

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA
FILHO” FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

**SUBSTRATO DE CULTIVO PARA OS COGUMELOS *Pleurotus
ostreatus* E *Agaricus bisporus*: COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E
METAGENÔMICA MICROBIANA**

FABRÍCIO ROCHA VIEIRA

Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agronômicas da UNESP – Câmpus de
Botucatu, para obtenção do título de
Doutor em Agronomia (Energia na
Agricultura).

BOTUCATU – SP
Maio - 2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA
FILHO” FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

**SUBSTRATO DE CULTIVO PARA OS COGUMELOS *Pleurotus
ostreatus* E *Agaricus bisporus*: COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E
METAGENÔMICA MICROBIANA**

FABRÍCIO ROCHA VIEIRA

Orientadora: Profa. Dra. Meire Cristina Nogueira de Andrade

Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agronômicas da UNESP – Câmpus de
Botucatu, para obtenção do título de
Doutor em Agronomia (Energia na
Agricultura).

BOTUCATU – SP
Maio - 2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - DIRETORIA TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP
- FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

V658s Vieira, Fabrício Rocha, 1982-
 Substrato de cultivo para os cogumelos *Pleurotus ostreatus* e *Agaricus bisporus*: composição físico-química e metagenômica microbiana / Fabrício Rocha Vieira. - Botucatu : [s.n.], 2016
 xi, 125 f. : ils. color., grafs. color., tabs.

 Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agronômicas, Botucatu, 2016
 Orientador: Meire Cristina Nogueira de Andrade
 Inclui bibliografia

 1. Cogumelos comestíveis - Cultivo. 2. Fungos - Culturas e meios de cultura. 3. Adubos compostos. 4. Físico-química. 5. Metagenômica. I. Andrade, Meire Cristina Nogueira de. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Câmpus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agronômicas. III. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: SUBSTRATO DE CULTIVO PARA OS COGUMELOS *Pleurotus ostreatus* e *Agaricus bisporus*: COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E METAGENÔMICA MICROBIANA

AUTOR: FABRICIO ROCHA VIEIRA

ORIENTADORA: MEIRE CRISTINA NOGUEIRA DE ANDRADE

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em AGRONOMIA (ENERGIA NA AGRICULTURA), pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. MEIRE CRISTINA NOGUEIRA DE ANDRADE
Centro de Ciências Exatas e Sociais Aplicadas / Universidade do Sagrado Coração



Prof. Dr. EDUARDO BAGAGLI
Departamento de Microbiologia e Imunologia / Instituto de Biociências de Botucatu



Profa. Dra. ADRIANA ZANIN KRONKA
Dep de Produção e Melhoramento Vegetal / Faculdade de Ciências Agrônomicas - UNESP



Prof. Dr. EDSON LUIZ FURTADO
Dep de Proteção Vegetal / Faculdade de Ciências Agrônomicas - UNESP



Profa. Dra. GEYSIANY MARIA DE QUEIROZ-FERNANDES
Centro de Saúde / Universidade do Sagrado Coração

Botucatu, 20 de maio de 2016.

DEDICO

A todos aqueles que possam usufruir dos resultados obtidos nesta pesquisa.

E por último, aos fungos...

AGRADECIMENTOS

Às Professoras Marli Teixeira de Almeida Minhoni e Meire Cristina Nogueira de Andrade pela amizade, orientação, e paciência durante o curso de doutorado e a realização deste trabalho.

Ao Professor John Pecchia pela colaboração nos ensaios moleculares e orientações.

Aos responsáveis pelo Programa de Pós-Graduação Energia na Agricultura FCA/UNESP, pela oportunidade de realização deste projeto de pesquisa e auxílio financeiro constante para a realização do trabalho, em especial ao Professor Dr. Adriano Wagner Ballarin.

Aos funcionários do Módulo de Cogumelos, José Antônio Fogaça, Ivandro Roberto Fogaça, pelo auxílio constante durante os experimentos.

À técnica de laboratório, Maria de Fátima Almeida Silva do Departamento de Produção Vegetal – FCA/UNESP pelo auxílio durante os experimentos.

Aos estagiários de graduação, em especial à Dennis Riyuti Nakacima pelo apoio nas atividades de campo deste trabalho.

A todos os funcionários da Fazenda Lageado da FCA/UNESP, que colaboraram na aquisição e transporte de materiais.

Aos funcionários da biblioteca da FCA, pelos importantes serviços prestados.

Aos colegas de Pós-Graduação, e a todos que de alguma forma contribuíram com a realização deste trabalho.

Às funcionárias da Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Agrônômicas da UNESP – Botucatu, pela paciência, consideração e apoio recebido.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa (DS) de estudo concedida para a concretização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	VII
LISTA DE FIGURAS	VIII
1 RESUMO	1
2 SUMMARY	3
3 INTRODUÇÃO GERAL	5
4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
4.1 Histórico de cultivo e consumo de cogumelos	6
4.2 Cogumelos no Brasil	7
4.3 A espécie <i>Pleurotus ostreatus</i>	9
4.4 A espécie <i>Agaricus bisporus</i>	10
4.5 Produção de cogumelos no Brasil e no mundo	11
4.6 Características de crescimento do cogumelo ostra e champignon em relação ao substrato de cultivo	12
4.7 Métodos de preparo do substrato de cultivo para cogumelos	14
4.8 Compostagem como método de preparação do substrato de cultivo	15
4.9 Aspectos gerais da ecologia microbiana da compostagem	17
4.10 Abordagens utilizadas para estimar comunidades microbianas	19
4.11 Características físico-químicas do substrato de cultivo para cogumelos	22
CAPÍTULO I	24
Resumo	24
Abstract	25
Introdução	26
Material e métodos	27
Resultados	31
Discussão	32
Conclusões	34
Referências	35
CAPÍTULO II	46
Resumo	46
Abstract	47
Introdução	48

Material e métodos.....	50
Resultados	56
Discussão	57
Conclusões	59
Referências.....	59
CAPÍTULO III.....	79
Resumo	79
Abstract	80
Introdução	81
Material e métodos.....	83
Resultados	88
Discussão	90
Conclusões	92
Referências.....	93
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	111
6 CONCLUSÕES GERAIS	112
7 REFERÊNCIAS GERAIS	113

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I - TEMPO DE COMPOSTAGEM (FASES I E II) E EFEITO NAS VARIÁVEIS FÍSICO-QUÍMICAS DO SUBSTRATO DE CULTIVO E NA PRODUÇÃO DO COGUMELO OSTRAL (*Pleurotus ostreatus*)

Tabela 1. Formulação do substrato para o cultivo do cogumelo ostra (*Pleurotus ostreatus*) 39

Tabela 2. Produtividade e número de cachos de *Pleurotus ostreatus* cultivado em substratos com 7 e 14 dias de fase I com ou sem condicionamento (fase II) 40

CAPÍTULO II – METAGENÔMICA DA COMUNIDADE MICROBIANA, VARIÁVEIS FÍSICO-QUÍMICAS E PRODUTIVIDADE DO COGUMELO OSTRAL (*Pleurotus ostreatus*) EM DIFERENTES TEMPOS DE COMPOSTAGEM (FASE I)

Tabela 1. Formulação do substrato para o cultivo do cogumelo ostra (*Pleurotus ostreatus*) 66

CAPÍTULO III - METAGENÔMICA DA COMUNIDADE MICROBIANA EM DIFERENTES SITUAÇÕES DE PASTEURIZAÇÃO (TEMPO/TEMPERATURA) DO COMPOSTO PARA O CULTIVO DO COGUMELO *Agaricus bisporus*

Tabela 1. Fórmula padrão do composto utilizado no Mushroom Research Center (MRC) para o cultivo de *Agaricus bisporus* 98

Tabela 2. Identificação e pontos amostrados durante a compostagem (Fases I e II). 99

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1. Produção mundial de cogumelos nos últimos 20 anos (período de 1993 - 2013); dados compilados pelo autor do site da FAOSTAT (FAOSTAT, 2014)..... 11

CAPÍTULO I - TEMPO DE COMPOSTAGEM (FASES I E II) E EFEITO NAS VARIÁVEIS FÍSICO-QUÍMICAS DO SUBSTRATO DE CULTIVO E NA PRODUÇÃO DO COGUMELO OSTRÁ (*Pleurotus ostreatus*)

Figura 1. Procedimentos e tempos da compostagem (fase I com 7 e 14 dias e fase II com ou sem condicionamento). Substratos: 7 D SC – sete dias de compostagem (fase I) sem condicionamento; 7 D CC – sete dias de compostagem (fase I) com condicionamento; 14 D SC – quatorze dias de compostagem (fase I) sem condicionamento e; 14 D CC – quatorze dias de compostagem (fase I) com condicionamento. 41

Figura 2. Temperatura do ar, temperatura do substrate e umidade do ar na estufa de produção durante o período de produção do experimento 42

Figura 3. Variáveis físico-químicas do substrato durante a compostagem (fases I e II), **A** – teor de matéria orgânica (base seca); **B** – relação C/N; **C** - pH; **D** – energia bruta (calorias g⁻¹, base seca); **E** – açúcares solúveis (base seca); 7 D – fase I curta, sete dias; 14 D - fase I longa, quatorze dias 43

Figura 4. Temperatura das leiras de compostagem durante a fase I com o pico de aquecimento indicado na parte superior do gráfico e na parte inferior do gráfico, o início da compostagem (7 D – sete dias de compostagem; 14 D quatorze dias de compostagem). 44

Figura 5. Produção acumulada (precocidade) em função de diferentes tempos da compostagem (fases I e II); 7 DSC – sete dias de compostagem na fase I sem condicionamento; 7 DCC – sete dias de compostagem na fase I com condicionamento; 14 DSC – quatorze dias de compostagem na fase I sem condicionamento e; 14 DCC – quatorze dias de compostagem na fase I com condicionamento. 45

CAPÍTULO II – METAGENÔMICA DA COMUNIDADE MICROBIANA, VARIÁVEIS FÍSICO-QUÍMICAS E PRODUTIVIDADE DO COGUMELO OSTRÁ (*Pleurotus ostreatus*) EM DIFERENTES TEMPOS DE COMPOSTAGEM (FASE I)

Figura 1. Procedimentos e tempos da compostagem (fases I e II). Substratos: 5 D – cinco dias de compostagem (fase I); 10 D – dez dias de compostagem (fase I); 15 D – quinze dias de compostagem (fase I) 67

Figura 2. Temperatura e umidade relativa do ar durante o ciclo produtivo (ciclo produtivo de 56 dias) 68

Figura 3. Temperatura da compostagem durante as fases I e II e os pontos amostrados para as análises físico-químicas e da comunidade microbiana. 1 – início da compostagem; 2, 3 e 4 final da compostagem (fase I) para os tempos de 5, 10 e 15 dias, respectivamente 69

Figura 4. Abundância relativa dos filos bacterianos na fase I de compostagem. D0 – início da compostagem; D5 – cinco dias de compostagem; D10 – dez dias de compostagem; D15 – quinze dias de compostagem. 70

Figura 5. Abundância relativa dos vinte gêneros predominantes na fase I de compostagem. D0 – início da compostagem; D5 – cinco dias de compostagem; D10 – dez dias de compostagem; D15 – quinze dias de compostagem. 71

Figura 6. Distribuição dos gêneros bacterianos na fase I da compostagem. D0 – início da compostagem; D5 – cinco dias de compostagem; D10 – dez dias de compostagem; D15 – quinze dias de compostagem. 72

Figura 7. Abundância relativa dos filos fúngicos na fase I da compostagem. D0 – início da compostagem; D5 – cinco dias de compostagem; D10 – dez dias de compostagem; D15 – quinze dias de compostagem. 73

Figura 8. Abundância relativa dos dez gêneros fúngicos predominantes na fase I da compostagem. D0 – início da compostagem; D5 – cinco dias de compostagem; D10 – dez dias de compostagem; D15 – quinze dias de compostagem. 74

Figura 9. Distribuição dos gêneros fúngicos na fase I da compostagem. D0 – início da compostagem; D5 – cinco dias de compostagem; D10 – dez dias de compostagem; D15 – quinze dias de compostagem. 75

Figura 10. Perda de carbono e nitrogênio na fase I de compostagem. A dinâmica da relação C/N, energia bruta (calorias por grama), açúcares solúveis e de matéria orgânica; **A** - relação C/N e energia bruta (peso seco); **B** - açúcares solúveis e matéria orgânica (expressa em percentagem de matéria seca).. 76

Figura 11. Teores relativos de celulose, hemicelulose e lignina na fase I da compostagem. 0D – início da compostagem; 5D - cinco dias de compostagem; 10D - 10 dias de compostagem; 15D - 15 dias de compostagem..... 77

Figura 12. Produtividade e número de cachos de *Pleurotus ostreatus* cultivado em diferentes substratos. **A** – produtividade nos substratos obtidos a partir 5, 10 e 15 dias da fase I e duas linhagens de *Pleurotus ostreatus* (POS 09/101 e POS 13/113); **B** - número de cachos nos substratos obtidos a partir 5, 10 e 15 dias da fase I e duas linhagens de *Pleurotus ostreatus* (POS 09/101 e POS 13/113). 78

CAPÍTULO III - METAGÊNOMICA DA COMUNIDADE MICROBIANA EM DIFERENTES SITUAÇÕES DE PASTEURIZAÇÃO (TEMPO/TEMPERATURA) DO COMPOSTO PARA O CULTIVO DO COGUMELO *Agaricus bisporus*

Figura 1. Ilustração das diferentes situações de pasteurização durante a fase II de compostagem, P1 – 57°C/6h; P2 – 60°C/2h e 68°C/2h..... 100

Figura 2. Ilustração dos biorreatores utilizados para simular a fase II de compostagem 101

Figura 3. Abundância relativa dos filos bacterianos durante o processo de compostagem (fases I e II). D0 – início da compostagem; D6 – final da fase I; P57°C – pasteurização a 57°C por 6 horas; P60°C – pasteurização a 60°C por 2 horas; P68°C – pasteurização a

68°C por 2 horas; C57°C – condicionamento a 47°C por 5 dias do composto pasteurizado a 57°C por 6 horas; C60°C - condicionamento a 47°C por 5 dias do composto pasteurizado a 60°C por 2 horas; C68°C - condicionamento a 47°C por 5 dias do composto pasteurizado a 68°C por 2 horas. 102

Figura 4. Abundância relativa dos gêneros bacterianos durante o processo de compostagem, fases I e II (os 10 mais abundantes gêneros foram plotados acima e os demais estão inseridos na categoria outros). D0 – início da compostagem; D6 – final da fase I; P57°C – pasteurização a 57°C por 6 horas; P60°C – pasteurização a 60°C por 2 horas; P68°C – pasteurização a 68°C por 2 horas; C57°C – condicionamento a 47°C por 5 dias do composto pasteurizado a 57°C por 6 horas; C60°C - condicionamento a 47°C por 5 dias do composto pasteurizado a 60°C por 2 horas; C68°C - condicionamento a 47°C por 5 dias do composto pasteurizado a 68°C por 2 horas. 103

Figura 5. Distribuição dos gêneros bacterianos durante o processo de compostagem (fases I e II). D0 – início da compostagem; D6 – final da fase I; P57°C – pasteurização a 57°C por 6 horas; P60°C – pasteurização a 60°C por 2 horas; P68°C – pasteurização a 68°C por 2 horas; C57°C – condicionamento a 47°C por 5 dias do composto pasteurizado a 57°C por 6 horas; C60°C - condicionamento a 47°C por 5 dias do composto pasteurizado a 60°C por 2 horas; C68°C - condicionamento a 47°C por 5 dias do composto pasteurizado a 68°C por 2 horas. 104

Figura 6. Abundância relativa dos filos fúngicos durante o processo de compostagem (fases I e II). D0 – início da compostagem; D6 – final da fase I; P57°C – pasteurização a 57°C por 6 horas; P60°C – pasteurização a 60°C por 2 horas; P68°C – pasteurização a 68°C por 2 horas; C57°C – condicionamento a 47°C por 5 dias do composto pasteurizado a 57°C por 6 horas; C60°C - condicionamento a 47°C por 5 dias do composto pasteurizado a 60°C por 2 horas; C68°C - condicionamento a 47°C por 5 dias do composto pasteurizado a 68°C por 2 horas. 105

Figura 7. Abundância relativa dos dez predominantes gêneros fúngicos durante o processo de compostagem (fases I e II). D0 – início da compostagem; D6 – final da fase I; P57°C – pasteurização a 57°C por 6 horas; P60°C – pasteurização a 60°C por 2 horas; P68°C – pasteurização a 68°C por 2 horas; C57°C – condicionamento a 47°C por 5 dias do composto pasteurizado a 57°C por 6 horas; C60°C - condicionamento a 47°C por 5 dias do composto pasteurizado a 60°C por 2 horas; C68°C - condicionamento a 47°C por 5 dias do composto pasteurizado a 68°C por 2 horas. 106

Figura 8. Distribuição dos gêneros fúngicos durante o processo de compostagem (fases I e II). D0 – início da compostagem; D6 – final da fase I; P57°C – pasteurização a 57°C por 6 horas; P60°C – pasteurização a 60°C por 2 horas; P68°C – pasteurização a 68°C por 2 horas; C57°C – condicionamento a 47°C por 5 dias do composto pasteurizado a 57°C por 6 horas; C60°C - condicionamento a 47°C por 5 dias do composto pasteurizado a 60°C por 2 horas; C68°C - condicionamento a 47°C por 5 dias do composto pasteurizado a 68°C por 2 horas. 107

Figura 9. Emissão de NH₃ pós pasteurização e pós condicionamento do composto em condições experimentais (biorreatores). 108

Figura 10. Porcentagem de sólidos totais e matéria orgânica do composto (base seca) durante as fases I e II de compostagem. D0 – início da compostagem; D6 – final da fase I; Pc1 - condicionamento a 47°C por 5 dias do composto pasteurizado a 57°C por 6 horas; Pc2 - condicionamento a 47°C por 5 dias do composto pasteurizado a 60°C por 2 horas; Pc3 - condicionamento a 47°C por 5 dias do composto pasteurizado a 68°C por 2 horas. 109

Figura 11. Porcentagem de carbono (C), nitrogênio (N) e relação C/N do composto durante as fases I e II da compostagem (base seca). D0 – início da compostagem; D6 – final da fase I; Pc1 - condicionamento a 47°C por 5 dias do composto pasteurizado a 57°C por 6 horas; Pc2 - condicionamento a 47°C por 5 dias do composto pasteurizado a 60°C por 2 horas; Pc3 - condicionamento a 47°C por 5 dias do composto pasteurizado a 68°C por 2 horas. 110

1 RESUMO

Entre os cogumelos cultivados comercialmente, destacam-se o *Agaricus bisporus* e *Pleurotus ostreatus* (cogumelo ostra). A preparação do substrato de cultivo é a etapa mais crítica da produção, determinante para a produtividade e custos de produção. O método de preparo do substrato mais utilizado pela indústria de cogumelos é a compostagem curta, seguida de pasteurização e condicionamento. Como ponto chave da compostagem, a comunidade microbiana tem papel fundamental no processo, conferindo seletividade final do substrato de cultivo e, conseqüentemente, a produtividade. Desta forma, avaliou-se, o manejo da compostagem (tempo de compostagem e temperatura de pasteurização) e o efeito sob a comunidade microbiana, composição final do substrato e produtividade de cogumelos. Para isto, foram realizados três experimentos. Nos experimentos 1 e 2, avaliou-se a influência do tempo de compostagem (fases I e II), a comunidade microbiana (bactérias e fungos), variáveis físico-químicas, produtividade, número de cachos e precocidade do cogumelo *P. ostreatus*. Os resultados obtidos mostraram que o manejo da compostagem influenciou a comunidade microbiana e, conseqüentemente, a seletividade final do substrato de cultivo, com reflexos na produtividade e número de cachos. A comunidade microbiana apresentou menor diversidade na compostagem com menor duração e, menor perda de carbono, nitrogênio e açúcares solúveis, resultando em substrato mais seletivo ao cogumelo *P. ostreatus*, demonstrando melhores resultados de produtividade. No experimento 3, avaliaram-se, a comunidade microbiana e indicadores químicos do composto final, em diferentes situações de pasteurização durante a preparação do substrato para o cultivo do cogumelo *A. bisporus*. Para isto, foram simuladas em

biorreatores três diferentes situações de pasteurização (57°C por 6 horas, 60°C por 2 horas e 68°C por 2 horas). O sequenciamento da comunidade microbiana revelou a predominância dos filos Proteobacteria e Firmicutes durante as fases I e II de compostagem, respectivamente. Os gêneros bacterianos mais abundantes foram *Pseudomonas* e *Thermobifida*, durante a fase I, e *Ureibacillus*, *Luteimonas*, *Truepera*, *Pseudoxanthomonas*, *Clostridium* e *Paenebacillus*, durante a fase II. A comunidade fúngica foi composta predominantemente por indivíduos do filo Ascomycota, com maior abundância dos gêneros *Thermomyces* e *Scedosporium*, durante a fase I, e *Thermomyces* e *Mycothermus*, durante a fase II. O composto submetido à pasteurização a 60°C por 2 horas apresentou maior redução no teor de matéria orgânica, sólidos totais e relação C/N. Por outro lado, o composto pasteurizado a 68°C apresentou menor teor de nitrogênio, consequência da maior emissão de NH₃ durante a fase II. Por último, a modernização dos cultivos de cogumelos requer continuidade das pesquisas envolvendo a ecologia microbiana da compostagem, com foco no papel funcional destes microrganismos, auxiliando na tomada de decisão sobre o manejo da compostagem.

Palavras chave: *Pleurotus ostreatus*, *Agaricus bisporus*, compostagem, composição físico-química e metagenômica.

SUBSTRATE FOR CULTIVATION *Pleurotus ostreatus* AND *Agaricus bisporus*:
PHYSICOCHEMICAL COMPOSITION AND MICROBIAL METAGENOMICS.
Botucatu, 2016. 125p. Tese (Doutorado em Agronomia/Energia na Agricultura) Faculdade
de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista.

Author: FABRÍCIO ROCHA VIEIRA

Adviser: Meire Cristina Nogueira de Andrade

SUMMARY

Among many commercial mushrooms cultivated, *Agaricus bisporus* and *Pleurotus ostreatus* (oyster mushroom) are the most important for mushroom industry. The cultivation substrate preparation is the most critical step in mushroom production, determining productivity and production costs. The substrate preparation method most used by mushroom industry is short composting, followed by pasteurization and conditioning. As key point of composting, microbial community plays an important role during the process, determining final substrate selectivity and mushroom yield. Thus, aimed evaluate the influence of composting management (composting time and pasteurization temperature) in microbial community, final substrate composition and mushroom yield. For this, were conducted three experiments. In experiments 1 and 2 were evaluated the influence of composting time (phases I and II), microbial community (bacteria and fungi), physicochemical variables and *P. ostreatus* yield. The results showed that composting management (time of phases I and II) influenced the microbial community, substrate selectivity and consequently mushroom yield and number of cluster.

The microbial community showed less diversity in composting with shorter duration, as well as the losses of carbon, nitrogen and soluble sugars, showing higher selectivity of substrate for *P. ostreatus*, as observed in yield results. In experiment 3, we evaluated the microbial community (bacteria and fungi) and some physicochemical variables in different pasteurization conditions during substrate preparation for *A. bisporus* cultivation. We simulated in bioreactors three different pasteurization conditions (57°C for 6 hours, 60°C for 2 hours and 68°C for 2 hours). The sequencing of microbial community revealed the predominance of phyla Proteobacteria and Firmicutes during phase I and II composting, respectively. The most abundant bacterial genera were *Pseudomonas* and *Thermobifida* during phase I and *Ureibacillus*, *Luteimonas*, *Truepera*, *Pseudoxanthomonas*, *Clostridium* and *Paenebacillus* during phase II. Fungal community was predominantly composed by Ascomycota phylum, with higher abundance of *Thermomyces* and *Scedosporium* genera during phase I and *Thermomyces* and *Mycothermus* during phase II. The compost pasteurized at 60°C for 2 hours showed the highest reduction in organic matter content, total solids, and C/N ratio. Moreover, the compost pasteurized at 68°C showed lower nitrogen content, a consequence of higher emission of NH₃ during phase II. At last, modernization of mushroom cultivation system requires further study involving microbial ecology and focus on functional role of these microorganisms during the composting process, assisting in decision-making on composting management.

