELA 5 Número de isolados e espécies identificadas dos compostos tradicional (1), com 30% (2) e 50% (3) de resíduo de algodão.

Tratamentos	População média (Log)	População média (UFC/g de composto)
Composto tradicional	6,55200a	3,8 x 10 ⁷
Composto com 30% de algodão	6,728600 a	5,4 x 10 ⁷
Composto com 45% de algodão	6,762200 a	6,7 x 10 ⁷
CV %	2,14	

Teste de Tukey, a 5% de probabilidade, SISVAR UFLA

Considerando que, mesmo no composto tradicional, o *A. fumigatus* foi o fungo de maior incidência dentre os isolados obtidos (Figura 3), é importante que se faça um monitoramento da presença desse fungo no composto durante a colonização e, principalmente durante a frutificação do cogumelo. Além disso, é importante verificar se, além do *A. fumigatus*, fungos produtores de micotoxinas não estarão presentes nos cogumelos produzidos.

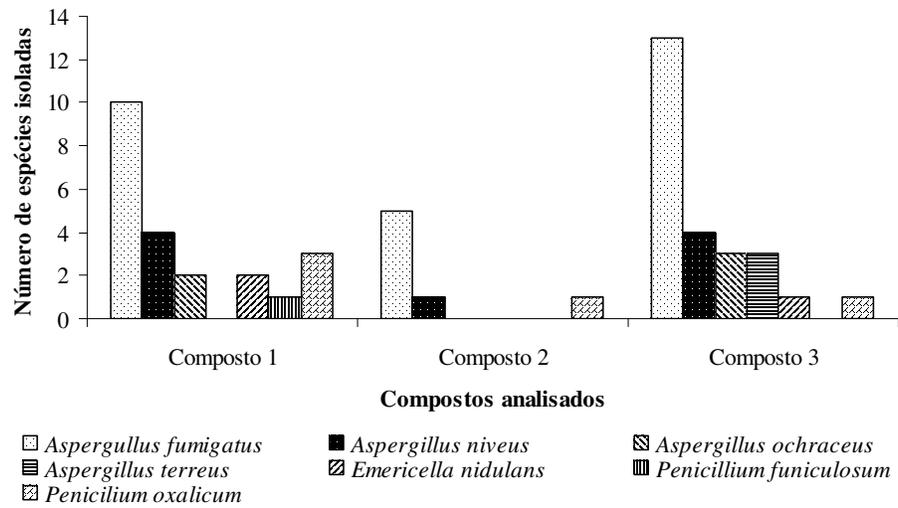


FIGURA 3 Número de isolados identificados e seus respectivos compostos

6 CONCLUSÕES

O fungo *Scytalidium thermophilum* persistiu durante a fase II da compostagem, tendo a sua população aumentada durante o processo.

Durante a colonização do composto pelo cogumelo *A. blazei*, ocorreu uma queda significativa da população de *S. thermophilum*.

A inoculação do composto com *S. thermophilum* no início e final da fase II não impediu que outras espécies de fungos estivessem presentes durante a colonização do composto com *A. blazei*.

O fungo patogênico *Aspergillus fumigatus* é encontrado normalmente no composto de cultivo do cogumelo *A. blazei* e de forma mais intensa no composto à base de resíduo de lixadeira de algodão. Considerando-se o seu potencial patogênico, devem ser tomadas medidas preventivas de contaminação por parte desse fungo.

Considerando o potencial patogênico do *A. fumigatus*, é necessário que os trabalhadores usem máscaras protetoras na montagem e reviragem das pilhas de composto.

Os cogumelos produzidos nesses compostos devem ser monitorados quanto à presença de fungos produtores de micotoxinas, além do *A. fumigatus*.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

KLICH, M. A. **Identification of common *Aspergillus* species**. Louisiana: United States Department of Agriculture, 2002. 109 p.

MANOHACHARY, C.; SRIDHAR, K.; SINGH, R.; ADHOLEYA, A.; SURYANARAYANAN, T. S.; RAWAT, S.; JOHRI, B. N. Fungal biodiversity: distribution, conservation and prospecting of fungi from India. **Current Science**, Bangalore, v. 89, n. 1, p. 58-71, July 2005. Disponível em: <<http://www.iisc.ernet.in/currsci>>. Acesso em: 12 dez 2005.

MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 1998. 486 p.

OP DEN CAMP, H. J. M.; STUMM, C. K.; STRAATSMA, G.; DERIKX, P. J. L.; VAN GRIENSVEN, L. J. L. D. Hyphal and mycelial interactions between *Agaricus bisporus* and *Scytalidium thermophilum* on agar media. **Microbial Ecology**, New York, v. 19, n. 3, p. 303-309, May 1990.

PEIL, R. M.; ROSSETO, E. A.; PIEROBOM, C. R.; ROCHA, M. T. Desinfestação de composto para cultivo de cogumelo *Agaricus bisporus* (lange) imbach, Paraná. **Revista Brasileira de Agrociencia**, Pelotas, v. 2, n. 1, p. 159-164, jul./set. 1996. Disponível em: <<http://www.ufpel.tche.br/faem/agrociencia>>. Acesso em: 5 fev. 2005.

PITT, J. I. **A laboratory guide to common *Penicillium* species**. 3. ed. Australia, 2000. 196 p.

STRAATSMA, G.; SAMSON, R. A.; OLIJNSMA, T. W.; OP DEN CAMP, H. J. M.; GERRITS, J. P. G.; 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**, Washington, v. 60, n. 2, p.454-458, Feb. 1994.

VIJAY, B.; SHAARMA, S. R.; VERMA, R. N.; LAKHANPAL, T. N. Role of thermophilic fungi in compost production for white button mushroom (*Agaricus bisporus*) the 3rd ICMBMP. 24p., Oct 1999.

WEIGANT, W. M. Growth characteristics of the thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum* in relation to production of mushroom compost **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 58, n. 4, p. 1301-1307, Apr. 1992.

ANEXOS

ANEXO A	Página
FIGURA 1A Ficha modelo para avaliação de espécies de <i>Aspergillus</i>	75
FIGURA 2A Ficha modelo para avaliação de espécies de <i>Penicillium</i>	77

FICHA DE IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE *Aspergillus*
Características microscópicas

Colônia em CYA 25°C Ø Ø Ø

Cor
Micelium
Exsudato
Reverso
Pigmentação solúvel
Cleistotécio/escleródios

Colônia em CYA 37°C Ø Ø Ø

Cor
Micelium
Exsudato
Reverso
Pigmentação solúvel
Cleistotécio/escleródios

Colônia em MEA 25°C Ø Ø Ø

Cor
Micelium
Exsudato
Reverso
Pigmentação solúvel
Cleistotécio/escleródios

Colônia em CY20S Ø Ø Ø

Cor
Micelium
Exsudato
Reverso
Pigmentação solúvel
Cleistotécio/escleródios

Características microscópicas

Unisseriado Bisseriado

Conidióforos
Comprimento
Largura
Textura

Vesícula
Diâmetro
Forma

Conídios
Diâmetro
Forma
Textura

Cleistotécio/escleródios
Diâmetro
Forma
Cor

Ascósporos
Dias de maturação
Comprimento
Largura
Forma



Identificação _____ n° _____

FIGURA 1A Ficha modelo para avaliação de espécies de *Aspergillus*

FICHA DE IDENTIFICAÇÃO DE ESPECIES DE *Penicillium*
Características microscópicas

Colônia em CYA 25°C Ø Ø Ø

Cor
Micelium
Exsudato
Reverso
Pigmentação solúvel
Cleistotécio/escleródios

Colônia em CYA 37°C Ø Ø Ø

Cor
Micelium
Exsudato
Reverso
Pigmentação solúvel
Cleistotécio/escleródios

Colônia em MEA 25°C Ø Ø Ø

Cor
Micelium
Exsudato
Reverso
Pigmentação solúvel
Cleistotécio/escleródios

Características microscópicas

Ramificação Monoverticilado Biverticilado Terverticilado/poliverticilado

Conidióforos

Comprimento
Largura
Textura

Ramificação

Comprimento
Textura

Métulas

Comprimento
Textura

Fialides

Comprimento
Textura

Conídios

Diâmetro
Forma
Textura

Cleistotécio/escleródios

Diâmetro
Forma
Cor

Ascósporos

Dias de maturação
Comprimento
Largura
Forma



Identificação _____ n° _____

FIGURA 2A Ficha-modelo para avaliação de espécies de *Penicillium*

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)