Keywords: *Pleurotus ostreatus*, *Agaricus bisporus*, composting, physicochemical composition and metagenomics.

3 INTRODUÇÃO GERAL

A crescente demanda mundial por alimentos vem chamando a atenção para o aumento e diversificação da produção. Neste contexto, as ferramentas biológicas com base na biotecnologia industrial têm focado atenção nos processos biológicos para o desenvolvimento das chamadas “tecnologias limpas”, com ênfase na máxima produção, redução na geração de resíduos e conversão de resíduos numa forma útil para o homem. Entre estas ferramentas, os fungos, em especial os cogumelos, são extremamente eficientes em converter biomassa vegetal (subprodutos agrícolas) em proteína utilizável pelo homem e animais.

O *Agaricus bisporus* e *Pleurotus ostreatus* são os cogumelos mais produzidos em escala industrial, através de uma massiva e sofisticada operação de preparo do substrato de cultivo e posteriores fases de cultivo em ambientes controlados, principalmente nos países europeus, da América do Norte e asiáticos. O cultivo de cogumelos no Brasil, se comparado com estes países, é recente, tendo se iniciado com a chegada de imigrantes asiáticos e europeus na década de 50, os quais desenvolveram os primeiros cultivos no estado de São Paulo.

A preparação do substrato de cultivo é o ponto chave da produção de cogumelos, influenciando diretamente a produtividade e os custos de produção. Entre os métodos de preparo do substrato, a compostagem curta, seguida de pasteurização e condicionamento, também conhecida como compostagem fase I e II, é largamente utilizada pela indústria mundial de cogumelos. Com a modernização dos cultivos, a indústria de cogumelos e as pesquisas têm focado esforços para o aprimoramento do manejo da

compostagem, visando o aumento da produtividade e controle de pragas e doenças além da redução de custos.

A compostagem tem como componente principal a ação de microrganismos, que, através da digestão enzimática, preparam os nutrientes para o cogumelo a ser cultivado (fase I), além da seletividade do substrato durante a fase II. Este processo é dinâmico e complexo, envolvendo uma comunidade microbiana que ainda carece de estudos para o entendimento de seu papel durante o processo.

Nos últimos anos, os avanços em biologia molecular expandiram as fronteiras dos estudos em ecologia microbiana. Entre estes avanços, a metagenômica da comunidade microbiana revelou-se uma promissora ferramenta para estudos de diversidade taxonômica e funcional em ambientes microbianos complexos.

Neste sentido, os objetivos deste trabalho foram: 1. avaliar a influência do tempo de compostagem (fases I e II), a comunidade microbiana (utilizando a metagenômica como ferramenta), as variáveis físico-químicas do substrato na produtividade do cogumelo ostra; 2. avaliar a comunidade microbiana (metagenômica) e a composição química final do substrato de cultivo em diferentes situações da fase II de compostagem (tempo e temperatura de pasteurização) para o cultivo do cogumelo *A. bisporus*. Por último, contribuir para o aperfeiçoamento do manejo da compostagem e modernização dos cultivos de cogumelos.

4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 Histórico de cultivo e consumo de cogumelos

Desenhos rupestres em cavernas revelam que os cogumelos fazem parte do cotidiano do homem há muito tempo, desde a era pré-histórica. Nesta época, os cogumelos eram colhidos na natureza e utilizados como alimento e para fins medicinais (ALEXOPOULUS et al., 1996; CHANG; MILES, 2004).

A partir da civilização grega e romana, os cogumelos e outras variedades de fungos tiveram maior participação na dieta humana, especialmente com *Aegerita agrocybe* coletado em troncos de choupos, além das trufas, cogumelo subterrâneo considerado iguaria até hoje (TOUSSAINT-SAMAT, 1992; SAMSON et al., 1995).

O cultivo propriamente dito iniciou-se no século VI, quando *Auricularia auricula* foi cultivado na China em toras de madeira. Outros cogumelos crescidos na madeira em decomposição, como *Flammulina velutipes* e *Lentinula edodes*, foram cultivados de forma semelhante no Japão (CHANG; MILES, 2004). O maior avanço no cultivo de cogumelos ocorreu na França, por volta de 1600, quando *Agaricus bisporus*, popularmente conhecido como champignon de paris, foi casualmente encontrado junto à mistura de palha e esterco, utilizada como cama para o cultivo de melões. Posteriormente, na França, Inglaterra e Alemanha, iniciaram-se os estudos e os primeiros cultivos (BELS-KONING; BELS, 1958; VAN GRIENSVEN, 1988). Desde então, a popularidade do champignon aumentou de forma constante, sendo atualmente o cogumelo mais pesquisado e produzido no mundo (ROYSE, 2013; FAOSTAT, 2014).

Curiosamente, os primeiros cultivos em modo industrial do *Pleurotus ostreatus* também ocorreram na Europa, mais precisamente na Alemanha, por volta de 1900. O cogumelo ostra, como é popularmente conhecido, teve importante participação frente à escassez de alimento durante o período da primeira guerra mundial (KAUFERT, 1936; EGER et al., 1976).

4.2 Cogumelos no Brasil

O cultivo de cogumelos no Brasil iniciou-se com a chegada de imigrantes asiáticos e europeus na década de 50, principalmente chineses e italianos. Os primeiros cultivos foram instalados e desenvolvidos no estado de São Paulo, nas regiões de Atibaia (interior do estado) e Mogi das Cruzes (região próxima à capital Paulista) (MOLENA, 1986; BONONI et al., 1999). Posteriormente, entre as décadas de 70 e 80, foi descoberto, no sudeste do estado de São Paulo (região da cidade de Piedade), o cogumelo medicinal *Agaricus subrufescens*. O surgimento de *A. subrufescens*, com potencial medicinal, incentivou muitos produtores a cultivá-lo, visando o mercado internacional (DIAS, 2004; DIAS, 2010). Neste período, de forma mais tímida, outros cogumelos ganhavam espaço no mercado brasileiro, como o shiitake (*L. edodes*), cultivado em toras de madeira, e o cogumelo ostra (*P. ostreatus*), cultivado principalmente em bagaço de cana-de-açúcar (EIRA; MINHONI, 1997).

Até meados da década de 90, o mercado brasileiro de cogumelos estava em plena ascensão, o champignon sendo mais conhecido entre os consumidores, o

cogumelo medicinal *A. subrufescens* conquistando o mercado internacional, principalmente o japonês, além da expansão do cultivo e consumo interno com outras espécies de cogumelos. Foi a partir deste momento, que a fungicultura brasileira começou a passar por dificuldades. A expansão do mercado brasileiro de cogumelos e a globalização acelerada, atraíram a atenção de mercados tradicionais no cultivo de cogumelos, em especial da China, que iniciou a exportação para o Brasil de champignon em conserva (cogumelo enlatado), com preço inferior aos praticados pelos produtores brasileiros. Isto resultou em grande preocupação para os produtores, que foram forçados a solicitar ajuda ao governo. Esta movimentação dos produtores resultou, em 1998, no direito “Antiduping”, medida com o objetivo de restringir a entrada de cogumelo chinês no Brasil, sobretaxando o produto importado. Esta medida teve duração de 5 anos e foi renovada em 2003 com duração até 2008 (BRASIL, 2003).

Parcialmente resolvido o problema com as importações de champignon enlatado proveniente da China, no começo dos anos 2000, iniciou-se um grande revés no mercado internacional em relação a exportações brasileiras do cogumelo medicinal *A. subrufescens*, principalmente pelo mercado japonês. A baixa qualidade e duvidosa procedência do produto brasileiro fizeram com que as exportações despencassem, forçando os produtores a focarem no mercado interno ou migrarem para o cultivo de outros cogumelos (DIAS, 2010).

Neste período de reestruturação da fungicultura brasileira, o caminho encontrado pelos produtores brasileiros foi a diversificação da produção a partir de outras espécies de cogumelos, redução de custo e a comercialização de cogumelos na forma “in natura” (fresco). Neste contexto, o cogumelo ostra, ganhou atenção especial dos produtores, apresentando crescimento rápido nos últimos 10 anos. Esta ascensão do cogumelo ostra ocorreu principalmente pela sua versatilidade de crescimento numa ampla gama de matérias-primas e práticas de cultivo menos dispendiosas que os demais cogumelos cultivados no Brasil. Além destes fatores, o mercado consumidor demonstrou boa aceitação. Outro fator positivo é a comercialização preferencialmente na forma fresca, como hortifrúti, o que praticamente impede a concorrência internacional (ANPC, 2014).

Inicialmente, sem muita concorrência, os produtores não encontraram dificuldades para cultivar o cogumelo ostra, porém o aumento no número de novos produtores, e consequente aumento da concorrência interna, forçou a cadeia produtiva deste cogumelo a buscar maior eficiência produtiva. Dentre os fatores

relacionados com a baixa produtividade e custos de produção, o substrato de cultivo é o principal alvo dos produtores e pesquisadores. A padronização do processo de elaboração do substrato e a falta de adaptações às condições brasileiras de cultivo são os grandes entraves para o aumento da produtividade e diminuição da sazonalidade na produção.

4.3 A espécie *Pleurotus ostreatus*

O cogumelo *Pleurotus ostreatus* (Jacq. Fr.) P. Kummer pertence ao Reino Fungi, Divisão Basidiomycota, Classe Homobasidiomycetes, Ordem Agaricales, Família Pleurotaceae e gênero *Pleurotus* (KIRK et al., 2011). A espécie foi descrita primeiramente em 1775 pelo naturalista holandês Nikolaus Joseph Freiherr von Jacquin pelo nome de *Agaricus ostreatus* (KIRK et al., 2011). Em 1871, o micologista alemão Paul Kummer sugeriu um novo gênero, chamado *Pleurotus*, que em grego significa (*pleurē*) lateral + (*ōtos*) orelha, ou seja, orelha lateral, referindo-se ao crescimento lateral dos basidiomas em relação à base do substrato (madeira) (KAUFERT, 1936; STAMETS; CHILTON, 1983). Em latim, *ostreatus* significa “ostra”, referindo-se ao formato do píleo, semelhante a uma ostra (STAMETS, 2000). Popularmente, a espécie é conhecida como “oyster mushroom” (em inglês, derivação do nome científico), cogumelo ostra (em português), ping Gu (em chinês, que significa “cogumelo plano”), hiratake (em japonês significa “cogumelo plano”) ou shimeji (em japonês significa “boa aparência”).

Estes nomes são atribuídos ao *P. ostreatus* dependendo do tamanho do chapéu (píleo) e da sua coloração. O tamanho do chapéu, é determinado pelo tempo de crescimento do cogumelo e, a coloração, é resultado da soma de fatores genéticos (linhagens) e métodos de cultivo (baixa temperatura de cultivo e tipo de substrato) (STAMETS, 2000; CHANG; MILES 2004; DIAS, 2010). Por exemplo, certas linhagens comerciais de *P. ostreatus*, quando cultivadas em temperatura inferior a 18°C, e colhidos com píleo pequeno (1-1,5 cm de diâmetro), adquirem uma coloração escura (marrom-preta), sendo chamadas de shimeji-preto.

No Brasil, a maioria dos produtores de *P. ostreatus* é de origem japonesa, motivo pelo qual a nomenclatura comercial do *P. ostreatus* causa dúvidas, principalmente entre os consumidores. No momento, o *P. ostreatus*, ou cogumelo ostra, é comercializado no Brasil como shimeji-preto (quando colhido pequeno e coloração variando de marrom a cinza escuro), shimeji-branco (quando colhido pequeno e coloração

cinza-clara) e Hiratake (quando colhido grande, diâmetro do píleo variando entre 3-6 cm e cor cinza-clara).

4.4 A espécie *Agaricus bisporus*

O cogumelo *Agaricus bisporus* (J. E. Lange) Imbach (1946) pertence ao Reino Fungi, Divisão Basidiomycota, Classe Agaricomycetes, Ordem Agaricales, Família Agaricaceae, Gênero *Agaricus* (KIRK et al., 2011). A espécie foi descrita primeiramente pelo botânico Inglês Mordecai Cubbit Cooke, em 1871, como uma variedade da espécie *Agaricus campestris* (INDEX FUNGORUM, 2015). Posteriormente, o micologista Dinamarquês Jakob Emanuel Lange reclassificou-a como *Psalliota hortensis* var. *bispora* (LANGE, 1926). Em 1938 foi promovida a espécie pelo próprio Jakob, a qual chamou-se *Psalliota bispora* (INDEX FUNGORUM, 2015). Em 1946, a reclassificação do gênero *Psalliota* para *Agaricus* deu o novo nome à espécie, *Agaricus bisporus* (INDEX FUNGORUM, 2015).

Os nomes comerciais também são variados assim como ocorre com o *P. ostreatus*. Os nomes populares e/ou comerciais são referenciados quanto ao tamanho do píleo no momento da colheita e diferenças de coloração branca e marrom de algumas linhagens da espécie (CHANG; MILES, 2004).

Quando colhido com píleo pequeno, ainda fechado, é chamado de botão branco ou champignon, quando a variedade é de coloração branca e, na cor marrom, de crimini, baby Portobello, baby bela, mini bela, portobellini, cogumelo romano, cogumelo italiano e cogumelo marrom. Quando a variedade marrom é colhida com píleo aberto, é chamada de Portobello. O nome comercial mais utilizado no mundo é o champignon, originalmente champignon de paris, para a variedade de coloração branca, independente do tamanho do píleo (KUO, 2004).

Os cogumelos comestíveis são extremamente perecíveis. Uma forma de aumentar a vida de prateleira é a aplicação de métodos de preservação, e o mais frequentemente utilizado é a conserva (cogumelos enlatados). Como os cogumelos escurecem rapidamente durante o processamento e armazenamento, primeiramente faz-se um pré-tratamento antes da conserva, retardando o escurecimento. Os mais comuns são: lavagem, imersão, branqueamento ou impregnação a vácuo em soluções contendo substâncias que inibem o escurecimento dos tecidos, tais como sal de cozinha, ácido

cítrico, ácido L-ascórbico, peróxido de hidrogênio, EDTA, isoascorbato de sódio, cloridrato de cisteína e metabissulfitos (LIN et al., 2001; VIVAR-QUINTANA et al., 1999). Entre a escolha dos diferentes métodos de pré-tratamento e substâncias utilizadas para retardar o escurecimento, o mais importante é seguir a legislação regulatória das concentrações destas substâncias, as quais, em concentrações elevadas, podem ser prejudiciais à saúde humana (MACHADO; TOLEDO, 2006).

No Brasil, a maior parte da produção de champignon é comercializada na forma em conserva, ao contrário dos países da Europa, América do Norte e Ásia (ANPC, 2014). Segundo a Associação Nacional dos Produtores de Cogumelos (ANPC), nos últimos cinco anos houve significativo aumento na comercialização do cogumelo na forma fresca, reflexo de uma estratégia para concorrer com o produto importado, que geralmente é vendido no Brasil na forma de conserva.

4.5 Produção de cogumelos no Brasil e no mundo

Segundo a FAOSTAT (2014), a produção mundial de cogumelos nos últimos 20 anos aumentou mais de 60% (Figura 1). Em 1997, a produção de cogumelos comestíveis e medicinais foi estimada no valor de US\$ 26 a 30 bilhões (CHANG; MILES, 2004). Em 2006, a produção de cogumelos, incluindo os selvagens, foi avaliada em US\$ 45 bilhões (CHANG, 2006). Em 2012, a produção de cogumelos e trufas foi de cerca de 7,9 milhões de toneladas (FAOSTAT, 2014). Por outro lado, neste mesmo ano, de acordo com *Edible Fungi Association* (órgão Chinês), a produção de cogumelos na China foi de 21,5 milhões de toneladas (LI, 2012).

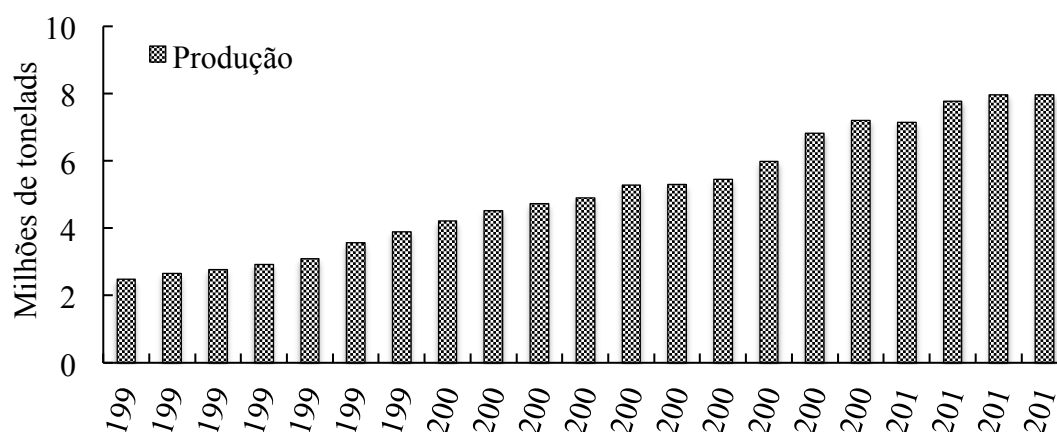


Figura 1. Produção mundial de cogumelos nos últimos 20 anos (período de 1993 - 2013); dados compilados pelo autor do website da FAOSTAT (FAOSTAT, 2014).

No Brasil, segundo o IEA (Instituto de Economia Agrícola), o estado de São Paulo, no ano de 2013, produziu cerca de 3.993,43 toneladas de cogumelos (IEA, 2014). Ao contrário, a ANPC estima o consumo per capita de cogumelos em 160g ano⁻¹ (ANPC, 2014). Esta estimativa do consumo com os valores atuais da população brasileira, 202.033.670 (IBGE, 2014), representa um consumo anual de 32.325,39 toneladas de cogumelos, valor quase dez vezes superior em relação aos dados disponíveis no IEA.

Em relação à produção das diferentes espécies de cogumelos, tem-se que, no mundo, o cogumelo mais produzido atualmente é o champignon (*A. bisporus*), seguido pelo shiitake e por espécies do gênero *Pleurotus* (GEML et al., 2001; CHANG; MILES, 2004; DIAS, 2010; ROYSE, 2013).

4.6 Características de crescimento dos cogumelos ostra e champignon em relação ao substrato de cultivo

Os cogumelos são organismos heterotróficos (saprófitos), ou seja, não possuem habilidade de produzir seu próprio alimento, sendo necessário para o seu desenvolvimento um substrato orgânico, como palhas, capins, esterco animal, resíduos de culturas agrícolas entre outros (ALEXOPOULUS et al., 1996; WEBSTER, WEBER, 2007).

Os cogumelos saprófitos ou decompositores desempenham importante papel biológico na natureza, considerados como os grandes recicladores da matéria orgânica. Os cogumelos saprófitos podem ser agrupados em três categorias, decompositor primário, secundário e terciário (CHANG; MILES, 2004; STAMETS, 2005).

Os decompositores primários, também chamados colonizadores iniciais, desenvolvendo-se sob a matéria orgânica bruta (madeira fresca ou quase fresca, folhas, palhas e etc.). Este grupo tem característica de crescimento rápido, em função de um amplo sistema enzimático, permitindo-lhe usar diferentes conjuntos de enzimas para decompor a matéria orgânica em estágios iniciais de decomposição, como, por exemplo, o cogumelo *P. ostreatus* (CHANG; MILES, 2004; STAMETS, 2005; WEBSTER; WEBER, 2007). Ao contrário, os decompositores secundários, dependem da ação de outros microrganismos, que inicialmente fazem a quebra de algumas moléculas presentes nos tecidos vegetais e animais, liberando e/ou transformando a matéria orgânica em formas

químicas mais simples. O champignon, como decompositor secundário desenvolve-se em material ligeiramente decomposto e, em interação com outros microrganismos, presentes no composto de cultivo. Por último, os decompositores terciários são aqueles cogumelos que desenvolvem-se em ambiente criado pelos decompositores primários e secundários, sob matéria orgânica bem decomposta (CHANG; MILES, 2004; STAMETS, 2005).

O champignon cultivado de forma industrial, necessita de um composto parcialmente estável quimicamente, fisicamente adequado, biologicamente capaz de proporcionar o desenvolvimento do micélio assim como outros microrganismos, que desenvolvem-se em sinergismo com o mesmo. Ao contrário, o cogumelo ostra é portador de um sistema enzimático ligninocelulolítico robusto, que o permite utilizar moléculas mais complexas, como a celulose, hemicelulose e lignina (GIARDINA et al., 1996; BALDRIAN; GABRIEL, 2003; CHANG; MILES, 2004; SWEENEY; XU, 2012).

As linhagens comerciais do cogumelo ostra, ao longo dos anos, foram melhoradas e adaptadas aos diferentes tipos de sistemas de cultivo. Atualmente, o cogumelo ostra é cultivado em praticamente qualquer tipo de biomassa vegetal, como: palhas, capins, resíduos da indústria têxtil, resíduos da indústria cafeeira, resíduos madeireiros entre outros (EUGENIO; ANDERSON, 1968; EGER et al., 1976; MACAYA-LIZANO, 1988; ZANETTI; RANAL, 1997; BONONI et al., 1999; RAMÍREZ et al., 2000; STAMETS, 2000; WANG et al., 2001; ZHANG et al., 2002; BAYSAL et al., 2003; DIAS et al., 2003; OEI, 2003; CHANG; MILES, 2004; BONATTI et al., 2004; MARINO et al., 2006; DONINI et al., 2006; PEDRA; MARINO, 2006; SILVA et al., 2007; RÜHL; KÜES, 2007; BERNARDI et al., 2008; MARINO et al., 2008; HOLTZ et al., 2009; DIAS, 2010; SÁNCHEZ, 2010; CARVALHO et al., 2010; SIQUEIRA et al., 2012; VIEIRA, 2012).

A escolha da matéria-prima para formação do substrato de cultivo, seja para o champignon ou para o cogumelo ostra, deve levar em consideração a relação C/N inicial do material assim como o método de preparo (VALÊNCIA; LÓPEZ, 2005; SILVA et al., 2007; SÁNCHEZ, 2010; VIEIRA, 2012; NUNES et al., 2012). Matérias-primas com relação C/N larga, variando entre 100-400:1 (por exemplo, madeira e bagaço de cana), necessitam de elevadas quantidades de suplementos nitrogenados para suprir as necessidades metabólicas dos microrganismos envolvidos no processo de compostagem, caso contrário, o material a ser compostado necessitará de um período longo de preparação (VIEIRA, 2012).

Outro fator importante é a disponibilidade da matéria-prima na região do cultivo, com reflexos diretos no custo de produção (EIRA; MINHONI, 1997; URBEN, 2004; ROYSE et al., 2004). Desta forma, a escolha de uma matéria prima disponível na maior parte do ano a custo reduzido, além de uma relação C/N em torno de 60-90:1, consiste em fator importante para o sucesso do cultivo de cogumelos que utilizam a compostagem como método de preparo do substrato de cultivo.

Neste sentido, a palha da cana-de-açúcar, abundante em algumas regiões do país, principalmente no sudeste e sul, apresenta potencial para a utilização como matéria-prima base na produção do cogumelos em escala industrial. Ensaios realizados anteriormente com a palha da cana-de-açúcar, através do método da compostagem curta, seguida de pasteurização e condicionamento, mostraram que esta matéria-prima apresenta relação C/N inicial em torno 70-90:1 e proporciona boa produtividade para o cogumelo ostra em comparação com matérias primas tradicionais, como palha de trigo, arroz e capim braquiária (VIEIRA, 2012).

4.7 Métodos de preparo do substrato de cultivo para cogumelos

O preparo do substrato de cultivo tem como objetivo reproduzir, em condições artificiais, um substrato que potencialize a transformação da biomassa vegetal em biomassa fúngica (cogumelos). Para que isso ocorra de forma eficiente, é necessário atender às demandas nutricionais do fungo a ser cultivado. Esta demanda varia entre as espécies de cogumelos cultivadas e, de modo geral, o substrato de cultivo tem duas variações em termos ecológicos: pode ser estéril, ou seja, somente o fungo cultivado utilizará os nutrientes em condições assépticas (substrato axênico); pode ser seletivo, ou seja, outros microrganismos crescerão no substrato de forma simbiótica e sinérgica com o cogumelo cultivado (substrato compostado) (CHANG; MILES, 2004; STAMETS, 2005).

Os métodos de preparo do substrato de cultivo mais comuns são: esterilização (substrato axênico); substrato axênico com inoculação de microrganismos termófilos; tratamento à vapor (pasteurização severa); compostagem curta seguida de pasteurização e condicionamento; e alteração brusca do pH, através da adição de corretivos do pH, como, carbonato de cálcio e calcário (STAMETS, 2000; LEE et al., 2002; CHANG; MILES, 2004; VALÊNCIA; LOPEZ, 2005; SÁNCHEZ, 2010).

A escolha do tratamento está relacionada com o tipo de matéria

prima (principalmente granulometria do material e relação C/N), espécie do fungo a ser cultivado e nível de infraestrutura da propriedade (EIRA; MINHONI, 1997; STAMETS, 2000; CHANG; MILES, 2004; DIAS, 2010). O sistema mais utilizado pela indústria de cogumelos na preparação do substrato de cultivo tem sido a compostagem curta seguida de pasteurização e condicionamento, principalmente para o cultivo do champignon e para o cogumelo ostra (STAMETS; CHILTON, 1983; LEE et al., 2002; STAMETS, 2000; SÁNCHEZ, 2010).

4.8 Compostagem como método de preparação do substrato de cultivo

A compostagem, de modo geral, é definida como um processo biológico, predominantemente aeróbio, dirigido pela atividade microbiana (principalmente bactérias), que digerem e transformam a matéria orgânica (biomassa, vegetal e/ou animal) em um produto final estável ou relativamente estável quimicamente (JANN et al., 1959; BERTOLDI et al., 1983; LIANG et al., 2003).

A compostagem envolvida na preparação do substrato de cultivo para cogumelos difere significativamente da compostagem convencional (tratamento de resíduos), tendo como objetivo principal a preparação dos nutrientes para o fungo a ser cultivado e desinfestação de microrganismos, insetos e nematóides (SINDEN; HAUSER, 1950; SINDER; HAUSER, 1953; VAN GRIENSVEN; 1988). Este tipo de compostagem está dividido em duas fases, ainda em parte baseado no método descrito por Sinden e Hauser (1950), as quais são: 1) compostagem propriamente dita (fase I) – parcialmente controlada, realizada em ambiente aberto ou em “bunkers” (sistema com fornecimento de ar fresco) e responsável pela preparação dos nutrientes, ou seja, decomposição inicial da biomassa; 2) pasteurização e condicionamento (fase II) – realizada em ambiente fechado (controlado) com o propósito de desinfestar o substrato (microrganismos competidores, insetos e nematoides), seleção de microrganismos benéficos ao cogumelo a ser cultivado (exemplo, actinobactérias) e maturação química do composto (eliminação de amônia livre) (SINDEN; HAUSER, 1950; STAMETS; CHILTON, 1983; STRAATSMA et al., 1989; VEDDER, 1996; MUEZ; PARDO, 2001; LEÓN; LARA, 2007). Ambas as fases são partes relacionadas do processo, mas, ao mesmo tempo, diferentes em sua natureza e função (NOBLE; GAZE, 1996).

O modelo de compostagem para o cultivo de cogumelos foi

desenvolvido inicialmente para o cultivo de champignon (SINDEN; HAUSER, 1950), passando por aperfeiçoamento ao longo dos anos, sendo foco de pesquisas, seja pela busca de mais controle do processo, redução nas emissões de gases nocivos e odores indesejáveis, aceleração da compostagem e balanço de nutrientes (SMITH; SPENCER, 1976; LABORDE et al., 1979; GERRITS; VAN GRIENSVEN, 1990; STRAATSMA et al., 1994; GERRITS et al., 1995; NOBLE; GAZE, 1996; STRAATSMA et al., 2000; SHARMA et al., 2000).

O desenvolvimento do método de compostagem para o champignon teve como princípio a fisiologia da espécie e o tipo de matéria-prima, neste caso, a palha de trigo ou arroz, na Europa, América do Norte e Ásia. A partir destas premissas, pesquisou-se a compostagem em relação a duração, manejo e balanço de nutrientes (especialmente carbono e nitrogênio) entre outras variáveis. Para o champignon, um decompositor secundário, o substrato artificial deve estar num estágio de decomposição relativamente avançado, com relação C/N final em torno de 16-20:1 (VAN GRIENSVEN, 1988; OEI, 2003; CHANG; MILES, 2004). Ao contrário do champignon, o cogumelo ostra é capaz de utilizar substratos mais “duros”, ou seja, menos degradados em função das suas características fisiológicas. Estas características fisiológicas sugerem uma compostagem mais curta que a praticada para o cultivo de champignon e, com pouca ou nenhuma suplementação de nitrogênio (OEI, 2003; LEE et al., 2002; HERNÁNDEZ et al., 2003; STAMETS, 2005; VIEIRA, 2012).

Desta forma, a compostagem praticada para o cultivo do cogumelo ostra tem as seguintes finalidades: inicialmente, umedecer a matéria-prima, até atingir um teor de umidade entre 70-80%, o que demora algumas horas ou dias, uma vez que a camada de cera e outros compostos na porção externa da palha ou capim impede a penetração da água (OEI, 2003); em segundo lugar, esgotar os compostos facilmente degradáveis (por exemplo, açúcares e aminoácidos), que podem servir como substratos para os microrganismos concorrentes após a pasteurização, no caso de uma potencial recolonização destes (ORORBIA; NÚÑEZ, 2001; LÉON; LARA et al., 2007); em terceiro lugar, expor parcialmente o carbono, nitrogênio e outros nutrientes contidos no material (lignina, celulose e etc.) através da ação microbiana, facilitando a assimilação pelo cogumelo ostra (STÖLZER; GRABBE, 1991); e por último, a sanitização através da pasteurização e, o estabelecimento de uma microflora benéfica ao cogumelo durante o condicionamento do substrato (STRAATSMA et al., 1989; WIEGANT, 1992;

STRAATSMA et al., 1994; LÉON; LARA, 2007).

Em resumo, a compostagem tem como função adaptar o substrato as necessidades (física, química e biológica) do cogumelo a ser cultivado, para tal é necessário que tenha-se conhecimento do processo, principalmente da ecologia microbiana e das alterações físico-químicas do substrato durante o processo.

4.9 Aspectos gerais da ecologia microbiana da compostagem

Qualquer tipo de compostagem, seja para o tratamento de resíduos (lixo doméstico entre outros) ou para o cultivo de cogumelos, tem como principal componente ativo e mediador do processo a comunidade microbiana. Esta comunidade é composta por fungos, actinobactérias e principalmente bactérias. Estes organismos são capazes de quebrar moléculas complexas da biomassa (como lignina, celulose entre outros) liberando-as em formas mais simples para o meio (BERTOLDI et al., 1983; KIEHL, 1985). Os produtos gerados pela ação de uma população, quer seja o substrato parcialmente degradado ou produtos do metabolismo, servirão de substrato ou fator de crescimento para a população seguinte e assim sucessivamente, até a estabilização da matéria orgânica. Esses microrganismos possuem inúmeras enzimas lignocelulolíticas que, secretadas isoladamente ou formando celulosomas, digerem os açúcares, aminoácidos, celulose, hemicelulose e lignina, entre outros compostos, gerando CO₂, H₂O, NH₃, calor e um substrato orgânico útil para diversos fins, inclusive para o cultivo de cogumelos (PETERS et al., 2000; TUOMELA et al., 2000; SONG et al., 2001).

No ambiente da compostagem (habitat), existem diversas populações microbianas, desencadeando interações ecológicas simbióticas, mutualísticas, comensalistas, de competição e cooperação metabólica. Estes microrganismos, considerados lignocelulolíticos, podem evoluir como degradadores individuais ou como parte de uma "reação em cadeia" em comunidades microbianas complexas de diversos ambientes, como, por exemplo, o rúmen (bovino) e a compostagem natural (decomposição da serapilheira de uma determinada área). Esta habilidade em degradar a biomassa ocorre através da secreção de enzimas no meio, como as glicosil hidrolases, esterases, liases, além de enzimas capazes de modificar a lignina e a celulose entre outras (YANG et al, 2011; VAN DEN BRINK; DE VRIES, 2011).

Após o estabelecimento do ambiente de compostagem adequado, desencadeia-se a rápida decomposição de certos compostos químicos; síntese de novas substâncias pelos microrganismos e formação de complexos resistentes em razão dos processos de condensação e polimerização da matéria orgânica. A biomassa não é igualmente atacada e nem decompõe-se inteiramente de uma só vez, seus diversos constituintes são decompostos em diferentes estágios, intensidades e por diferentes populações de microrganismos. Os açúcares, aminoácidos e as proteínas solúveis são decompostos em primeiro lugar, além de algumas hemiceluloses e demais proteínas. A celulose, certas hemiceluloses, óleos, gorduras, resinas e outros compostos são digeridos mais lentamente. As ligninas, certos ácidos graxos e taninos são os compostos mais resistentes à decomposição, levando mais tempo na compostagem para serem transformados (KIEHL, 1985; PARTANEN et al., 2010). Vale ressaltar que a combinação de enzimas e/ou microrganismos variam de acordo com a fonte de biomassa inicial e fatores ambientais como temperatura, umidade e pH, entre outros (CHANDNA et al., 2013).

Outros fatores envolvidos na compostagem, além da presença dos microrganismos, influenciam de maneira direta o curso da mesma. Estes fatores podem ser agrupados em três categorias principais - nutricionais, ambientais e operacionais. A importância relativa de um fator individual é determinada por sua relação com a proliferação e atividade dos microrganismos-chave durante o processo. Geralmente, os microrganismos-chave determinam a extensão da compostagem, em função do complexo enzimático que lhes permite acessar, degradar e utilizar a biomassa bruta (moléculas complexas) mais facilmente. Outros microrganismos só podem utilizar os produtos gerados a partir da decomposição (intermediários) (PETERS et al., 2000; MARTINS et al., 2013; NEHER et al., 2013).

De modo geral, a temperatura é um indicativo da mudança de fases durante o processo de compostagem. Baseando-se na temperatura, a compostagem apresenta três fases distintas. Inicialmente, na fase mesófila (temperatura <45°C), predominam bactérias e fungos mesófilos, os quais atacam os componentes solúveis de fácil degradação, produzindo e liberando ácidos no meio, acidificando-o. O metabolismo deste grupo de microrganismos inicia o processo exotérmico, liberando calor e, conseqüentemente, promovendo a elevação da temperatura, aproximando-se da fase termófila, onde a comunidade predominante será de microrganismos termófilos. A

temperatura na fase termófila (pode ultrapassar os 80°C) e é fortemente influenciada pela disponibilidade de oxigênio, a qual pode ser manejada através do revolvimento da pilha (fator operacional). Desta forma, havendo decomposição aeróbia (manejo adequado da pilha), o carbono será liberado na forma de gás carbônico (CO₂), entretanto, se o processo tornar-se anaeróbio (manejo inadequado) eliminar-se-ão, além do CO₂, metano, álcool e ácidos orgânicos (GERRITS, 1988). Além disso, é nesta fase que ocorre a degradação intensa das moléculas mais complexas da biomassa (celulose, hemicelulose e lignina), pelos chamados microrganismos-chave, liberando CO₂ e amônia, causando a redução da relação C/N (TUOMELA et al., 2000; CHANDNA et al., 2013). Após a fase termófila, o substrato irá perder calor retomando a fase mesófila novamente, porém agora o substrato apresenta composição química diferente da inicial e coloração escura, deixando os nutrientes em formas mais simples para o fungo a ser cultivado (STRAATSMA et al., 1989; LÉON; LARA, 2007).

Em suma, a sucessão das populações microbianas durante o processo, as quais alteram a composição físico-químicas do substrato final, é influenciada por fatores externos (manejo).

4.10 Abordagens utilizadas para estimar comunidades microbianas

Nos estudos de ecologia microbiana, as duas principais abordagens para a estimação da diversidade microbiana em amostras ambientais são as análises dependentes e independentes de cultura. Ambas permitem caracterizar a diversidade, mas apresentam grandes variações nos resultados obtidos. Estima-se que 99% dos procariotos ainda não foram cultivados em meios de cultura, devido às condições seletivas exigidas por cada indivíduo, como composição do meio de cultura, temperatura, pH, CO₂, O₂, entre outros. (WHITMAN et al., 1998; AMANN et al., 1995; TORSVIK et al., 2002; HANDELSMAN, 2005).

As técnicas dependentes de cultura, desenvolvidas inicialmente por Pasteur, Koch e outros, foram extensivamente utilizadas, mostrando-se, até certo momento, bem sucedidas para estudos de diversidade microbiana na falta de outras metodologias. Porém hoje sabe-se que a estimação da diversidade microbiana em ambientes complexos é limitada com o uso de técnicas dependentes de cultura. O trabalho desenvolvido por Torsvik et al. (2002), utilizando métodos independentes de cultura, estimou 4000 genomas

diferentes de procariontes por grama de solo. Por outro lado, o número de microrganismos isolados em meios de cultura (método dependente) é estimado em 100 espécies por grama de solo (REIS JUNIOR et al., 2002).

Os esforços de décadas concentrados no isolamento de microrganismos patogênicos ou relacionados à determinada patogênia, assim como aqueles capazes de produzir antibióticos em laboratório, estudados na área médica, permitiram um grande avanço na identificação de muitos microrganismos (HANDELSMAN, 2005). Por outro lado, a microbiologia ambiental e industrial necessita desenvolver estratégias de aprimoramento dos meios de cultura seletivos para melhor compreensão da ecologia microbiana de ambientes complexos, como, por exemplo, da compostagem (HUGENHOLTZ et al., 1998).

Neste sentido, alguns trabalhos foram desenvolvidos para estimar e isolar microrganismos da compostagem envolvida na preparação do substrato de cultivo para cogumelos, em especial para o champignon. Cooney e Emerson (1964) isolaram em meio de cultura nove espécies de fungos termófilos, diretamente do substrato de cultivo e cinco espécies a partir de matérias-primas comumente utilizados na compostagem. Fergus (1964) isolou do substrato na fase II (condicionamento) oito espécies de fungos e posteriormente, Fergus e Sinden (1969) isolaram mais uma espécie. Silva et al. (2009), avaliando a diversidade microbiana durante a compostagem de quatorze dias e após a pasteurização do substrato à base de bagaço de cana-de-açúcar e capim coast-cross para o cultivo de *Agaricus subrufences*, isolaram em meios de cultura seletivos, duas espécies de fungos filamentosos, trinta e seis espécies de bactérias e seis espécies de actinobactérias.

O isolamento e a manutenção em laboratório de microrganismos de ocorrência natural no meio ambiente, especialmente da compostagem, permitirão a construção de uma coleção microbiana com potencial de exploração das características fisiológicas e bioquímicas destes microrganismos, possibilitando a utilização para diversos fins biotecnológicos (VIJAYALAKSHMI; VIJAYALAKSHMI, 2007). Embora o método dependente de cultivo represente uma poderosa ferramenta para o estudo da diversidade microbiana (taxonômica e funcional), este método apresenta limitações.

Por outro lado, análises independentes de cultura permitem o acesso ao genoma de toda a comunidade microbiana de uma amostra ambiental, por mais complexa que seja, sem a necessidade de comparações morfológicas, fisiológicas e

bioquímicas, baseando-se somente nas diferenças genéticas dos indivíduos (HANDELSMAN, 2005).

As análises independentes de cultivo ganharam impulso com o desenvolvimento da técnica conhecida como PCR (em inglês, *Polymerase Chain Reaction*) descrita por Saiki et al. (1985). Esta técnica permite amplificar pequenos e específicos segmentos do genoma, obtendo-se, *in vitro*, várias cópias de determinada região do DNA. Assim, é possível a amplificação de sequências alvo mesmo em uma amostra heterogênea com elevada diversidade de sequências, permitindo a detecção de organismos específicos.

Com a aplicação das técnicas moleculares, verificou-se a existência de uma vasta diversidade genética não acessada pelos métodos dependentes de cultura (TORSVIK et al., 2002; HANDELSMAN, 2005). Atualmente, sabe-se que a diversidade microbiana identificada pelos métodos dependentes representa apenas a ponta do *iceberg* de um vasto banco genético natural. Na abordagem por métodos independentes, as técnicas conhecidas como T-RFLP (em inglês, *Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism*), ANDRA e DGGE (em inglês, *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) diferenciam as comunidades ou indivíduos através do padrão de bandejamento em gel de agarose da sequência-alvo escolhida, em especial do gene ribossomal (para bactérias o 16S e para fungos o ITS). Entre as técnicas moleculares mais recentes, o sequenciamento tem se mostrado bastante eficiente e promissor para a identificação e caracterização de táxons presentes nas comunidades microbianas ambientais, especialmente os sequenciadores de segunda e terceira geração (pirosequenciamento).

A metagenômica é uma abordagem independente de cultura baseada na investigação das moléculas de DNA de uma mistura de populações, extraído diretamente de amostras ambientais (HANDELSMAN et al., 1998; HANDELSMAN, 2005). Com o surgimento desta técnica, os pesquisadores conseguiram acessar de forma massiva uma ampla gama de microrganismos não detectada anteriormente pelos métodos tradicionais, revolucionando os estudos em ecologia microbiana de comunidades ambientais complexas (HANDELSMAN, 2005).

A metagenômica foi descrita oficialmente pela primeira vez na conferência sobre o assunto (Metagenomics 2003), realizada na Alemanha (REISENFELD et al., 2004). Este método é um conjunto de técnicas moleculares capaz de contornar a necessidade de cultivo e, em função da vasta diversidade microbiana, ser

conduzido em grande escala (HANDELSMAN, 2005; NEHER et al., 2013; MARTINS et al., 2013).

As informações obtidas a partir da análise de metagenômas podem ser usadas para determinar a diversidade de uma comunidade, a presença de microrganismos específicos ou dominantes, rotas metabólicas, bem como a simples presença de um gene específico. Desta forma, a metagenômica permite a visualização dos microbiomas como unidades biológicas com o seu próprio repertório genético. Esta metodologia vem sendo utilizada para responder questões fundamentais da microbiologia ambiental como: quantos são? Quem são? E fazendo o que? Isso faz da metagenômica uma importante ferramenta para o estudo da ecologia microbiana e prospecção do potencial metabólico através da análise da diversidade taxonômica e localização de genes e operons responsáveis pela síntese de moléculas com propriedades de interesse biotecnológico (STEELE; STREIT, 2005).

Com a aplicação de técnicas independentes de cultura, especialmente o sequenciamento de segunda e terceira geração, é possível realizar uma análise mais profunda da comunidade microbiana envolvida na compostagem e, conseqüentemente, compreender melhor o papel destes microrganismos no sistema produtivo.

4.11 Características físico-químicas do substrato de cultivo para cogumelos

Os substratos para a produção de cogumelos são elaborados a partir de resíduos orgânicos (subprodutos e/ou resíduos da agricultura e agroindústria) que, através do processo de compostagem, passam por alterações físico-químicas, adequando-se, do ponto de vista nutricional, à espécie de cogumelo a ser cultivada (OEI, 2003; CHANG; MILES, 2004). Desta forma, a intensidade da atividade microbiana durante a compostagem, a qual é influenciada pelo manejo da mesma (tempo de duração e temperatura da fase controlada), interfere diretamente na composição final do substrato (LEVANON et al., 1988; VAN LIER et al., 1994).

A atividade microbiana no início da compostagem consome os componentes de fácil assimilação, esgotando-os rapidamente (BERTOLDI et al., 1983; LÉON; LARA, 2007). Dentre estes componentes, destacam-se os açúcares solúveis, que são fonte de alimento para microrganismos competidores durante a colonização do

substrato pelo fungo a ser cultivado (LÉON; LARA, 2007; VAJNA et al., 2010). Com o aumento da temperatura, entre a fase mesófila e termófila, a perda de carbono na forma de CO₂ e de nitrogênio na forma de amônia promove a redução da relação C/N, matéria orgânica e energia bruta (BERTOLDI et al., 1983; GERRITS; VAN GRIENSVAN, 1990), tornando o substrato seletivo para o fungo a ser cultivado, com a ressalva que o tempo de compostagem e a quantidade inicial de nitrogênio têm influência direta na redução da relação C/N e seletividade do substrato.

Outro fator importante é o pH, que pode ser indicativo do grau de degradação da compostagem. Inicialmente, o pH decresce em função da digestão dos componentes de fácil assimilação pelos microrganismos, liberando ácidos no meio, os quais serão consumidos pela própria comunidade microbiana, tornando o pH novamente próximo de neutro no final do processo (BERTOLDI et al., 1983; KIEHL, 1985).

Além desses fatores, as mudanças nos teores de celulose, hemicelulose e lignina (moléculas complexas) permitem inferir o grau de decomposição do substrato, possibilitando o fornecimento de um substrato mais compostado ou menos compostado, com reflexos nutricionais para o fungo cultivado. Como discutido anteriormente, *P. ostreatus* é considerado um fungo decompositor primário, sugerindo que o substrato de cultivo seja parcialmente compostado, ao contrário do *A. bisporus*, o qual se desenvolve em substratos bem compostados (WOOD; FERMOR, 1985; VAN GRIENSVAN, 1988; CHANG; MILES, 2004). Desta forma, juntamente com a caracterização da comunidade microbiana, as variáveis físico-químicas permitem analisar o andamento da compostagem num espectro mais amplo, possibilitando realizar alterações operacionais (tempo da compostagem, intervalos de reviradas da pilha e temperatura de pasteurização) e nutricionais (suplemento de nitrogênio) do processo de compostagem para o cultivo de cogumelos.

CAPÍTULO I

TEMPO DE COMPOSTAGEM (FASES I E II) E EFEITO NAS VARIÁVEIS FÍSICO-QUÍMICAS DO SUBSTRATO DE CULTIVO E NA PRODUÇÃO DO COGUMELO OSTRA (*Pleurotus ostreatus*)

RESUMO

Dentre os fatores que determinam a produtividade de cogumelos, a seletividade físico-química do substrato de cultivo é um dos pontos chave da produção. A seletividade do substrato está diretamente relacionada com o manejo da compostagem. Neste sentido, avaliou-se neste experimento, o tempo de compostagem na fase I (7 e 14 dias) e na fase II (com ou sem condicionamento) e a influência nas variáveis físico-químicas do substrato, produtividade, número de cachos e precocidade do cogumelo ostra. Para isto, elaborou-se um substrato a base de palha de cana e bagaço de cana compostado por 7 e 14 dias (fase I), condicionado ou não (fase II). As variáveis físico-químicas do substrato, energia bruta, pH e açúcares solúveis foram significativamente influenciadas pelo tempo de compostagem. Por outro lado, a matéria orgânica e a relação C/N não diferiram estatisticamente mas, apresentaram redução em seus valores durante a compostagem, consequência da perda de carbono e nitrogênio na forma de CO₂ e amônia, respectivamente. A produtividade e o número de cachos diferiram estatisticamente e, o substrato com 7 dias (fase I), sem condicionamento, apresentou menor produtividade e número de cachos (19,61% e 57,60, respectivamente). Ao contrário, o substrato com 7 dias de fase I com condicionamento e os

substratos com 14 dias de fase I, com ou sem condicionamento não diferiram estatisticamente entre si (24,04%, 22,83% e 22,68% de produtividade e, 66,30, 68,9 e 68,0 cachos por bloco, respectivamente). Por último, conclui-se que, a fase I de 7 dias com condicionamento reduz os custos e recursos produtivos sem perda de produtividade.

Palavras chave: *Pleurotus ostreatus*, compostagem, variáveis físico-químicas, produtividade, número de cachos.

COMPOSTING TIME (PHASES I AND II) AND EFFECT OF PHYSICOCHEMICAL VARIABLES OF SUBSTRATE AND OYSTER MUSHROOM YIELD (*Pleurotus ostreatus*)

ABSTRACT

Among many factors that determine mushroom yield, substrate physicochemical selectivity is one of the most important. Substrate selectivity is directly correlated with composting management. In this way, we aimed evaluate the composting time of phase I (7 and 14 days) and phase II (with or without conditioning) and influence on yield, number of clusters and precocity of oyster msurhoom. Composting time influenced the substrate physicochemical variables, crude energy, pH and soluble sugars. Organic matter and C/N ratio did not differ statistically, but decreased during the composting process, consequence of carbon and nitrogen losses by CO₂ and ammonia, respectively. Yield and number of clusters differed significantly and, substrate with 7 days (phase I), unconditioned, showed lower yield and number of clusters (19.61% and 57.60, respectively). On the other hand, substrate with 7 days of phase conditioned and substrates with 14 days of phase I, with or without conditioning showed no statistical different among themselves (24.04%, 22.83% and 22.68% yield, 66.30, 68.9 and 68.0 clusters per block, respectively). Finally, we conclude that phase I of 7 days with conditioning can reduce costs and productive resources without yield loss, but we emphasize the importance of research continuity with focus in composting time, physicochemical variables and microbial community involved during composting process

Keywords: *Pleurotus ostreatus*, composting, physicochemical variables, productivity, number of cluster.

INTRODUÇÃO

O cultivo do cogumelo ostra (*Pleurotus ostreatus*) no Brasil expandiu-se rapidamente nos últimos dez anos, impulsionado principalmente pelos problemas de mercado do champignon (*Agaricus bisporus*) e do cogumelo medicinal *Agaricus subrufescens*. A concorrência internacional, principalmente asiática, praticamente obrigou os produtores de champignon a buscar uma alternativa para manterem-se na atividade (ANPC, 2014). Uma das alternativas foi a diversificação da produção, onde o cogumelo ostra, de fácil aceitação por parte do consumidor, condições de cultivo rústicas e comercialização na forma fresca (impedindo a concorrência externa), conquistou espaço rapidamente na fungicultura brasileira, tornando-se um dos cogumelos mais cultivados no país¹.

A rápida expansão no cultivo promoveu o aumento da concorrência interna, que aliada à falta de tradição (conhecimento), tornou evidente a necessidade de padronização do preparo do substrato de cultivo. Os principais problemas na produção, segundo levantamento feito junto a produtores, é o processo de elaboração do substrato de cultivo, ocasionando baixa produtividade e contaminações generalizadas¹.

Apesar da versatilidade de crescimento do cogumelo ostra numa ampla gama de matérias primas e diferentes formas de cultivo (STAMETS, 2000; CHANG; MILES, 2004, VIEIRA et al., 2012), a padronização do método de preparo do substrato, o que inclui também o tipo de matéria-prima, é o principal problema enfrentado pela cadeia produtiva do cogumelo ostra atualmente no Brasil.

O método de preparo do substrato mais utilizado pela indústria de cogumelos é a compostagem curta seguida de pasteurização e condicionamento. Assim como na maioria dos países produtores de cogumelos, o Brasil também utiliza este método para o cultivo de cogumelos. A compostagem é um processo biológico dinâmico, devendo ser dimensionada e manejada de modo a atender às necessidades fisiológicas da espécie de cogumelo a ser cultivada (SINDEN; HAUSER, 1950; CHANG; MILES, 2004; STAMETS, 2005).

A compostagem como método de preparo do substrato foi desenvolvida para o cultivo do champignon, atendendo às necessidades fisiológicas desta

¹ Levantamento realizado junto a produtores do estado de São Paulo entre os anos de 2009-2014 via programa de treinamento e capacitação SEBRAETec.

espécie, as quais diferem significativamente das exigências nutricionais do cogumelo ostra (CHANG; MILES 2004, SÁNCHEZ, 2010). A compostagem para o cultivo de champignon tem sido bem estudada em relação a fatores físico-químicos e manejo (tempo e métodos de compostagem) (SINDEN; HAUSER, 1953; VAN LIER et al., 1994; NOBLE; GAZE, 1996; SHARMA et al., 2000), assim como alterações na comunidade microbiana (FORDYCE Jr, 1970; STRAATSMA et al., 1994; STRAATSMA et al., 2000; SZÉKELY et al., 2009; SONG et al., 2001). Por outro lado, pouco se sabe sobre a compostagem para o cultivo do cogumelo ostra, principalmente em relação à duração da compostagem, a qual tem como objetivo a preparação dos nutrientes, sanitização e maturação do substrato para o cogumelo a ser cultivado.

Neste sentido, a avaliação do tempo de compostagem e o acompanhamento das transformações físico-químicas do substrato (seletividade físico-química) permitirão realizar um manejo mais adequado e, por conseguinte, aumento da seletividade do substrato de cultivo para o cogumelo ostra. Entre as variáveis físico-químicas de fácil monitoramento durante a compostagem, a relação C/N, energia bruta, matéria orgânica, pH, temperatura e açúcares solúveis são as mais indicadas para a compreensão do grau de degradação do substrato (BERTOLDI et al., 1983; GERRITS, 1988; SHARMA et al., 2000; OEI, 2003).

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo testar diferentes condições de compostagem (fases I e II, tempo), alterações de algumas variáveis físico-químicas (pH, matéria orgânica, relação C/N, energia bruta e açúcares solúveis) e o rendimento de cogumelos (produtividade, número de cachos e precocidade).

MATERIAL E MÉTODOS

Linhagem de *P. ostreatus*, substrato de cultivo e compostagem

A linhagem POS 09/101 (basidioma de cor cinza-clara) foi selecionada a partir de um cultivo comercial na cidade de São Pedro, São Paulo, Brasil. O inóculo foi preparado usando grãos de trigo fervidos em água durante 35 minutos com posterior ajuste do pH para 7, através da adição de carbonato de cálcio 10 g kg⁻¹ e gesso 10 g kg⁻¹ (peso úmido) (ROYSE; SCHISLER, 1987).

O substrato de cultivo foi elaborado à base de palha de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.), a qual foi colhida em Lençóis Paulista, de um canavial comercial, entre os meses de fevereiro e abril de 2013, seca ao sol, armazenada e analisada no Módulo de Cogumelos - FCA/UNESP, Câmpus de Botucatu-SP. A formulação dos substratos foi baseada no ajuste da relação C/N inicial de 65:1 (Tabela 1, página 39), de acordo com Vieira et al. (2012). O ajuste da relação C/N inicial do substrato foi baseada na relação C/N inicial das matérias-primas (palha de cana, bagaço de cana, farelo de trigo e farelo de arroz).

A fase I de compostagem foi conduzida em galpão coberto, aberto na laterais, com piso de concreto. As pilhas foram montadas em camadas sobrepostas de bagaço de cana-de-açúcar + palha de cana-de-açúcar + farelo de arroz + farelo de trigo + calcário calcítico + gesso agrícola, com 2 m (largura) x 3 m (comprimento) x 1,5 m (altura). As pilhas foram reviradas e homogeneizadas a cada 48 horas, com adição de água ou não para correção da umidade, que manteve-se em torno de 75% (Figura 1, página 41). Após a fase I, os substratos foram transferidos para caixas treliçadas (56,5 cm x 46,5 cm x 28,5 cm, comprimento, largura e altura, respectivamente), as quais foram acomodadas de forma aleatória no interior de uma câmara climatizada modelo “Dalsem Mushroom” para a condução da fase II (pasteurização a 59,5°C por 8 horas e condicionamento a 46,5°C durante 3 dias).

Imediatamente após o término da fase II, o substrato foi resfriado a 25°C para a execução da inoculação ainda dentro da Câmara Dalsem, e todas as ferramentas de trabalho foram limpas com álcool 70%. Utilizou-se a concentração de 20 g kg⁻¹ (g de inóculo por kg de substrato úmido) distribuída de forma manual e homogênea. O bloco de substrato teve 10kg de substrato inoculado (peso úmido, cerca de 70% de umidade). A colonização micelial ou corrida do micélio foi realizada em câmara climatizada modelo “Dalsem Mushroom” durante 13 dias com temperatura de 25 ± 1°C, umidade relativa de 87,5 ± 2,5% e ausência de luz, monitorada pelo Software VEC 32 “Dalsem Mushroom”.

Instalações da produção (estufa)

A estufa utilizada para a produção dos cogumelos é coberta com telha cerâmica e protegida nas laterais com sombrite e cortinas de plástico retrátil. Os

choques térmicos para induzir a frutificação ocorreram de forma natural, ou seja, de acordo com a temperatura ambiente, que variou entre 15 e 29°C no período experimental (outono) (Figura 2, página 42). A umidade relativa foi mantida entre 70 - 90% por meio de nebulização.

Análises físico-químicas do substrato

Os substratos foram analisados no início da compostagem (tempo 0), no final da fase I (7 ou 14 dias), após a pasteurização (substratos sem condicionamento) e após o condicionamento (substratos pasteurizados e condicionados). Para a relação C/N, primeiramente analisou-se a matéria orgânica, calculada pelo método de "perda por ignição", em que 1g de substrato previamente triturado e seco a 105°C, durante 3h e, incinerada na mufla a 550°C durante 1 hora (adaptado de DAVIES, 1974). Subsequentemente, o carbono total (Ct) foi calculado usando a seguinte equação:

$$C_t = \frac{(P_1 - P_2)}{1.8} \cdot 100$$

P1 - peso inicial;

P2 - peso final (após incineração na mufla);

1.8 - coeficiente.

O nitrogênio total foi calculado pelo método de Kjeldahl, utilizando o ácido sulfúrico concentrado a 70% na presença de um catalisador aquecido a 100°C/60'; 150°C/50'; 200°C/40'; 250°C/40' e 350°C/40' (adaptação do método, aquecimento gradual). Posteriormente, foi realizada a titulação do nitrogênio (adaptado de Brasil, 2007). Para o cálculo da relação C/N, foi utilizado o "valor do carbono/valor nitrogênio" em base seca.

A energia bruta foi determinada pelo método da bomba calorimétrica (modelo IKA C200). Para isso, 1g de substrato foi seco a 105°C (4 horas) e moído em moinho de facas com peneira de 30 mesh. A combustão da amostra foi realizada no interior do equipamento que, após a queima do material, gerou um valor de calorias por grama de substrato.

Para o cálculo do pH, foram usados 10g do substrato úmido e 50 mL de CaCl_2 a 0,01 mol/L, em agitação durante 30 minutos; posteriormente, o pH foi mensurado com peagâmetro Micronal B474, conforme Brasil (2007).

O açúcar solúvel foi determinado pelo método do colorimétrico modificado, para a determinação de hidratos de carbono solúveis (JOHNSON et al., 1966). A adaptação do método consiste na criação de curva padrão com glicose e xilose.

A temperatura da compostagem (fase I) foi determinada utilizando um termômetro de haste longa (PT 100), em seis pontos da pilha de compostagem, gerando uma média de temperatura da pilha durante todo o período de compostagem (7 e 14 dias da fase I). A temperatura na fase II foi controlada.

Variáveis de produção

A produtividade foi determinada de acordo com a equação: cogumelo massa fresca/substrato massa fresca x 100, expresso em % (ROYSE et al., 2004). A colheita iniciou-se cinco dias após o término do período de incubação e foi mantida por mais 61 dias (ciclo total de produção). Os cogumelos foram colhidos manualmente, com tamanho de píleo variando entre 1,5-4cm de diâmetro, e foram imediatamente contados e pesados.

A precocidade foi determinada da seguinte forma: após o período de incubação, o período de colheita (61 dias) foi dividido em dois períodos, ou seja, entre o 1° e 31° dia de colheita e entre 32° dia e 61° dia de colheita (final de cultivo) e a precocidade refere-se à colheita acumulada entre os dois períodos.

O número de cachos (NC) foi calculado a partir da soma dos cachos de cada tratamento dividido pelo número de repetições (13 repetições), que, posteriormente, gerou uma média por tratamento, sendo expressa em cachos por bloco.

O experimento foi um fatorial 2 x 2 (dois períodos na fase I – 7 e 14 dias x dois períodos na fase II – com ou sem condicionamento) com dez repetições para as variáveis de produção (produtividade e número de cachos) e três repetições para as variáveis físico-químicas do substrato (matéria orgânica, relação C/N, energia em bruta, pH e açúcares solúveis). As variáveis físico-químicas do substrato foram analisadas em um fatorial 2 x 4 (dois substratos x quatro períodos – dois na fase I e dois na fase II). Todos os

dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey, utilizando o software ASSISTAT 7 (SILVA; AZEVEDO, 2009).

RESULTADOS

Os resultados obtidos, tanto da produção quanto das variáveis físico-químicas do substrato, foram comparados em relação ao tempo de compostagem (início da compostagem, ao final da fase I, ao final da pasteurização e ao final do condicionamento).

Os resultados obtidos da matéria orgânica e relação C/N não variaram significativamente entre tratamentos (fase I de 7 e 14 dias e fase II com ou sem condicionamento) mas, observa-se que, para todos os tratamentos, houve redução no teor de matéria orgânica e diminuição (estreitamento) da relação C/N ao longo da compostagem (Figura 3A e 3B, página 43). A redução da relação C/N entre o início e o fim fase I foi de 7% e 19% para o substrato com 7 dias e 14 dias de compostagem, respectivamente. Entre o início da compostagem e o final da pasteurização, a diminuição foi de 11% e 22% (7 dias e 14 dias de compostagem, respectivamente). A maior redução observada foi entre o início da compostagem e o final do condicionamento (fase II), aproximadamente 20% e 30% para os substratos com 7 dias e 14 dias de compostagem, respectivamente (Figura 3B, página 43).

Os valores de pH dos tratamentos foram significativamente diferentes em função do tempo de compostagem (fases I e II). Para os dois substratos (7 e 14 dias), observa-se um aumento no pH entre o início da compostagem e o final da fase I com posterior redução ao final do condicionamento (Figura 3C, página 43). Este aumento inicial do pH ocorreu em função da correção com calcário calcítico e gesso no dia 0 (início da fase I). A energia bruta apresentou decréscimo ao longo compostagem, com variações significativas entre os diferentes tratamentos (Figura 3D, página 43). Observou-se também, variação significativa da concentração de açúcares solúveis. Assim como a energia bruta, os açúcares solúveis diminuíram com o decorrer da compostagem (Figura 3E, página 43).

A temperatura das pilhas de compostagem na fase I aumentou rapidamente após o segundo dia de compostagem, atingindo o pico de aquecimento no sétimo dia (Figura 4, página 44).

A precocidade (massa de cogumelos colhidos e o período de colheita) apresentou maior produção acumulada antes do trigésimo primeiro dia de produção (metade do ciclo de produção fixado para este experimento) (Figura 5, página 45). Todos os tratamentos apresentaram produção acumulada acima de 50% na primeira metade do ciclo de produção. A produção acumulada até a metade do ciclo de produção (0-31 dias) em relação a produção de todo o período (61 dias) foi de 72, 71, 75 e 71% para os tratamentos de 7 dias de fase I sem condicionamento, 7 dias de fase com condicionamento, 14 dias de fase I sem condicionamento e 14 de fase I com condicionamento, respectivamente.

A produtividade, expressa em percentual de cogumelo fresco em relação ao peso do substrato fresco (Tabela 2, página 40), apresentou diferenças significativas entre os diferentes tempos de compostagem testados. Os resultados mostram que a maior produtividade foi obtida no substrato compostado por 7 dias (fase I) com condicionamento (24,04%).

O número de cachos refere-se à média de cachos por bloco, a qual mostrou variação significativa, onde os substratos com condicionamento mostraram maior número de cachos independente do tempo da fase I (Tabela 2, página 40).

DISCUSSÃO

Qualquer tipo de compostagem, seja para a reciclagem de resíduos ou para o cultivo de cogumelos, é baseado na estabilização físico-química parcial ou total da matéria orgânica (PETERS et al., 2000; TUOMELA et al., 2000). Este processo biológico consiste na mineralização da matéria orgânica (palha, capim, resíduos industriais, etc.) através da ação da comunidade microbiana durante o processo de compostagem (LYONS et al., 2006). A atividade da comunidade microbiana pode ser facilmente acompanhada através da temperatura (SHARMA, 1991) e a seletividade físico-química através da matéria orgânica, pH, relação C/N, açúcares solúveis e energia bruta (STÖLZER; GRABBE, 1991; STRAATSMA et al., 2000).

Os tempos de compostagem testados (7 e 14 dias de fase I com ou sem condicionamento na fase II) mostraram que as variáveis físico-químicas analisadas alteraram-se significativamente durante o processo, exceto a matéria orgânica e relação C/N, exercendo influência significativa na produção do cogumelo. A matéria orgânica, a

relação C/N e energia bruta diminuíram durante a compostagem (Figura 3A, 3B e 3D, página 43), resultado da atividade microbiana intensa (aumento rápido da temperatura) mesmo para um substrato com elevada relação C/N inicial (65:1). Estas alterações foram resultados da redução do teor de nitrogênio livre que ocorre principalmente através da volatilização de amônia (BERTOLDI et al., 1983) e a perda de carbono pela produção de CO₂ (SHARMA, 1991; BARRINGTON et al., 2002). Desta forma, se a perda de carbono e nitrogênio durante o processo de compostagem for acentuada, a relação C/N, teor de matéria orgânica e energia bruta podem reduzir a níveis que afetarão a seletividade do substrato de cultivo para o cogumelo ostra.

O pH das pilhas de compostagem geralmente apresentam variações ao longo da compostagem e o nível de pH ótimo situa-se entre 5,5-8,0 (NOBLE; GAZE, 1996), faixa observada neste experimento. O pH ligeiramente ácido durante todo o período da compostagem não inibiu a bioconversão, como pode ser observado na redução da matéria orgânica, relação C/N, energia bruta e açúcares solúveis (Figura 3A, 3B e 3D, página 43). Ao contrário dos resultados relatados por Hernández et al. (2003), que, testando substrato apenas pasteurizado com pH em torno de 8,3, obtiveram produção menor do que a apresentada neste experimento. Além disso, a perda de nutrientes (principalmente de carbono e nitrogênio) no processo de compostagem pode ser mais pronunciada com níveis de pH mais elevado (BERTOLDI et al., 1983; FERMOR et al., 1985; LYONS et al., 2006).

A redução dos açúcares solúveis em ambos tratamentos (7 e 14 dias durante a fase I e com ou sem condicionamento durante a fase II) foi consequência do consumo pela comunidade microbiana, que mostrou intensa atividade (elevada temperatura) após o estabelecimento do ambiente de compostagem (Figura 4, página 44). Stölzer e Grabbe (1991), investigaram a seletividade do substrato para o cultivo de *Agaricus bisporus* e relataram que o conteúdo de açúcares solúveis do substrato, no final do processo de compostagem, é um fator importante para a seletividade, exercendo pressão seletiva sobre os microrganismos competidores. Assim, a biotransformação destes açúcares solúveis pela comunidade microbiana durante o processo de compostagem é uma "ferramenta biológica" importante, favorecendo o crescimento do cogumelo cultivado e impedindo o surgimento de microrganismos concorrentes (LEÓN; LARA, 2007). Independentemente do tempo de compostagem testado e consequente redução no teor de açúcares solúveis, ambos os tratamentos (7 e 14 dias de fase I, com ou sem

condicionamento durante a fase II) não apresentaram contaminações durante o ciclo de cultivo nestas condições experimentais.

A precocidade pode ser influenciada por diversos fatores, como a condição ambiental (STAMETS, 2000), tipo de solo utilizado na cobertura para o cultivo de champignon (PARDO et al., 2002), teor de nitrogênio no substrato (SILVA et al., 2007) e diferentes linhagens (VIEIRA et al., 2012). Neste experimento, observou-se que independentemente do tempo de compostagem da fase I e II, a produção acumulada foi maior nos primeiros 31 dias de produção (Figura 5, página 45). O uso de apenas uma linhagem pode ter contribuído para estes resultados. Por outro lado, o comportamento agrônômico desta linhagem (POS 09/101) apresentou elevada precocidade, em média mais de 70% da massa total de cogumelos foi colhida na primeira metade do ciclo de produção (entre o 1º e 31º dia de colheita).

Os resultados significativamente diferentes em termos de produtividade observados para os substratos com condicionamento podem ser consequência da biotransformação durante o condicionamento causada principalmente pela ação de actinobactérias e fungos termófilos (WIEGANT, 1992). Straatsma et al. (1989) investigaram a influência de alguns fungos termófilos no crescimento micelial de *Agaricus bisporus*, em substrato experimental, e os resultados mostraram uma relação positiva entre o logaritmo da produção do cogumelo *A. bisporus* e a densidade de *Scytalidium thermophilum*, o qual, segundo os autores, tem efeito seletivo contra bactérias contaminantes durante o crescimento micelial de *A. bisporus*.

Por último, o tempo de compostagem na fase I alterou as variáveis físico-químicas analisadas, mas, 7 ou 14 dias de fase I, com condicionamento, utilizando a palha de cana-de-açúcar e bagaço de cana como matéria-prima base, mostrou que a produção e o número de cachos não diferiram. Portanto, a fase I de 7 dias com condicionamento pode reduzir custos e recursos sem perda de produtividade do cogumelo ostra. Além disso, 7 dias de compostagem (fase I) reduz a poluição ambiental provocada pela compostagem (por exemplo, liberação de gases como o amônia e CO₂).

CONCLUSÕES

- Os diferentes períodos de compostagem durante as fases I e II influenciaram o pH, a energia bruta e os açúcares solúveis;

- A linhagem POS 09/101 apresentou produção acumulada maior na primeira metade do ciclo de produção (0-31 dias);
- Nas condições experimentais deste trabalho, 7 dias de fase I com condicionamento mostrou-se o manejo mais adequado para a elaboração do substrato de cultivo para o cogumelo ostra.

REFERÊNCIAS

- ANPC, Associação Nacional dos Produtores de Cogumelos. (2014)
<http://www.anpc.org.br/index.php/informacoes/139-produtores-brasileiros-de-cogumelos-enfrentam-forte-concorrencia-com-produto-chines>. Acessado em: Set. 2014.
- BARRINGTON, S. et al. Effect of carbon source on compost and carbon losses. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 83, p. 189-194, 2002.
- BERTOLDI, M.; VALLINI, G.; PERA, A. The biology of composting: a review. **Waste Management Research**, Londres, v. 1, p. 157-176, 1983.
- Brasil: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – Manual de métodos analíticos oficiais para fertilizantes minerais, orgânicos, organominerais e corretivos, 2007. Disponível em: http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/PDF/in_28_07_anexo.pdf. Acesso em 25 Mai. 2013.
- CHANG, S. T.; MILES, P. G. **Mushrooms: cultivation, nutritional value, medicinal effect, and environmental impact**. Boca Raton: CRC Press, 2004. 480 p.
- DAVIES, B. E. Loss-on-ignition as an estimate of soil organic Matter. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 38, n. 1, p. 347-353, 1974.
- FERMOR, T. R.; RANDLE, P. E.; SMITH, J. F. Compost as a substrate and its preparation. In: FLEGG, P. B.; SPENCER, D. M.; WOOD, D. A. (eds.). **The Biology and Technology of the Cultivated Mushroom**, Wiley & Sons: Chichester, 1985, v. 1, Cap. 3, p. 81-109.
- FORDYCE Jr. C. Relative numbers of certain microbial groups presente in compost used for mushroom (*Agaricus bisporus*) propagation. **Applied Environmental and Microbiology**, Washington, v. 20, n. 2, p. 196-199, 1970.

GERRITS, J. P. G. Nutrition and compost. In: VAN GRIENSVEN, L. J. L. D. (ed.) **The cultivation of mushrooms** (1. ed.). Rustington: Darlington Mushroom Laboratories, p. 29–72. 1988.

HERNÁNDEZ, D.; SÁNCHEZ, J. E.; YAMASAKI, K. A simple procedure for preparing substrate for *Pleurotus ostreatus* cultivation. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 90, n. 2, p. 145-150, 2003.

JOHNSON, R. R. et al. Corn plant maturity. II. Effect on *In Vitro* cellulose digestibility and soluble carbohydrate content. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 25, p. 617-623, 1966.

LEÓN, V. T. C.; LARA, H. L. Factores que influyen en la producción de substratos selectivos para el cultivo de *Pleurotus ostreatus*. In: VÁZQUEZ J. E. S.; CARRERA, D. M.; MATA, G.; LARA, H. L. (Coord.). **El cultivo de setas *Pleurotus* spp. en México**. Chiapas: Ecosur, 2007. v. 1, Cap. 3, p. 81-90.

LYONS, G. A. et al. Monitoring of changes in substrate characteristics during mushroom compost production. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 54, n. 13, p. 4658-4667, 2006.

NOBLE, R.; GAZE, R. H. Preparation of mushroom (*Agaricus bisporus*) composts in controlled environments: Factors influencing compost bulk density and productivity. **International Biodeterioration and Biodegradation**, Londres, v. 37, n. 1-2, p. 93-100, 1996.

OEI, P. **Mushroom cultivation**. 3. ed. Leiden: Backhuys Publishers, 2003. 429 p.

PARDO, A.; DE-JUAN, J. A.; PARDO, J. E. Bacterial activity in different types of casing during mushroom cultivation *Agaricus bisporus* (Lange) Imbach. **Acta Alimentaria**, Budapest, v. 31, n. 4, p. 327–342, 2002.

PETERS, S. et al. Succession of microbial communities during hot composting as detected by PCR-Single-Strand-Conformation Polymorphism-Based genetic profiles of small-subunit rRNA genes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 33, p. 930-936, 2000.

ROYSE, D. J. et al. Yield, mushroom size and time to production of *Pleurotus cornucopiae* (oyster mushroom) grown on switch grass substrate spawned and

supplemented at various rates. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 91, n. 1, p. 85-91, 2004.

ROYSE, D. J.; SCHISLER, L. C. Yield and size of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus sajor-caju* as effected by delayed-release nutrient. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Heidelberg, v. 26, n. 2, p. 191-194, 1987.

SÁNCHEZ, C. Cultivation of *Pleurotus ostreatus* and other edible mushrooms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Heidelberg, v. 85, n. 5, p. 1321-1337, 2010.

SHARMA, H. S. S. Biochemical and thermal analyses of mushroom compost during preparation. In: MAHER, M. J. (ed.) **Science and cultivation of edible fungi**. Balkema: Rotterdam, 1991, Cap. 4, p. 169-179.

SHARMA, H. S. S.; LYONS, G.; CHAMBERS, J. Comparison of the changes in mushroom (*Agaricus bisporus*) compost during windrow and bunker stages of phase I and II. **Annals of Applied Biology**, Chichester, v. 136, n. 1, p. 59-68, 2000.

SILVA, E. G. et al. Análise química de corpos de frutificação de *Pleurotus sajor-caju* cultivado em diferentes concentrações de nitrogênio. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 1, p. 72-75, 2007.

SILVA, F. A. S.; AZEVEDO, C. A. V. Principal components analysis in the software Assistat-Statistical attendance. In: World congress on computers in agriculture, 2009, Reno. **Proceedings...** Reno/USA: American Society of Agricultural and Biological Engineers. 2009. p. 56-62.

SINDEN, J. W.; HAUSER, E. The short method of composting. **Mushroom Science**, Leamington Spa, v. 1, p. 52-59, 1950.

SINDEN, J. W.; HAUSER, E. The nature of the composting process and its relation to short composting. **Mushroom Science**, Leamington Spa, v. 2, p. 123, 1953.

STAMETS, P. **Growing gourmet, medicinal mushrooms**. Berkeley: Ten Speed Press, 2000. 545 p.

STAMETS, P. **Mycelium running: how mushrooms can help save the world**. Berkeley: Ten speed press, 2005. 330 p.

STÖLZER, S.; GRABBE, K. Mechanisms of substrate selectivity in the cultivation of edible fungi. In: MAHER, M. J. (ed.) **Science and cultivation of edible fungi**. Rotterdam: Balkema. 1991. Cap. 3, p. 141-146.

STRAATSMA, G. et al. Population dynamics of *Scytalidium thermophilum* in mushroom compost and stimulatory effects on growth rate and yield of *Agaricus bisporus*. **Journal of General Microbiology**, Shinfield, v. 135, n. 4, p. 751-759, 1989.

STRAATSMA, G. et al. Adjustment of the composting process for mushroom cultivation based on initial substrate composition. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 72, n. 1, p. 67-74, 2000.

STRAATSMA, G. et al. 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, 1994.

SONG, J. et al. Phylogenetic diversity of thermophilic actinomycetes and *Thermoactinomyces* spp. isolated from mushroom composts in Korea based on 16S rRNA gene sequence analysis. **FEMS Microbiology Letters**, Chichester, v. 202, n. 7, p. 97-102, 2001.

SZÉKELY, A. J. et al. DGGE and T-RFLP analysis of bacterial succession during mushroom compost production and sequence-aided T-RFLP profile of mature compost. **Microbial Ecology**, New York, v. 57, n. 3, p. 522-533, 2009.

TUOMELA, M. et al. Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 72, n. 2, p. 169-183, 2000.

VAN LIER, J. J. C. et al. Composting of Mushroom substrate in a fermentation tunnel: compost parameters and a mathematical model. **Journal of Agricultural Science**, Washington, v. 42, n. 4, p. 271-292, 1994.

VIEIRA, F. R. et al. Growth of *Pleurotus ostreatus* in culture media based on formulated straw or grass. **African Journal of Agricultural Research**, Victoria Island, v. 8, n. 23, p. 2345-2352, 2012.

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

Tabela 1. Formulação do substrato para o cultivo do cogumelo ostra (*Pleurotus ostreatus*).

Matéria-prima	kg			C/N
	Massa seca	Teor de N	Teor de C	
Bagaço de cana	140,00	0,48	68,46	142,6/1
Palha de cana	164,00	0,98	83,80	85,5/1
Farelo de arroz	21,50	0,73	14,87	20,4/1
Farelo de trigo	18,00	0,49	9,11	19/1
Calcário calcítico	3,00	--	--	--
Gesso	3,00	--	--	--
Total	349,50	2,68	176,24	--
Relação C/N inicial Fase I	--	--	--	65/1

Tabela 2. Produtividade e número de cachos de *Pleurotus ostreatus* cultivado em substratos com 7 e 14 dias de fase I com ou sem condicionamento (fase II).

----- Compostagem -----		
Fase I	Fase II sem condicionamento	Fase II com condicionamento
Produtividade, %		
7 dias	19,61 b B	24,04 a A
14 dias	22,68 a A	22,83 a A
CV %	11,70	
Número de cachos		
7 dias	57,60 a B	66,30 a A
14 dias	58,00 a B	68,90 a A
CV %	17,89	

Para cada variável, médias seguidas de mesma letra minúsculas, nas colunas e, mesma letra maiúscula nas linhas, não diferem estatisticamente entre si (teste de Tukey, 5%)

CV = coeficiente de variação.

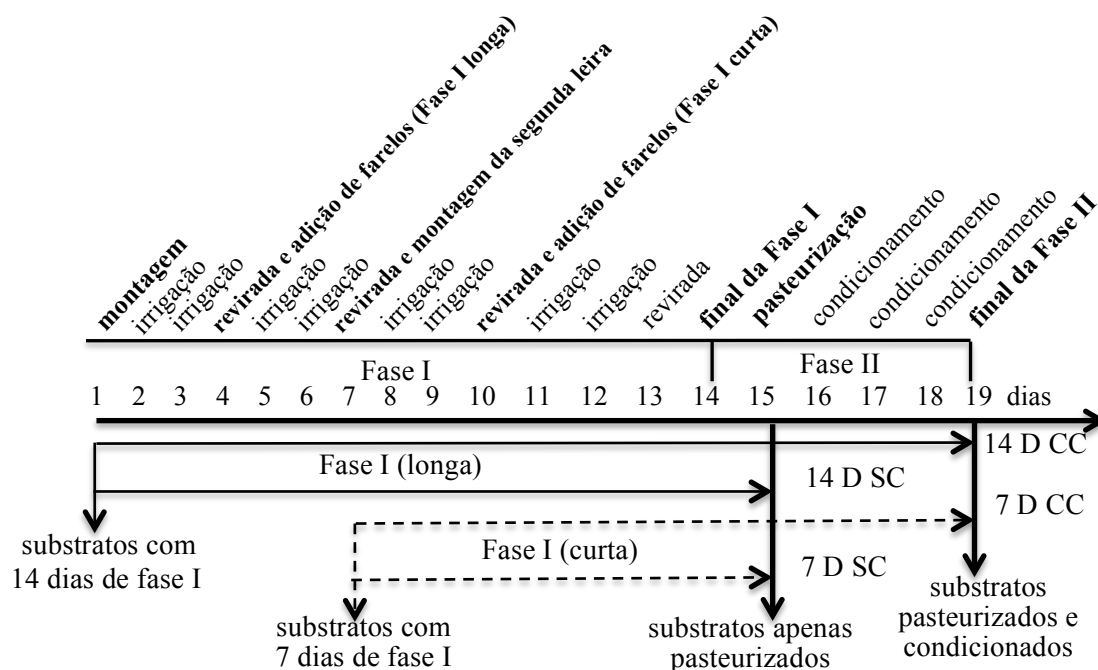


Figura 1. Procedimentos e tempos da compostagem (fase I com 7 e 14 dias e fase II com ou sem condicionamento). Substratos: 7 D SC – sete dias de compostagem (fase I) sem condicionamento; 7 D CC – sete dias de compostagem (fase I) com condicionamento; 14 D SC – quatorze dias de compostagem (fase I) sem condicionamento e; 14 D CC – quatorze dias de compostagem (fase I) com condicionamento.

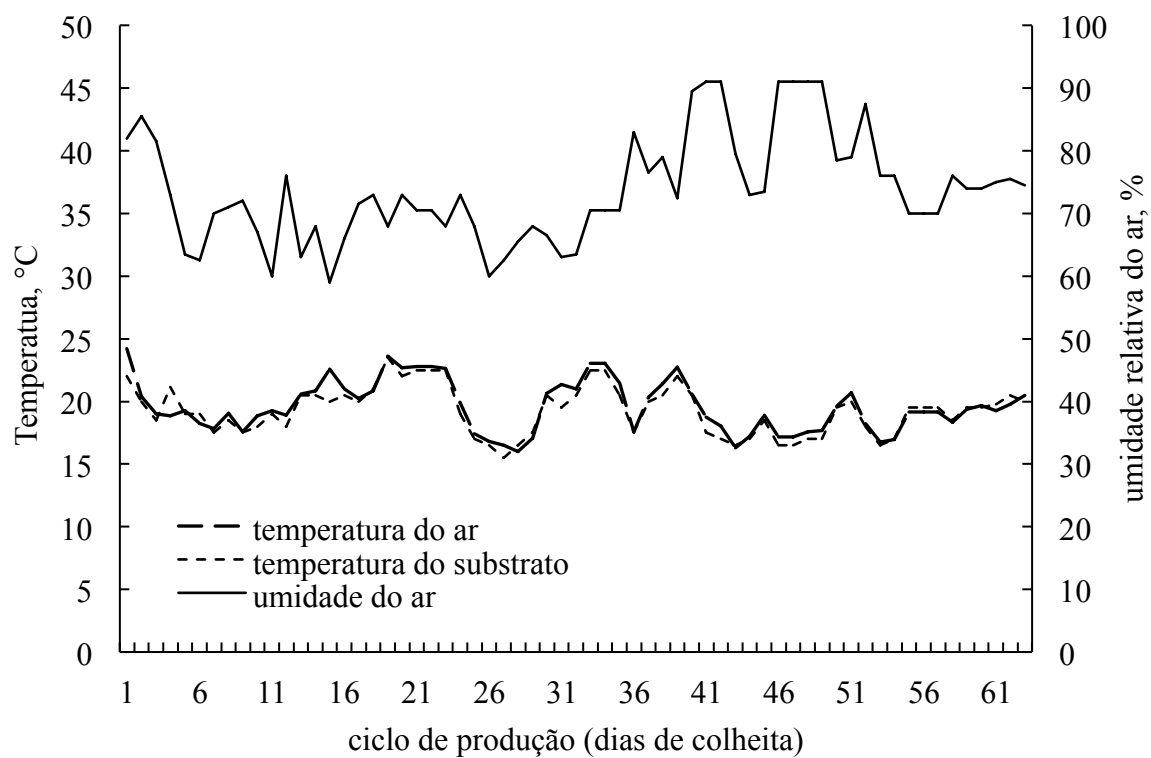


Figura 2. Temperatura do ar, temperatura do substrato e umidade do ar na estufa de produção durante o período de produção do experimento.

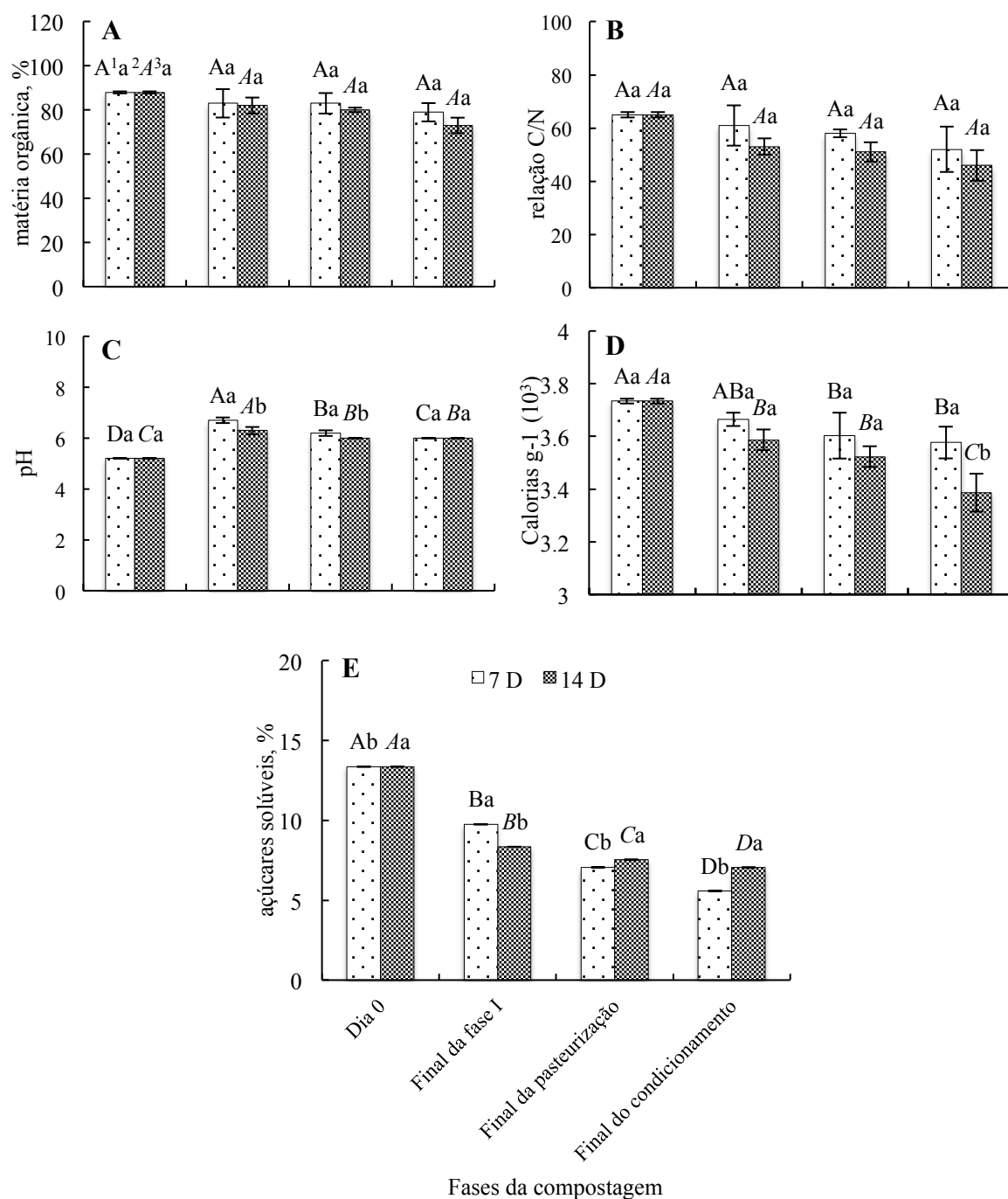


Figura 3. Variáveis físico-químicas do substrato durante a compostagem (fases I e II), **A** - matéria orgânica (base seca); **B** - relação C/N; **C** - pH; **D** - energia bruta (calorias g⁻¹, base seca); **E** - açúcares solúveis (base seca); 7 D - fase I curta, sete dias; 14 D - fase I longa, quatorze dias.

¹ médias seguidas de letras maiúsculas iguais no substrato de 7 dias durante a compostagem não diferem estatisticamente entre si (teste Tukey, 5%);

² médias seguidas de letras maiúsculas em itálico iguais no substrato de 14 dias durante a compostagem não diferem estatisticamente entre si (teste Tukey, 5%);

³ médias seguidas de letras minúsculas iguais para os diferentes substratos (7 e 14 dias) no mesmo momento da compostagem não diferem estatisticamente entre si (teste Tukey, 5%); Desvio padrão nas barras para cada tratamento.

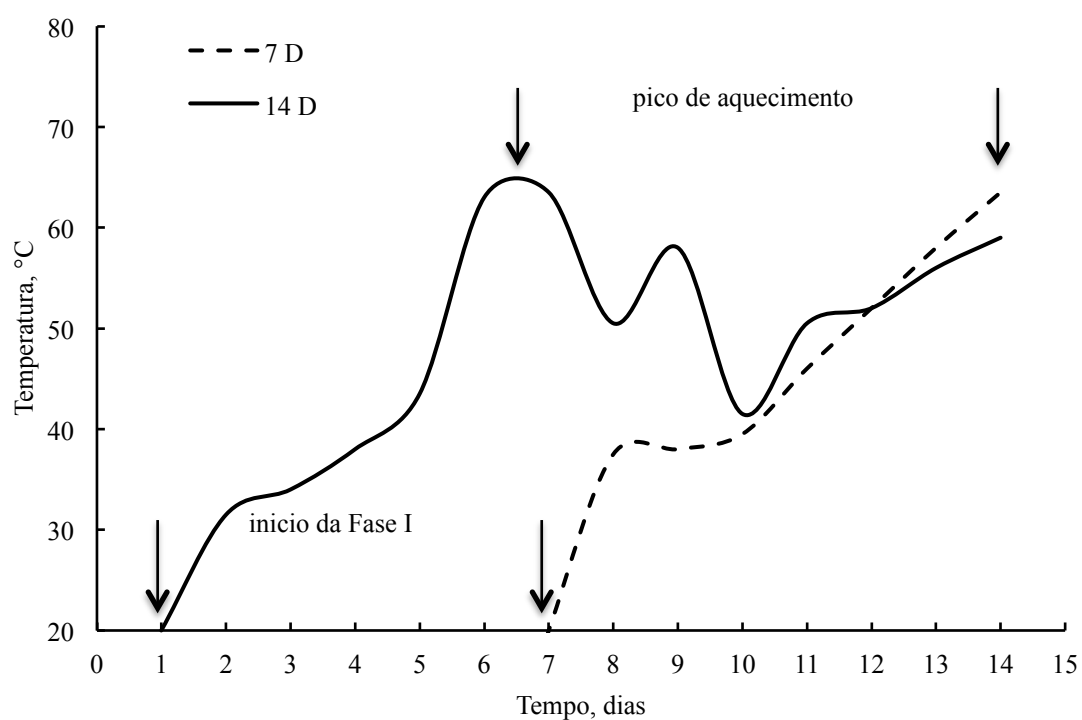


Figura 4. Temperatura das leiras de compostagem durante a fase I com o pico de aquecimento indicado na parte superior do gráfico e na parte inferior do gráfico, a temperatura no início da compostagem (7 D – sete dias de compostagem; 14 D quatorze dias de compostagem).

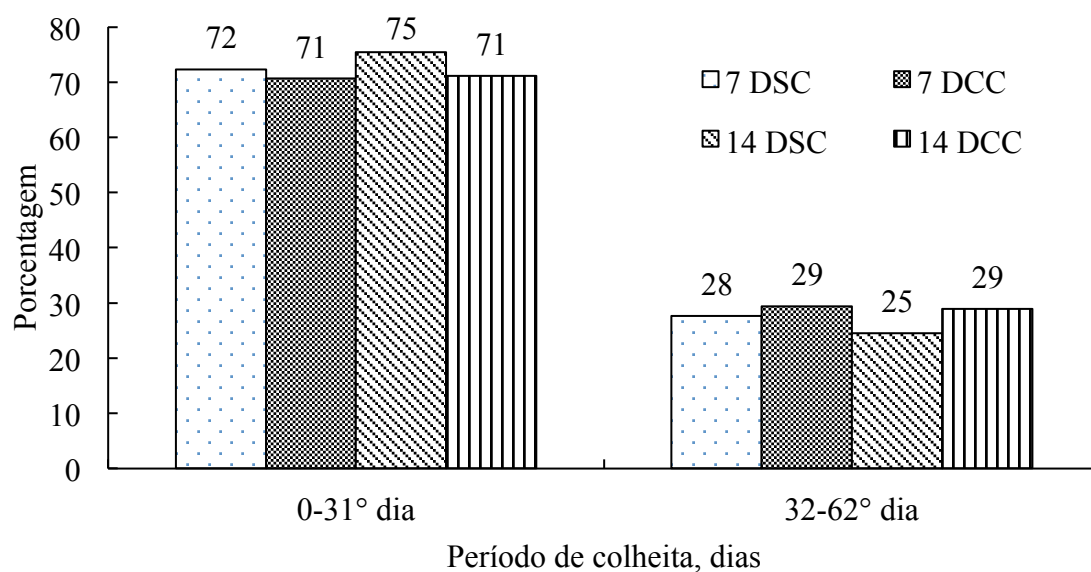


Figura 5. Produção acumulada (precocidade) em função de diferentes tempos da compostagem (fases I e II); 7 DSC – sete dias de compostagem na fase I sem condicionamento; 7 DCC – sete dias de compostagem na fase I com condicionamento; 14 DSC – quatorze dias de compostagem na fase I sem condicionamento e; 14 DCC – quatorze dias de compostagem na fase I com condicionamento.

CAPÍTULO II

METAGENÔMICA DA COMUNIDADE MICROBIANA, VARIÁVEIS FÍSICO-QUÍMICAS E PRODUTIVIDADE DO COGUMELO OSTRA (*Pleurotus ostreatus*) EM DIFERENTES TEMPOS DE COMPOSTAGEM (FASE I)

RESUMO

Embora o cultivo do cogumelo ostra (*Pleurotus ostreatus*) esteja em plena expansão, pouco se sabe sobre seletividade (físico-química e biológica) do substrato de cultivo, especialmente em relação ao tempo da compostagem. Neste sentido, objetivou-se avaliar a influência do tempo de compostagem da fase I na dinâmica da comunidade microbiana (metagenômica), composição físico-química final do substrato e a produtividade de cogumelos. Para isso, realizou-se a compostagem curta à base de palha de cana-de-açúcar suplementada com farelo de trigo (relação C/N de 70:1) em três diferentes tempos de compostagem (5, 10 e 15 dias de fase I). A metagenômica da comunidade microbiana durante a compostagem revelou que a sucessão das populações bacterianas e fúngicas é intensa, e variou de acordo com estágio da compostagem (mesófila-termófila-mesófila). Dos 13 filos detectados pelo sequenciamento, Proteobacteria foi predominante em todos os momentos da compostagem. O gênero bacteriano *Acinetobacter* foi o mais abundante em todos os momentos da compostagem, exceto no dia 0, onde *Pantoea* foi predominante. O maior número de gêneros bacterianos foi observado ao final da compostagem de 15 dias. O filo fúngico mais abundante foi Ascomycota, com predominância dos gêneros

Mycothermus, *Aspergillus*, *Penicillium* e *Cladosporium*, com redução no número de gêneros ao longo da compostagem. O tempo de compostagem da fase I influenciou significativamente a produtividade e o número de cachos. Os melhores resultados foram obtidos nos substratos com menor tempo de compostagem (5 e 10 dias), independente da linhagem utilizada, sugerindo que a seletividade do substrato está relacionado com o tempo da compostagem (manejo) e, conseqüentemente, com a atividade microbiana durante a compostagem, a qual é responsável em preparar os nutrientes para o cogumelo a ser cultivado. Assim, conclui-se que, para o cultivo do cogumelo ostra, é recomendável uma compostagem curta, de até 10 dias de fase I, resultando em menor custo de produção e poluição ambiental sem perda de produtividade.

Palavras chave: *Pleurotus ostreatus*, metagenômica, produtividade, variáveis físico-químicas.

METAGENOMIC OF MICROBIAL COMMUNITY, PHYSICOCHEMICAL VARIABLES AND OYSTER MUSHROOM YIELD (*Pleurotus ostreatus*) IN DIFFERENT COMPOSTING TIMES (PHASE I)

ABSTRACT

Although the oyster mushroom cultivation is rapidly expanding, little known about selectivity of substrate cultivation, especially about composting time (phase I). Thus, this study aimed to evaluate influence of composting time (phase I) in the microbial community, physicochemical variables (organic matter, C/N ratio, crude energy, soluble sugars, cellulose, hemicellulose and lignin) and mushroom yield. For this, was elaborated a substrate of sugarcane straw supplemented with wheat bran (C/N ratio of 70:1) prepared at three different composting times (5, 10 and 15 days of phase I). The metagenomic of microbial community during composting revealed that succession of bacterial and fungal populations is intense, varying according of composting stage (mesophilic-thermophilic-mesophilic). Thirteen bacterial phyla were detected by sequencing. Proteobacteria was predominant at all composting times (0, 5, 10 and 15 days). The bacterial genus *Acinetobacter* was the most abundant in all composting times, except at day 0, where *Pantoea* was predominant. The largest number of bacterial genera was observed at the end of 15 days of composting. The most abundant fungal phylum is Ascomycota, with

predominance of *Mycothermus*, *Aspergillus*, *Penicillium* and *Cladosporium* genera, decreasing in number of genera during the composting. The time of phase I composting influenced the yield and number of clusters. The higher yields were obtained on substrates with shorter composting time (5 and 10 days), suggesting that substrate selectivity is related to composting time (management) and consequently with microbial activity during the composting, which is responsible to prepare the nutrients for mushroom cultivation. Conclude that for oyster mushroom cultivation, a short composting is recommended up to 10 days of phase resulting reduction of production cost and less environmental pollution.

Keywords: *Pleurotus ostreatus*, metagenomic, yield, composting, physicochemical variables.

INTRODUÇÃO

Entre os cogumelos comestíveis cultivados comercialmente, o cogumelo ostra (*Pleurotus ostreatus*) tem se destacado atualmente na fungicultura mundial, principalmente na Europa e Américas (fora da tradicional zona produtora Ásia) (LEE et al., 2002; ROYSE, 2013; ANPC, 2014).

Como decompositor primário, o cogumelo ostra possui uma robusta maquinaria enzimática, permitindo-o utilizar uma ampla gama de matérias-primas através da aplicação de técnicas de cultivo relativamente simples (BAYSAL et al., 2003; STAMETS, 2000; SÁNCHEZ, 2010). No entanto, a produção em escala industrial requer matérias-primas disponíveis em abundância (subprodutos agrícolas como palhas e capins) e técnicas mais sofisticadas de cultivo (CHANG; MILES, 2004; VIEIRA, 2012).

Dentre as técnicas disponíveis para a elaboração do substrato de cultivo, a compostagem curta, seguida de pasteurização e condicionamento, é largamente utilizada pela indústria de cogumelos. A compostagem baseia-se no princípio da digestão enzimática, através da intensa atividade microbiana (STAMETS, 2005). Desta forma, a seletividade do substrato está diretamente relacionada com o manejo da compostagem (duração, formulação e etc.), o qual interfere no desenvolvimento da comunidade microbiana e, conseqüentemente, nas propriedades físico-químicas do substrato, suprimindo ou não, as exigências nutricionais do cogumelo a ser cultivado.

A compostagem como método de preparo do substrato foi inicialmente desenvolvida para o cultivo do champignon (decompositor secundário) e está

dividida em duas fases: 1. fermentação aeróbia (fase I, parcialmente controlada); e 2. pasteurização e condicionamento (fase II, realizada em ambiente controlado). A fase I, é responsável pela preparação dos nutrientes (digestão da matéria orgânica) e a fase II, pela sanitização e maturação do substrato (eliminação de microrganismos competidores, pragas e eliminação da amônia livre) (SINDEN; HAUSER, 1950; VAN GRIENSVEN, 1988; STRAATSMA et al., 2000).

Como ponto chave da compostagem, a comunidade microbiana envolvida no processo tem sido bem estudada, porém devido à complexidade deste microbioma e limitações nas técnicas utilizadas em estudos de ecologia microbiana, a compreensão deste sistema biológico ainda é insuficiente (TORSVIK et al., 2002; NEHER et al., 2013).

Alguns estudos foram realizados sobre a comunidade microbiana da compostagem para o cultivo de cogumelos *Agaricus* (champignon e o cogumelo medicinal *Agaricus subrufescens*) (STRAATSMA et al., 1994; SONG et al., 2001; NTOUGIAS et al., 2004; SZÉKELY et al., 2009; SILVA et al., 2009). Por outro lado, pouco se sabe sobre a compostagem para o cultivo do cogumelo ostra, principalmente em relação ao tempo de compostagem e composição físico-química ideal do substrato final. Vajna et al. (2010; 2012), foram os pioneiros em abordar a comunidade microbiana na compostagem para o cultivo do cogumelo ostra. Estes autores, utilizando técnicas moleculares (fingerprint) e métodos dependentes de cultura, reportaram a predominância de diferentes grupos bactérias durante a compostagem e ausência de fungos no pico de aquecimento.

Desta forma, a aplicação de técnicas mais robustas (técnicas independentes de cultura) para o estudo da dinâmica microbiana durante a elaboração do substrato de cultivo contribuirá para melhor compreensão do processo de preparo do substrato, auxiliando na tomada de decisão sobre o manejo da compostagem. Entre as técnicas moleculares (independente de cultivo), o sequenciamento de alto rendimento tem se mostrado promissor para a identificação e caracterização de táxons presentes nas comunidades microbianas ambientais. Mais recentemente, a metagenômica, reunindo um conjunto de técnicas moleculares, tem permitido a análise massiva de microrganismos em diversos ambientes (HANDELSMAN et al., 1998; HANDELSMAN, 2005; MARTINS et al., 2013; CHANDNA et al., 2013).

Neste sentido, objetivou-se avaliar a influência do tempo de

compostagem da fase I na dinâmica da comunidade microbiana (metagenômica), composição físico-química final do substrato e a produtividade de cogumelos.

MATERIAL E MÉTODOS

Linhagens de *Pleurotus ostreatus*, substrato de cultivo e compostagem

As linhagens POS 09/101 e POS 13/113 (basidiomas de cor cinza-clara) foram selecionadas a partir de dois cultivos comerciais nas cidades de São Pedro e Botucatu, respectivamente, ambas localizadas no Estado de São Paulo. O inóculo foi preparado usando-se grãos de trigo fervidos em água durante 35 minutos, com posterior ajuste do pH para 7 com carbonato de cálcio 10 g.kg⁻¹ e gesso 10 g.kg⁻¹ (peso úmido) (ROYSE; SCHISLER, 1987).

O substrato foi elaborado a base de palha da cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.), fornecida pela cooperativa dos produtores de cana de Lençóis Paulista – SP). Foram adicionados 6,5% (base seca) de farelo de trigo para ajustar a relação C/N inicial em 70:1 e 3 kg de calcário calcítico e 2 kg de gesso agrícola para ajuste do pH inicial do substrato em torno de 6,5 (Tabela 1, página 66). As pilhas de compostagem foram montadas com cerca de 5 m de comprimento x 2,5 m de largura x 1,6 m de altura e irrigadas diariamente para manter a umidade entre 70-75% durante a fase I.

As pilhas de compostagem foram reviradas e/ou homogeneizadas a cada 48 horas. A duração da compostagem teve os tempos predeterminados de 5, 10 e 15 dias e, subsequentemente, ao final da fase I (compostagem em ambiente aberto), o substrato foi transferido para caixas treliçadas (aproximadamente 15 kg de substrato por caixa), as quais foram acomodadas de forma aleatória no interior do túnel de pasteurização (fase II – controlada, câmara climatizada modelo “Dalsem Mushroom”). No túnel de pasteurização, o substrato foi aquecido com auxílio de vapor de água e mantido a 59,5°C, durante 8 horas, seguido imediatamente pelo condicionamento a 46,5°C, durante 72 horas. Os procedimentos resumidos de todo o processo da compostagem (fases I e II) estão descritos na Figura 1 da página 67.

Após o condicionamento (final da fase II), o substrato ainda dentro do túnel de pasteurização foi arrefecido a 25°C para a realização da inoculação. Os blocos de substrato (8 kg de substrato fresco) foram inoculados com 22,5 g.kg⁻¹ de inóculo e

incubados sob condições controladas em câmara climatizada (Dalsem Mushroom) a 25°C, 80% de umidade relativa, com ausência de luz, durante 15 dias, antes de ser transferido para a estufa de produção.

Instalações de produção (estufa)

A estufa utilizada para a produção é coberta com telha de cerâmica e protegida com tela e cortinas de plástico leitoso retrátil nas laterais. O choque térmico para induzir a frutificação ocorreu naturalmente, de acordo com a variação de temperatura, que foi entre 16-32°C durante o período do experimento (primavera) (Figura 2, página 68). A umidade relativa na estufa de produção foi mantida, em média, a 75% por nebulização no interior da estufa.

Variáveis de produção

A produtividade foi determinada de acordo com Royse et al. (2004), sendo a massa fresca de cogumelo dividida pelo massa fresca do substrato multiplicado por 100, expressa em %. A primeira colheita ocorreu cinco dias após o término da incubação, estendendo-se por mais 56 dias. Os cogumelos foram colhidos manualmente quando atingiram o tamanho do píleo entre 1,5-3cm de diâmetro, contados e pesados antes de ser calculado o rendimento.

O número de cachos (NC) foi calculado a partir da contagem dos cachos de cada repetição, gerando uma média por tratamento (10 repetições).

Amostragem e extração de DNA genômico

Foram tomadas amostras das três pilhas de compostagem no tempo 0 (início da compostagem) e no final da compostagem (5, 10 e 15 dias) (Figura 3, página 69). Cada amostra foi composta a partir da coleta de 10 sub-amostras de 50 gramas em cada uma das pilhas e, posteriormente, estas foram homogeneizadas o melhor possível em recipiente estéril, formando uma amostra composta de 0,5 kg que imediatamente foi armazenada à -20°C e posteriormente a -80°C até à extração do DNA.

Antecedendo a extração do DNA genômico, 10g de substrato foram submersas em 30 mL de solução salina (NaCl, 0,9%) e mantidas sob agitação por 8 horas. Posteriormente, transferiu-se 10 mL desta solução para um tubo tipo falcon de 15mL, o qual foi centrifugado a 4000 rpm por 20 minutos a 4°C, e, com o descarte do sobrenadante, obteve-se o “pellet” celular. Deste “pellet” celular, 400 mg foram utilizados para a extração do DNA genômico utilizando o kit SPIN FastDNA® para solo (MP-Biomedicals) de acordo com as instruções do fabricante. A pureza e a concentração do DNA genômico extraído foram analisadas por quantificação espectrofotométrica (NanoDrop modelo 2000c, Thermo Scientific) e visualizadas em eletroforese, gel de agarose 1%, 100 v durante 45 minutos. Para assegurar a qualidade do DNA genômico, realizou-se a remoção de ácidos húmicos e outras impurezas provenientes da amostra com o kit de limpeza DNA PRO PowerClean® (MP-Biomedicals), de acordo com as instruções do fabricante e, posteriormente, realizou-se novamente a quantificação espectrofotométrica e visualização por eletroforese em gel de agarose a 1%, 100 v durante 45 minutos.

Amplificação da região 16S

Os iniciadores (*primers*) utilizados para amplificação da região 16S rRNA (F515 5'-GTG CCA GCM GCC GCG TAA-3' e R806 5'-GGA CTA CHV GGG TWT CTA AT-3') assim como a metodologia baseou-se na proposta sugerida por Caparoso et al. (2012). A reação da PCR foi realizada a partir de 40 ng de DNA genômico, da seguinte forma: 5 µL de tampão 5X (OneTaq standard buffer), 0,5 µL de dNTPs (concentração de 10 µM cada), 0,5 µL de cada *primer* (forward e reverse, concentração de 10 µM), 0,15 µL OneTaq DNA polymerase (New England BioLabs) e água livre de nuclease (Qiagen Sciences, Maryland, USA) com reação final ajustada para volume de 25 µL. As condições de amplificação foram: 94°C por 3 minutos, seguidos de 30 ciclos de 94°C por 30s, 50°C por 45s e 68°C por 60s, com extensão final de 5 minutos a 68°C. As amplificações foram realizadas em triplicata (25 µL) e 5 µL dos produtos da PCR foram utilizados para a visualização em eletroforese (gel de agarose 1%, 100 v por 45 minutos). Após confirmação do tamanho dos fragmentos (entre 300-330pb), fez-se um “pool” das três amplificações, totalizando 60 µL, as quais foram novamente visualizados em gel de agarose, confirmando os tamanho dos fragmentos entre ~315 pb.

Amplificação da região ITS1

Para a amplificação da região ITS1 utilizaram-se os *primers* específicos ITS1F12 (forward *primer*) 5'-GAA CCW GCG GAR GGA TCA-3' e ITS2 (reverse *primer*) 5'- GCT GCG TTC TTC ATC GAT GCC-3' desenvolvidos por Schmidt et al. (2013) e White et al. (1990), respectivamente. Utilizou-se o mesmo DNA genômico para bactérias (16S rRNA) e fungos (ITS1), alterando-se somente as condições da PCR. A reação da PCR foi realizada a partir de 40 ng de DNA, da seguinte forma: 5 µL de tampão 5X (Q5 standard buffer), 0,5 µL de dNTPs (concentração de 10 µM cada), 1,25 µL de cada *primer* (forward e reverse, concentração de 10 µM), 0,25 µL Q5 Hot Start DNA polymerase (New England BioLabs) e água livre de nuclease (Qiagen Sciences, Maryland, USA) com reação ajustada para volume final de 25 µL. As condições de amplificação foram: 98°C por 30 segundos, seguidos de 35 ciclos de 98°C por 10s, 68°C por 30s e 72°C por 20s, com extensão final de 2 minutos a 72°C. As amplificações foram realizadas em triplicata (25 µL) e visualizadas individualmente em gel de agarose (1%, 100 v por 45 minutos) e, após confirmação do tamanho dos fragmentos, fez-se um “pool” das três amplificações, totalizando 60 µL, dos quais 5 µL foram novamente visualizados em gel de agarose, confirmando os tamanhos dos fragmentos entre 300-320 pb.

Montagem das bibliotecas e sequenciamento via *MiSeq Illumina*

A montagem das bibliotecas de DNA e o sequenciamento na plataforma *MiSeq Illumina* seguiram o protocolo “16S Metagenomic sequencing library preparation” sugerido pela fabricante (Illumina). Resumidamente, após a primeira amplificação (região de interesse, 16S e ITS1), os produtos da PCR foram purificados com o auxílio de “micro esferas magnéticas” (AmPure magnetic beads) e qualificados (tamanho do fragmento) através da eletroforese capilar (Agilent 2100 Bioanalyzer). Posteriormente, realizou-se um segundo “round” da PCR inserindo os index Illumina (código de barras). Os produtos da segunda PCR foram novamente purificados e qualificados no Bioanalyzer. A normalização das bibliotecas foi realizada com auxílio do Qubit dsDNA kit, seguindo as instruções do fabricante. Utilizou-se o kit *Nextera XT* e o *MiSeq Reagent Kit V2* de 500 ciclos, capaz de gerar fragmentos finais de 300 pares de base (paired-end 300 x 300 bp).

Processamento dos dados após o sequenciamento

Os arquivos foram baixados do servidor (Huck Institute Life Science) no formato *fasta* e analisados no software Mothur (SCHLOSS et al., 2013), seguindo o protocolo proposto por Kozich et al., (2013). O sequenciamento gerou cerca de 800 mil sequências brutas (200 mil sequências para cada amostra). Resumidamente, os arquivos contendo forward e reverse “reads” foram pareados, removido os primers, selecionados em relação ao tamanho (~250 bp sem iniciadores), clusterizados, remoção de quimeras e classificados em nível de filo e gênero utilizando o banco de dados SILVA para bactérias (QUAST et al., 2013) e UNITE versão 7 a 99% de similaridade para fungos (KÖLJALG et al., 2013). Após a classificação, os dados foram descarregados e manipulados em Excel, além da utilização do diagrama de Venn (BARDOU et al., 2014).

Variáveis físico-químicas do substrato

As amostras utilizadas para as análises físico-químicas foram as mesmas utilizadas para a análise filogenética, ou seja, no início da compostagem (dia 0) e final da compostagem na fase I (5, 10 e 15 dias) (Figura 3, página 69).

Para a relação C/N, primeiramente a matéria orgânica foi calculada pelo método de "perda por ignição", em que 1g de substrato previamente triturado e seco a 105°C, durante 3h e, incinerada na mufla a 550°C durante 1 hora (adaptado de DAVIES, 1974). Subsequentemente, o carbono total (Ct) foi calculado, usando a seguinte equação:

$$Ct = \frac{(P1-P2)}{1.8} \cdot 100$$

P1 - peso inicial;

P2 - peso final (após incineração na mufla);

1.8 - coeficiente.

O teor de nitrogênio foi mensurado pelo método de Kjeldahl, utilizando-se o ácido sulfúrico concentrado a 70% na presença de um catalisador aquecido a 100 °C/60'; 150°C/50'; 200°C/40'; 250°C/40' e 350°C/40' (adaptação do método,

aquecimento gradual) e posterior titulação do nitrogênio de acordo com Brasil (2007). Para calcular a relação C/N, foi utilizado o valor do carbono total / nitrogênio total (base seca).

A energia bruta, ou poder calorífico, foi determinada pelo método da bomba calorimétrica (modelo IKA C200). Para isso, 1g da amostra (substrato) foi seco a 105°C (4 horas) e moída em moinho de facas com peneira de 30 mesh. A combustão da amostra foi realizada no interior do equipamento que, após a queima do material, gerou um valor de calorias por grama de substrato.

Para o cálculo de pH foram usados 10 g da amostra (substrato úmido) e 50mL de CaCl_2 a 0,01 mol/L, em agitação durante 30 minutos, posteriormente o pH foi mensurado com peagâmetro Micronal B474 conforme Brasil (2007).

O açúcar solúvel foi determinado pelo método do colorimétrico modificado para a determinação de hidratos de carbono solúveis (JOHNSON et al., 1966). A adaptação do método consiste na criação de curva padrão com glicose e xilose.

A lignina foi determinada a partir do método de Van Soest (1963) e Van Soest e Wine (1968) (FDN e FDA), utilizando ácido sulfúrico concentrado a 72%, seguido por incineração do resíduo obtido a 500 °C por 2 h. A celulose sequencialmente, por diferença de pesos, a partir do resíduo resultante da determinação da lignina e, por último, a hemicelulose, através da diferença dos valores de FDN e FDA.

A temperatura na primeira fase de compostagem (fase I) foi determinada utilizando um termômetro de haste longa (PT 100), em seis pontos da pilha de compostagem, gerando uma média de temperatura da pilha durante o período de compostagem (5, 10 e 15 dias da fase I).

Delineamento experimental

O experimento foi um fatorial 2 x 3 (duas linhagens x três tempos de compostagem - fase I) com dez repetições para as variáveis de produção (produtividade e número de cachos), e três repetições para as variáveis físico-químicas do substrato (matéria orgânica, relação C/N, energia bruta, açúcares solúveis, lignina, hemicelulose e celulose). Somente os dados de produção (produtividade e número de cachos) foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e as médias comparadas pelo teste de Tukey, utilizando o software estatístico ASSISTAT 7.7 (SILVA; AZEVEDO, 2009).

RESULTADOS

A temperatura média nas pilhas de compostagem (fase I), mostraram claramente a distinção entre as fases mesófila e termófila. A transição entre a fase mesófila ($\leq 45^{\circ}\text{C}$) e a fase termófila ($>45^{\circ}\text{C} \sim 70^{\circ}\text{C}$) foi, em média, de 3 dias em todas as pilhas (5, 10 e 15 dias) (Figura 3, página 69).

A metagenômica da comunidade bacteriana revelou a presença de 13 filos, dentre os quais, Proteobacteria, Firmicutes e Bacteroidetes apresentaram abundância relativa superior a 1% (Figura 4, página 70).

A distribuição da comunidade bacteriana em nível de gênero revelou que o *Acinetobacter* foi predominante em todos os momentos da compostagem, exceto no dia 0, onde o gênero *Pantoea* mostrou-se predominante (Figura 5, página 71). O número total de gêneros bacterianos aumentou ao longo da compostagem de 78, no dia 0, para 96, 103 e 113, nos dias 5, 10 e 15, respectivamente (Figura 6, página 72).

A comunidade fúngica revelou a presença de 3 filos, Basidiomycota, Ascomycota e Zygomycota. Destes, Ascomycota foi o mais abundante em todos os momentos da compostagem, seguido por Basidiomycota e Zygomycota (Figura 7, página 73).

Os gêneros fúngicos mais abundantes foram *Cladosporium* e *Aspergillus* no início da compostagem, *Aspergillus* e *Penicillium*, no dia 5, e *Mycothermus* nos dias 10 e 15 (Figura 8, página 74). O número de gêneros fúngicos foi inferior ao número de gêneros bacterianos, um total de 48. Ao contrário da comunidade bacteriana, o número de gêneros diminuiu de 42 no dia 0 para 20, 4 e 4 nos dias 5, 10 e 15 da compostagem, respectivamente (Figura 9, página 75).

A relação C/N do substrato apresentou redução de 2,16, 10,77 e 23,08%, para os tempos 5, 10 e 15 dias de compostagem, respectivamente (Figura 10A, página 76). Assim como a relação C/N, a energia bruta também diminuiu ao longo da compostagem (Figura 10A, página 76). Os açúcares solúveis presentes inicialmente no substrato diminuíram após o primeiro dia de compostagem (Figura 10B, página 76), bem como o teor de matéria orgânica (Figura 10B, página 76).

O percentual de celulose, hemicelulose e lignina diminuíram com o decorrer da compostagem (Figura 11, página 77). A redução desses componentes em relação à porção insolúvel total da palha de cana foi de 75,05%, 73,79%, 70,53% e 66,43%

nos dias 0, 5, 10 e 15 dias de compostagem, respectivamente. Observa-se também que além da redução total, os componentes que tiveram maior redução foram a celulose e a hemicelulose a partir de 10 dias de compostagem.

Em relação ao rendimento de cogumelos, os melhores resultados foram obtidos com o substrato elaborado a partir da compostagem de 5 dias. A produtividade no substrato compostado por 5 dias foi de 33,34 % e 31, 87% para as linhagens POS 09/101 e POS 13/113, respectivamente. Assim como a produtividade, o número de cachos também foi superior no substrato obtido a partir da compostagem de 5 dias, 35,7 e 33,7 para as linhagens POS 09/101 e POS 13/113, respectivamente (Figuras 12A e 12B, página 78).

DISCUSSÃO

A temperatura mínima de 45°C e máxima de 72°C durante a compostagem mostrou que, mesmo para um substrato com relação C/N inicial de 70:1, houve uma considerável taxa de oxidação do substrato.

O número de filos e gêneros bacterianos detectados neste experimento foi superior aos de estudos anteriores, que também avaliaram a comunidade microbiana da compostagem para o cultivo de cogumelos utilizando técnicas moleculares menos robustas (SZÉKELY et al., 2009; VAJNA et al., 2010; VAJNA et al., 2012) ou do substrato exaurido (SONG et al., 2001). A predominância de sequências de representantes bacterianos pertencentes aos filos Proteobacteria, Firmicutes e Bacteroidetes foi reportada anteriormente e está associada a compostagem (RYCKEBOER et al., 2003; CHANDNA et al., 2013; NEHER et al., 2013; MARTINS et al., 2013). Dos 250 gêneros bacterianos detectados em todos os momentos da compostagem (0, 5, 10 e 15 dias), 24 foram encontrados exclusivamente na palha da cana-de-açúcar (início da compostagem, dia 0), corroborando com a ideia de que o tipo do material a ser compostado, assim como o ambiente de origem do material, pode influenciar o desenvolvimento inicial da compostagem (BIDDLESTONE; GRAY, 1985; VARGAS-GARCIA et al., 2010).

O gênero *Acinetobacter*, pertencente ao filo Proteobacteria, foi o mais abundante durante a compostagem, exceto no dia 0 (início da compostagem), concordando com os resultados obtidos por Martins et al. (2013), que reportaram predominância deste gênero durante a fase termófila na compostagem de resíduos. Vale

ressaltar que o sequenciamento de alto rendimento, para estudos em ecologia microbiana, está passando por mudanças e aperfeiçoamento nos últimos anos e que as comparações entre experimentos devem ser feitas com cautela, analisando-se as metodologias utilizadas (GIHRING et al., 2012; MINETA; GOJOBORI, 2016).

A comunidade fúngica, ao contrário da bacteriana, revelou diminuição em sua diversidade, concordando com o pressuposto de que indivíduos eucariotos demonstram crescimento limitado em elevadas temperaturas (acima de 65°C) (TANSEY; BROCK, 1972; MAHESHWARI et al., 2000).

Dos 3 filos fúngicos, Ascomycota foi predominante durante todos os momentos da compostagem, seguido por Basidiomycota e Zygomycota, concordando com os resultados obtidos por Neher et al. (2013). Estes autores sequenciaram a comunidade microbiana da compostagem de resíduos municipais, utilizando a mesma plataforma de sequenciamento, com diferenças nos *primers* e metodologia de análise de dados. Entre os 48 gêneros fúngicos detectados, o gênero *Mycothermus*, predominante nos dias 10 e 15 da compostagem, contém importantes espécies termófilas celulolíticas, como, por exemplo, *Scytalidium thermophilum*, que recentemente foi reclassificada passando a fazer deste gênero (NATVIG et al., 2015). Nos dias 0 e 5 da compostagem, foram detectados gêneros que contêm espécies patogênicas ao ser humano, como *Aspergillus* e *Penicillium*. Ao contrário dos resultados reportados neste experimento, Vajna et al. (2010) após sete dias de compostagem, não detectaram a presença de fungos utilizando a técnica de plaqueamento em meio de cultura.

O tempo de compostagem e, conseqüentemente, a atividade microbiana promoveram redução na relação C/N, energia bruta, açúcares solúveis e matéria orgânica (Figuras 10A e 10B da página 76). O aumento rápido da temperatura inicial (3 dias entre a fase mesófila e termófila) pode ter sido influenciado pelo consumo rápido dos açúcares solúveis facilmente disponíveis (GERRITS, 1988; RYCKEBOER et al., 2003). A composição da comunidade microbiana ao longo do tempo da compostagem está associada às ofertas nutricionais e condições ambientais do meio, como observado nos resultados das variáveis físico-químicas, os quais alteraram-se ao longo do tempo. A atividade microbiana liberando para o ambiente carbono na forma de CO₂ e nitrogênio na forma de amônia (NH₃), promoveu a redução da relação C/N, energia bruta e o teor de matéria orgânica (Figuras 10A e 10B da página 76).

A análise gravimétrica do substrato mostrou mudanças nos teores

de celulose, hemicelulose e lignina. A figura 11 (página 77), mostra uma redução total desses três componentes com o avanço da compostagem. A celulose e a hemicelulose mostraram maior redução em comparação com a lignina, a qual é mais difícil de ser degradada, concordando com os resultados obtidos por Lyons et al. (2006).

Os resultados de produtividade e número de cachos suportam a hipótese inicial deste trabalho, a qual é apoiada na capacidade do cogumelo ostra em degradar e retirar nutrientes para o seu desenvolvimento a partir de materiais em estágio inicial de degradação e, desta forma, o substrato seletivo pode ser preparado de forma rápida (5 ou 10 dias de compostagem, incluindo o pré umedecimento do material), com menor intensidade digestiva da comunidade microbiana. Por fim, sugere-se para estudos futuros, a continuação do uso da metagenômica no levantamento da comunidade microbiana e a incorporação de análises funcionais destas comunidades.

CONCLUSÕES

- A metagenômica detectou uma ampla gama de gêneros bacterianos e fúngicos e alterações na composição destas comunidades ao longo da fase I de compostagem (5, 10 e 15 dias);
- As variáveis físico-químicas alteraram-se ao longo da fase I de compostagem, apresentando redução para todas as variáveis analisadas;
- Nas condições experimentais deste trabalho, o substrato com 5 dias de compostagem (fase I), pasteurizado e condicionado, mostrou-se mais seletivo ao cogumelo ostra, independente da linhagem utilizada.

REFERÊNCIAS

ADANI, F. et al. Organic matter evolution index (OMEI) as a measure of composting efficiency. **Compost Science and Utilization**, Philadelphia, v. 5, n. 2, p. 53–62, 1997.

ANPC, Associação Nacional dos Produtores de Cogumelos. (2014) <http://www.anpc.org.br/index.php/informacoes/139-produtores-brasileiros-de-cogumelos-enfrentam-forte-concorrencia-com-produto-chines>. Acessado em: Set. 2014.

BARDOU, P. et al. Jvenn: an interactive Venn diagram viewer. **BMC Bioinformatics**,

Londres, v. 15, 293, 2014.

BAYSAL, E. et al. Cultivation of oyster mushroom on waste paper with some added supplementary materials. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 89, p. 95-97, 2003.

BERTOLDI, M.; VALLINI, G.; PERA, A. The biology of composting: a review. **Waste Management Research**, Londres, v. 1, p. 157-176, 1983.

BIDDLESTONE, A. J.; GRAY, K. R. Composting. In: ROBINSON, C. W.; HOWELL, A. (Coord.) **Comprehensive Biotechnology: the practice of biotechnology, speciality products and service activities**. Oxford: Rergamon, 1985. v. 4, Cap. 6, p.1059-1070.

BRASIL: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – Manual de métodos analíticos oficiais para fertilizantes minerais, orgânicos, organominerais e corretivos, 2007. Disponível em: http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/PDF/in_28_07_anexo.pdf. Acesso em: 25 Mai. 2013.

CAPORASO, J. G. et al. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. **The ISME Journal**, Londres, v. 6, n. 8, p. 1621–1624, 2012.

CHANDNA, P. et al. Assessment of bacterial diversity during composting of agricultural byproducts. **BMC Microbiology**, Londres, v. 13, 99, 2013.

CHANG, S. T.; MILES, P. G. **Mushrooms: cultivation, nutritional value, medicinal effect, and environmental impact**. Boca Raton: CRC Press, 2004. 480 p.

DAVIES, B. E. Loss-on-ignition as an estimate of soil organic Matter. **Soil Science Society of America Proceedings**, Madison, v. 38, n. 1, p. 347-353, 1974.

FAOSTAT: Food and agriculture organization of the United Nations, 2014. Disponível em: <http://faostat.fao.org>. Acesso em: 23 Jan. 2014.

GERRITS, J. P. G. Nutrition and compost. In: VAN GRIENSVEN, L. J. L. D. (ed.) **The cultivation of mushrooms** (1. ed.). Rustington: Darlington Mushroom Laboratories, p. 29–72. 1988.

GIHRING, T. M.; GREEN, S. J.; SCHADT, C. W. Massively parallel rRNA gene

sequencing exacerbates the potential for biased community diversity comparisons due to variable library sizes. **Environmental Microbiology**, Chichester, v. 14, n. 2, p. 285–290, 2012.

KÖLJALG, U.; et al. Towards a unified paradigm for sequence-based identification of fungi. **Molecular Ecology**, Chichester, v. 22, p. 5271-5277, 2013.

KOZICH, J. J. et al. Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform. **Applied and Environmental Microbiology**. Washington, v. 79, n. 17, p. 5112-20, 2013.

HANDELSMAN, J. Metagenomics or Megagenomics? **Nature Reviews Microbiology**, Londres, v. 3, p. 457-458, 2005.

HANDELSMAN, J. et al. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. **Chemistry and Biology**, Cambridge, v. 5, n. 10, p. 245-249, 1998.

HERNÁNDEZ, D.; SÁNCHEZ, J. E.; YAMASAKI, K. A simple procedure for preparing substrate for *Pleurotus ostreatus* cultivation. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 90, n. 2, p. 145-150, 2003.

JOHNSON, R. R. et al. Corn plant maturity. II. Effect on *In Vitro* cellulose digestibility and soluble carbohydrate content. **Journal Animal Science**, Champaign, v. 25, p. 617-623, 1966.

LEE, H. Y.; et al. Automation of solid-state bioreactor for Oyster Mushroom composting. **Microbiology**, Seul, v. 30, n. 4, p. 228-232, 2002.

LEÓN, V. T. C.; LARA, H. L. Factores que influyen en la producción de substratos selectivos para el cultivo de *Pleurotus ostreatus*. In: VÁZQUEZ J. E. S.; CARRERA, D. M.; MATA, G.; LARA, H. L. (Coord.). **El cultivo de setas *Pleurotus* spp. en México**. Chiapas: Ecosur, 2007. v. 1, Cap. 3, p. 81-90.

LYONS, G. A. et al. Monitoring of changes in substrate characteristics during mushroom compost production. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 54, n. 13, p. 4658-4667, 2006.

MARTINS, L. F. et al. Metagenomic analysis of a tropical composting operation at the Sao

Paulo Zoo Park reveals diversity of biomass degradation functions and organisms. **Plos One**, São Francisco, v. 8, n. 4, e61928, 2013.

MAHESHWARI, R.; BHARADWAL, G.; MAHALINGESHWARA, K. B. Thermophilic fungi: their physiology and Enzymes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 64, n. 3, p. 461-488, 2000.

MINETA, K.; GOJOBORI, T. Databases of the marine metagenomics. **Gene**, Amsterdam, v. 576, p. 724-728, 2016.

NATVIG, D. O. et al. *Mycothermus thermophilus* gen. et comb. nov., a new home for the itinerante thermophile *Scytalidium thermophilum* (*Torula thermophila*). **Mycologia**. Lawrence, v. 107, n. 2, p. 319-327, 2015.

NEHER, D. A. et al. Changes in bacterial and fungal communities across compost recipes, preparation methods, and composting times. **Plos one**, Washington, v. 8, n. 11, e79512, 2013.

NOBLE, R. et al. Bench-Scale preparation of mushroom substrates in controlled environments. **Compost Science and utilization**, Londres, v. 5, n. 3, p. 32-43, 1997.

NTOUGIAS, S. et al. Bacterial diversity in spent mushroom compost assessed by amplified rDNA restriction analysis and sequencing of cultivated isolates. **Systematic and Applied Microbiology**, Jena, v. 27, n. 6, p. 746–754, 2004.

PETERS, S. et al. Succession of microbial communities during hot composting as detected by PCR-Single-Strand-Conformation Polymorphism-Based genetic profiles of small-subunit rRNA genes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 33, p. 930-936, 2000.

ROYSE, D. J. Trends in Mushroom production worldwide. In: Anais do VII Simpósio internacional sobre cogumelos no Brasil, 2013, Manaus. **Proceedings...** Manaus: INPA. 2013. p. 38-47.

ROYSE, D. J.; SCHISLER, L. C. Yield and size of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus sajor-caju* as effected by delayed-release nutrient. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Heidelberg, v. 26, n. 2, p. 191-194, 1987.

ROYSE, D. J. et al. Yield, mushroom size and time to production of *Pleurotus cornucopiae* (oyster mushroom) grown on switch grass substrate spawned and supplemented at various rates. **Bioresource Technology**, Amsterdam, n. 78, p. 293-300, 2004.

RYCKEBOER, J. et al. A survey of bacteria and fungi occurring during composting and self-heating processes. **Annals of Microbiology**, Heidelberg, v. 53, n. 4, p. 349–410, 2003.

SÁNCHEZ, C. Cultivation of *Pleurotus ostreatus* and other edible mushrooms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Heidelberg, v. 85, n. 5, p. 1321-1337, 2010.

SCHLOSS, P. D. et al. Weber introducing mothur: Open-Source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 75, n. 23, p. 7537-41, 2009.

STRAATSMA, G. et al. 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, 1994.

QUAST, C. et al. The SILVA ribosomal RNA gene database Project: improved data processing and web-based tools. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 41, p. 590-596, 2012.

SHARMA, H. S. S.; LYONS, G.; CHAMBERS, J. Comparison of the changes in mushroom (*Agaricus bisporus*) compost during windrow and bunker stages of phase I and II. **Annals of Applied Biology**, Chichester, v. 136, n. 1, p. 59-68, 2000.

SILVA, F. A. S.; AZEVEDO, C. A. V. Principal components analysis in the software Assistat-Statistical attendance. In: World congress on computers in agriculture, 2009, Reno. **Proceedings...** Reno/USA: American Society of Agricultural and Biological Engineers. 2009. p. 56-62.

SILVA, C. F. et al. Microbial diversity in a bagasse-based compost prepared for the production of *Agaricus brasiliensis*. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 40, n. 3, p. 590-600, 2009.

SINDEN, J. W.; HAUSER, E. The short method of composting. **Mushroom Science**, Leamington Spa, v. 1, p. 52-59, 1950.

SONG, J. et al. Phylogenetic diversity of thermophilic actinomycetes and

Thermoactinomyces spp. isolated from mushroom composts in Korea based on 16S rRNA gene sequence analysis. **FEMS Microbiology Letters**, Chichester, v. 202, n. 7, p. 97–102, 2001.

STAMETS, P. **Mycelium running: how mushrooms can help save the world**. Berkeley: Ten speed press, 2005. 330 p.

STAMETS, P. **MycoMedicinals: An informational booklet on medicinal mushrooms**. 2. ed. Berkeley: Ten Speed Press, 2000. 48 p.

STRAATSMA, G. et al. Adjustment of the composting process for mushroom cultivation based on initial substrate composition. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 72, n. 1, p. 67-74, 2000.

STRAATSMA, G. et al. Population dynamics of *Scytalidium thermophilum* in mushroom compost and stimulatory effects on growth rate and yield of *Agaricus bisporus*. **Journal of General Microbiology**, Shinfield, v. 135, p. 751-759, 1989.

SZÉKELY, A. J. et al. DGGE and T-RFLP analysis of bacterial succession during mushroom compost production and sequence-aided T-RFLP profile of mature compost. **Microbial Ecology**, New York, v. 57, n. 3, p. 522–533, 2009.

TANSEY, M. R.; BROCK, T. D. The upper temperature limit for eukaryotic organisms. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 69, n. 9, p. 2426-2428, 1972.

TORSVIK, V.; ØVREÅS, L.; THINGSTAD, T. F. Prokaryotic diversity--magnitude, dynamics, and controlling factors. **Science**, Washington, v. 296, n. 5570, p. 1064-1066, 2002.

TUOMELA, M. M. et al. Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 72, p. 169–183, 2000.

VAJNA, B. et al. Microbial community structure changes during oyster mushroom substrate preparation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Heidelberg, v. 86, n. 1, p. 367–375, 2010.

VAJNA, B. et al. An improved sequence-aided T-RFLP analysis of bacterial succession during oyster mushroom substrate preparation. **Environmental Ecology**. Heidelberg, v. 64,

p. 702-713.

VAN GRIENSVEN, L. J. L. D. **The cultivation of mushrooms**. Sussex: Rustington, 1988. 515 p.

VAN SOEST, P. J. Use of detergents in the analyses of fibrous feeds, 2. A rapid method for the determination of fiber and lignin. **Journal Association Official Analytical Chemical**, Gaithersburg, v. 46, p. 829-835, 1963.

VAN SOEST, P. J.; WINE, R. H. Determination of lignin and cellulose in acid detergent fiber with permanganate. **Journal Association Official Analytical Chemical**, Gaithersburg, v. 51, p. 780-785, 1968.

VARGAS-GARCIA, M. C. et al. Microbial population dynamics and enzyme activities in composting processes with different starting materials. **Waste Management**, Oxford, v. 30, n. 5, p. 771–778, 2010.

VIEIRA, F. R. **Potencial de uso de gramíneas como substrato pasteurizado no cultivo do cogumelo *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm.** 2012. 115 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Energia na Agricultura) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2012.

Tabela 1. Formulação do substrato para o cultivo do cogumelo ostra (*Pleurotus ostreatus*).

Matéria prima	kg			C/N
	Massa seca	Teor de N ¹	Teor de C ²	
Palha de cana	534,00	3,20	272,34	85,1/1
Farelo de trigo	34,96	0,95	17,69	18,6/1
Calcário calcítico	3,00	--	--	--
Gesso	2,00	--	--	--
Total	573,96	4,15	290,03	--
Relação C/N inicial Fase I	--	--	--	70/1

¹ Nitrogênio² Carbono

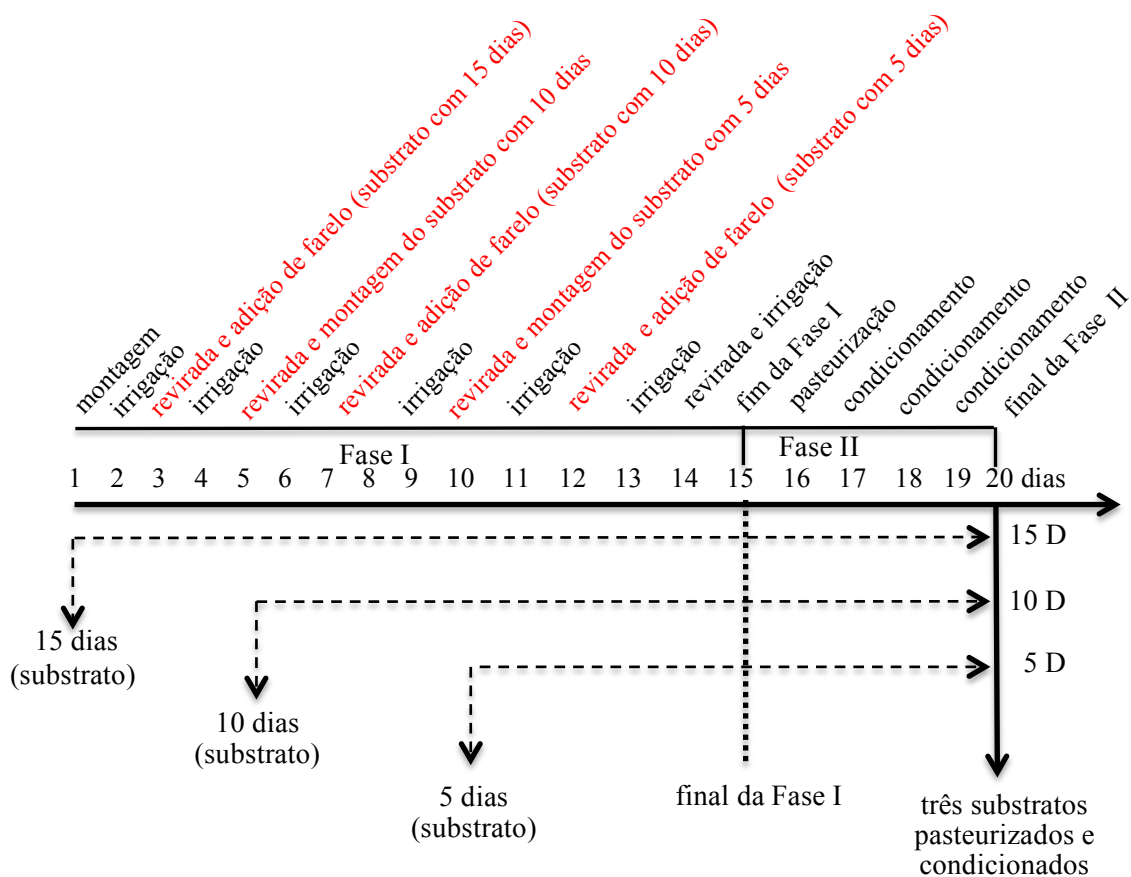


Figura 1. Procedimentos e tempos da compostagem (fases I e II). Substratos: 5 D – cinco dias de compostagem (fase I); 10 D – dez dias de compostagem (fase I); 15 D – quinze dias de compostagem (fase I).

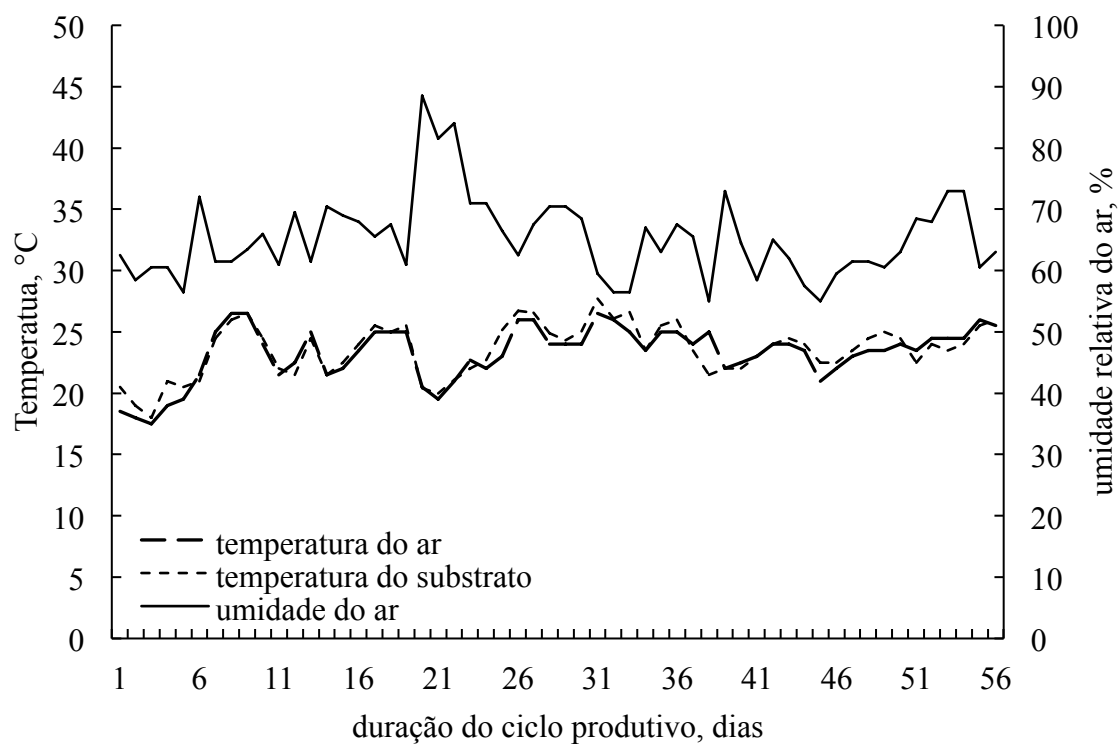


Figura 2. Temperatura e umidade relativa do ar durante o ciclo produtivo (ciclo produtivo de 56 dias).

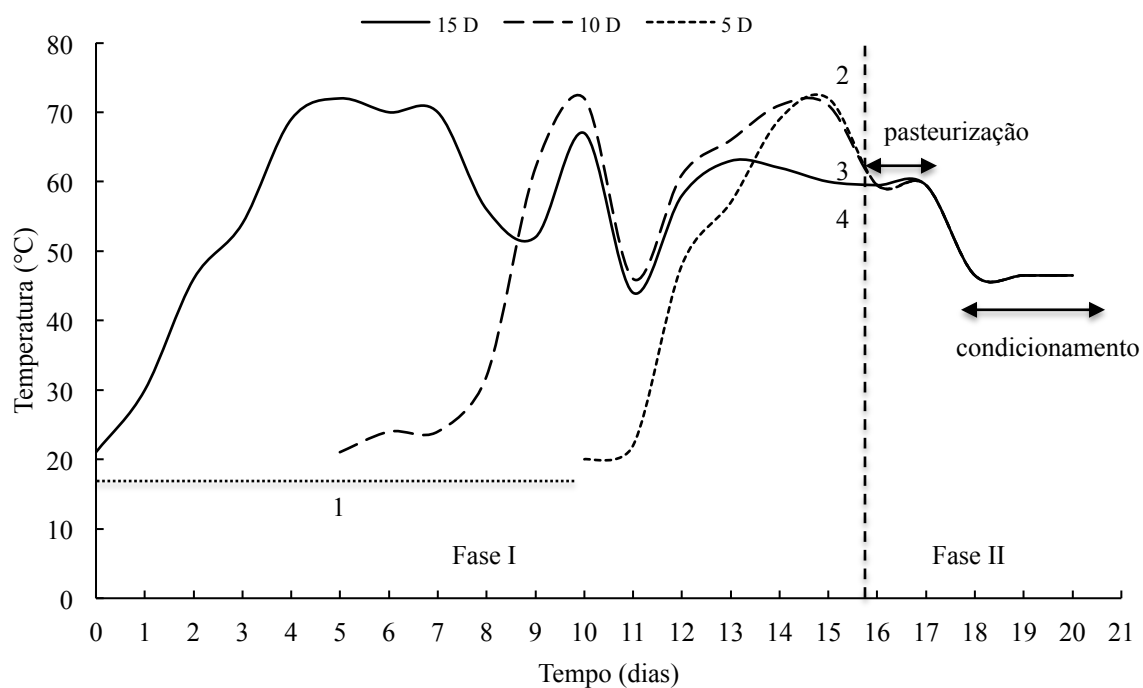


Figura 3. Temperatura da compostagem durante as fases I e II e os pontos amostrados para as análises físico-químicas e da metagenômica microbiana. 1 – início da compostagem; 2, 3 e 4 final da compostagem (fase I) para os tempos de 5, 10 e 15 dias, respectivamente.

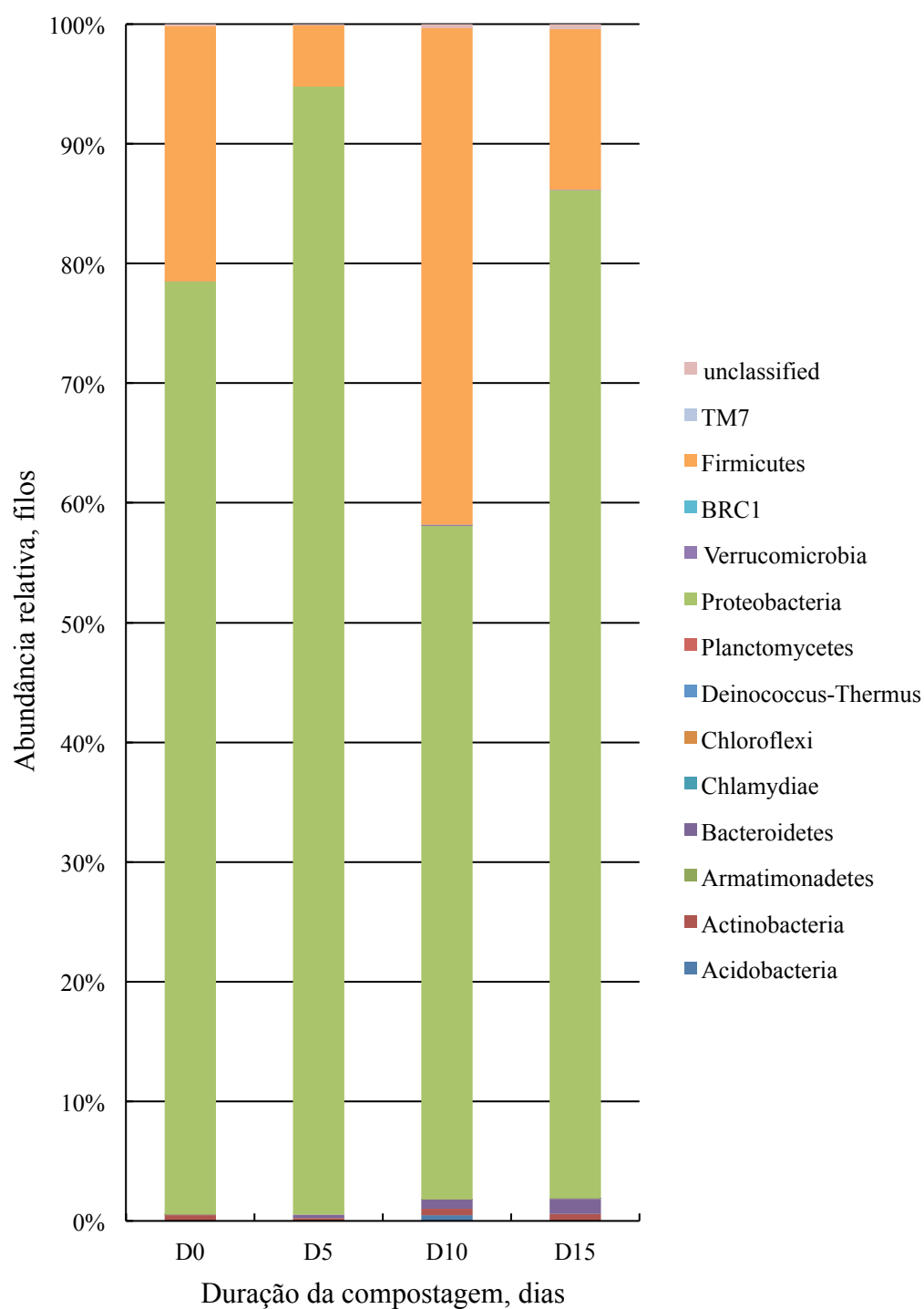


Figura 4. Abundância relativa dos filos bacterianos na fase I de compostagem. D0 – início da compostagem; D5 – cinco dias de compostagem; D10 – dez dias de compostagem; D15 – quinze dias de compostagem.

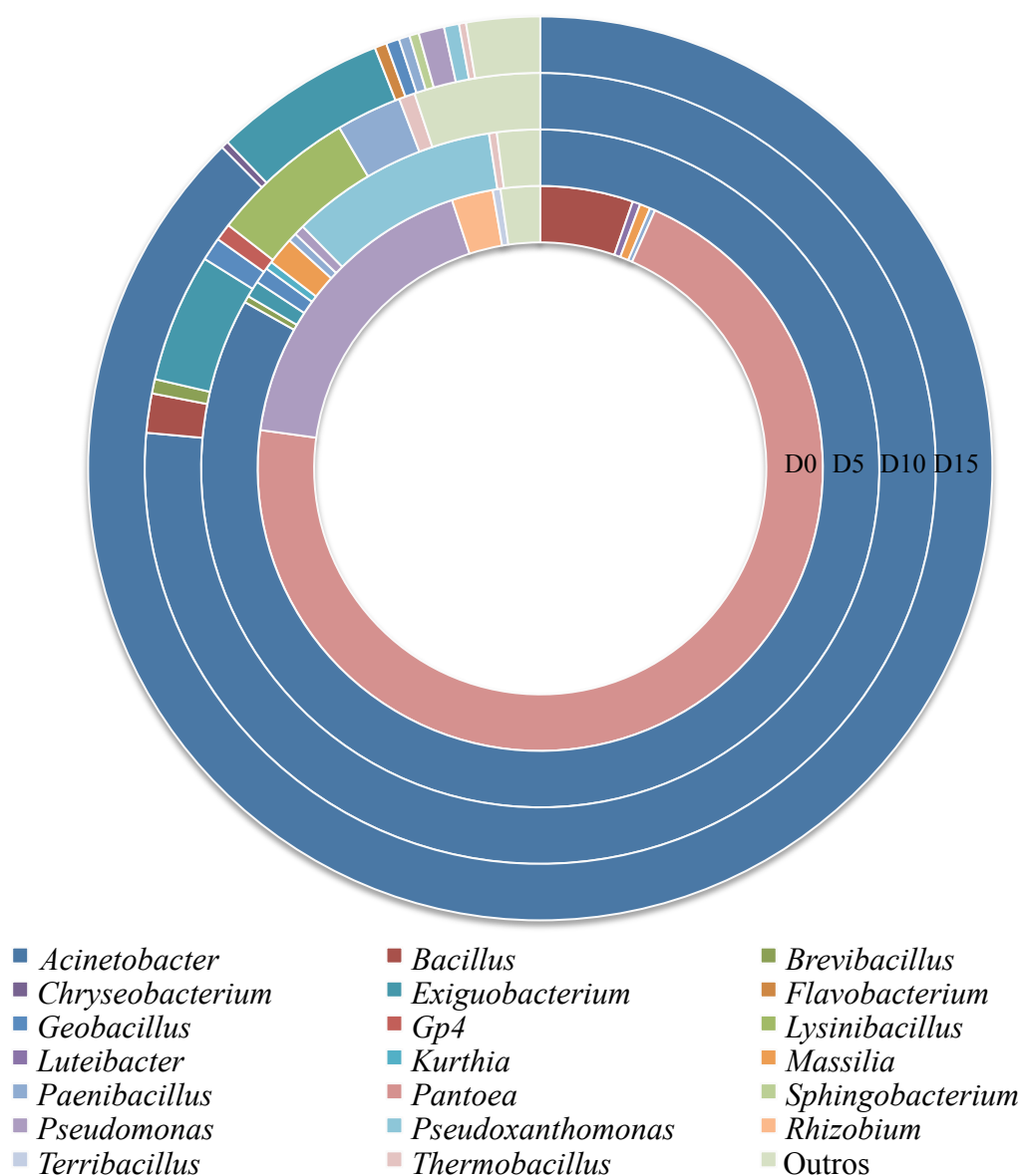
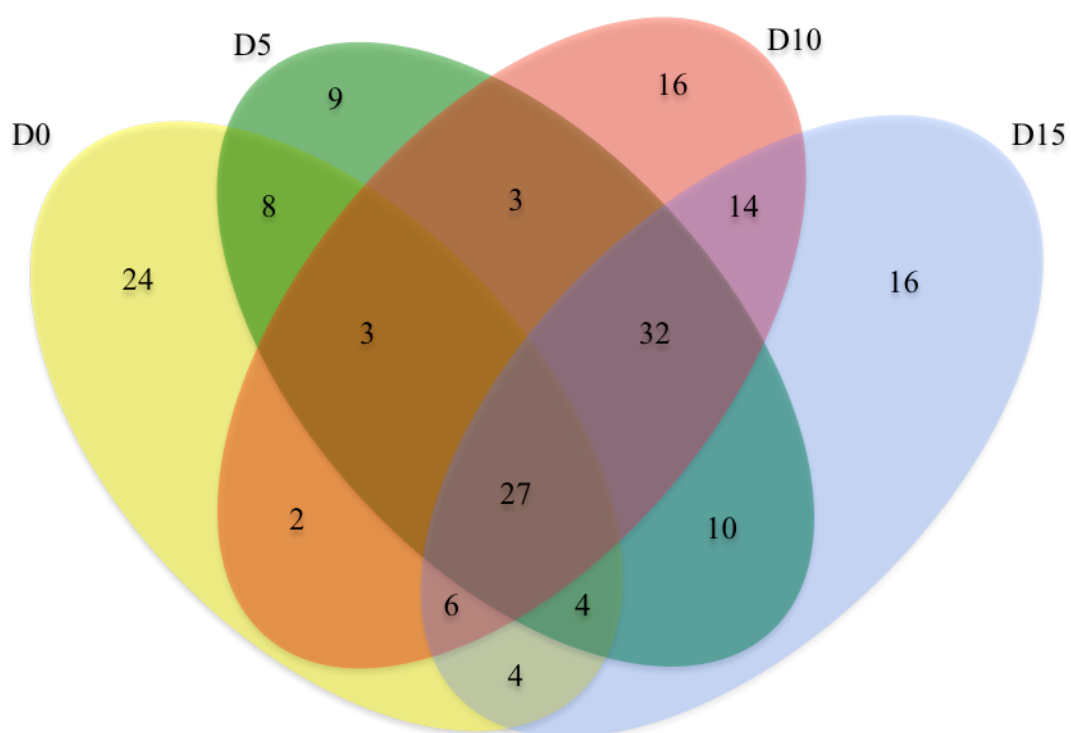


Figura 5. Abundância relativa dos vinte gêneros predominantes na fase I de compostagem. D0 – início da compostagem; D5 – cinco dias de compostagem; D10 – dez dias de compostagem; D15 – quinze dias de compostagem.



Número de gêneros no grupo D0 = 78

Número de gêneros no grupo D5 = 96

Número de gêneros no grupo D10 = 103

Número de gêneros no grupo D15 = 113

Figura 6. Distribuição dos gêneros bacterianos na fase I da compostagem. D0 – início da compostagem; D5 – cinco dias de compostagem; D10 – dez dias de compostagem; D15 – quinze dias de compostagem.

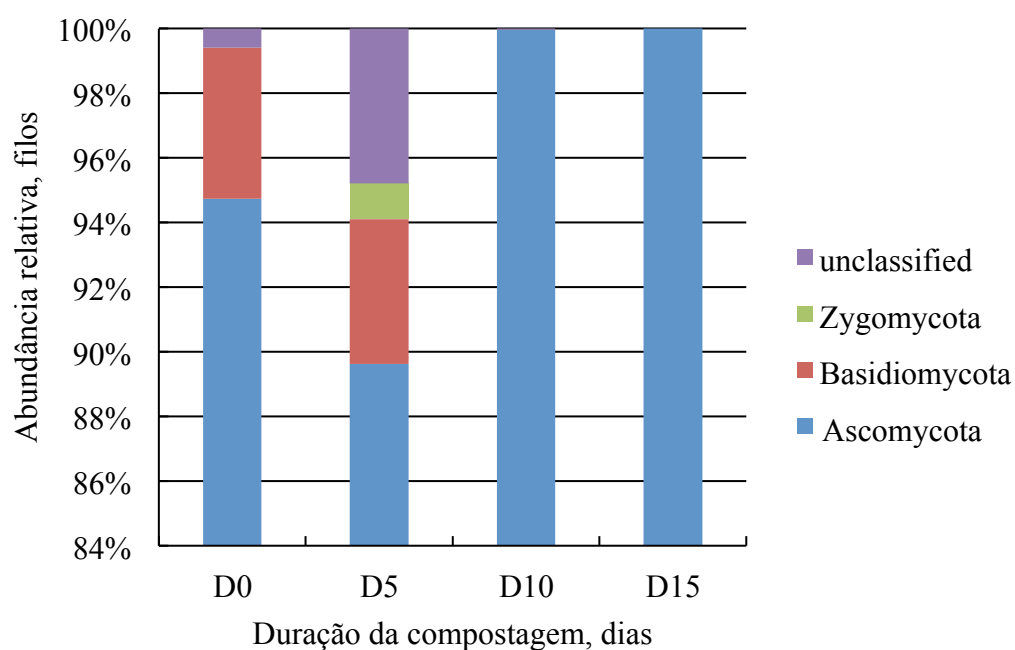


Figura 7. Abundância relativa dos filos fúngicos na fase I da compostagem. D0 – início da compostagem; D5 – cinco dias de compostagem; D10 – dez dias de compostagem; D15 – quinze dias de compostagem.

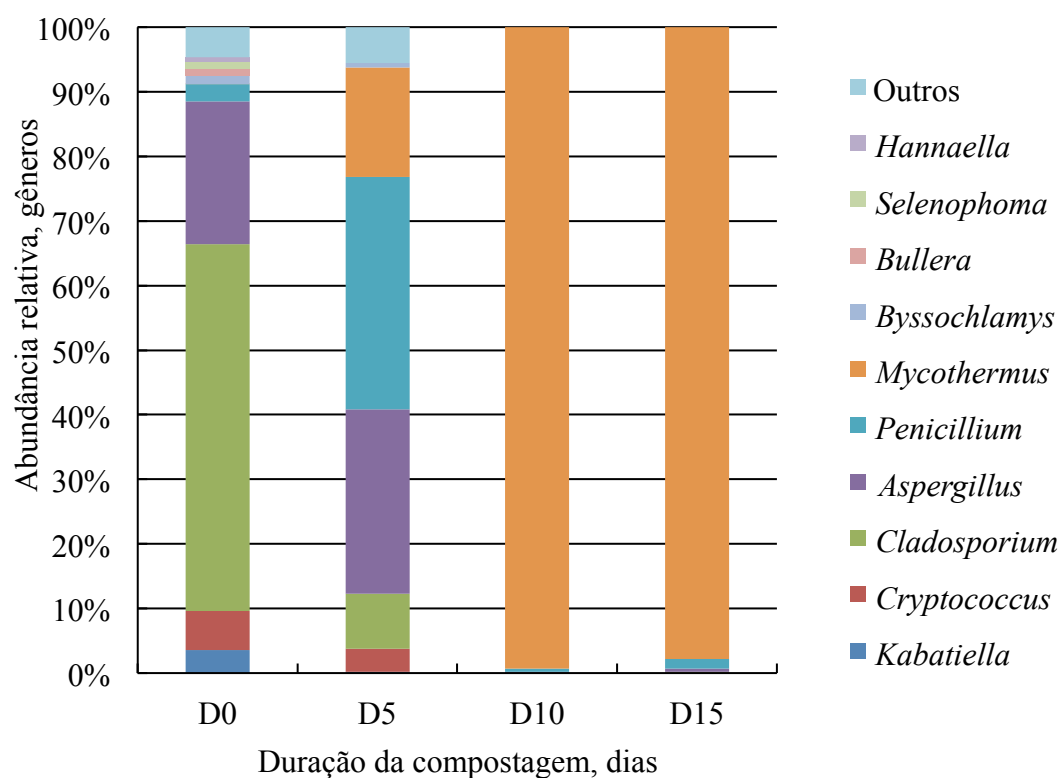
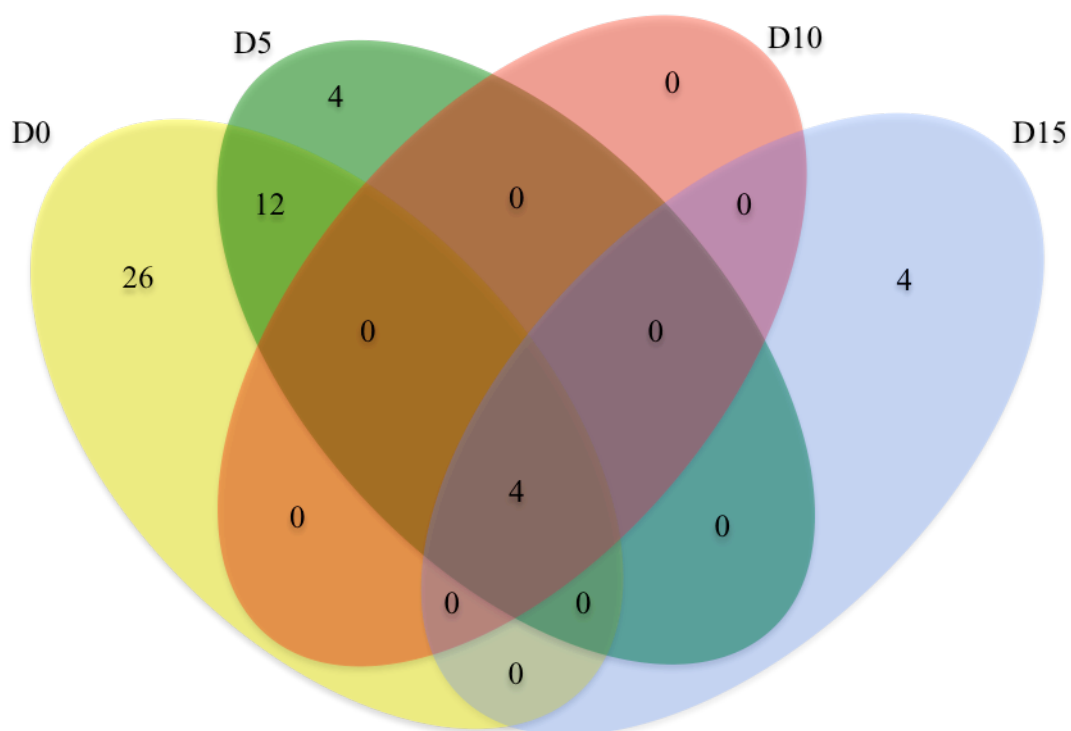


Figura 8. Abundância relativa dos dez gêneros fúngicos predominantes na fase I da compostagem. D0 – início da compostagem; D5 – cinco dias de compostagem; D10 – dez dias de compostagem; D15 – quinze dias de compostagem.



Número de gêneros no grupo D0 = 42

Número de gêneros no grupo D5 = 20

Número de gêneros no grupo D10 = 4

Número de gêneros no grupo D15 = 4

Figura 9. Distribuição dos gêneros fúngicos na fase I da compostagem. D0 – início da compostagem; D5 – cinco dias de compostagem; D10 – dez dias de compostagem; D15 – quinze dias de compostagem.

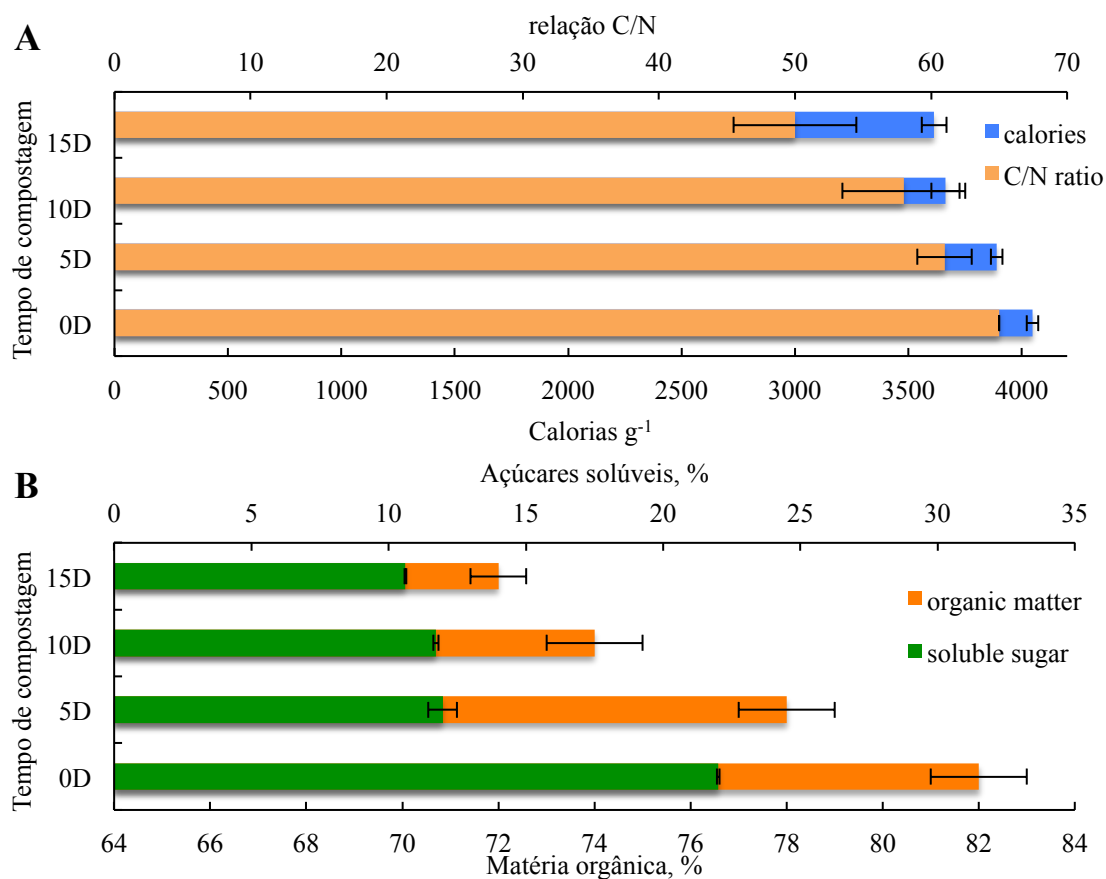


Figura 10. Perda de carbono e nitrogênio durante a fase I de compostagem. A dinâmica da relação C/N, energia bruta (calorias por grama), açúcares solúveis e de matéria orgânica; **A** - relação C/N e energia bruta (peso seco); **B** - açúcares solúveis e matéria orgânica (expressa em percentagem de matéria seca).

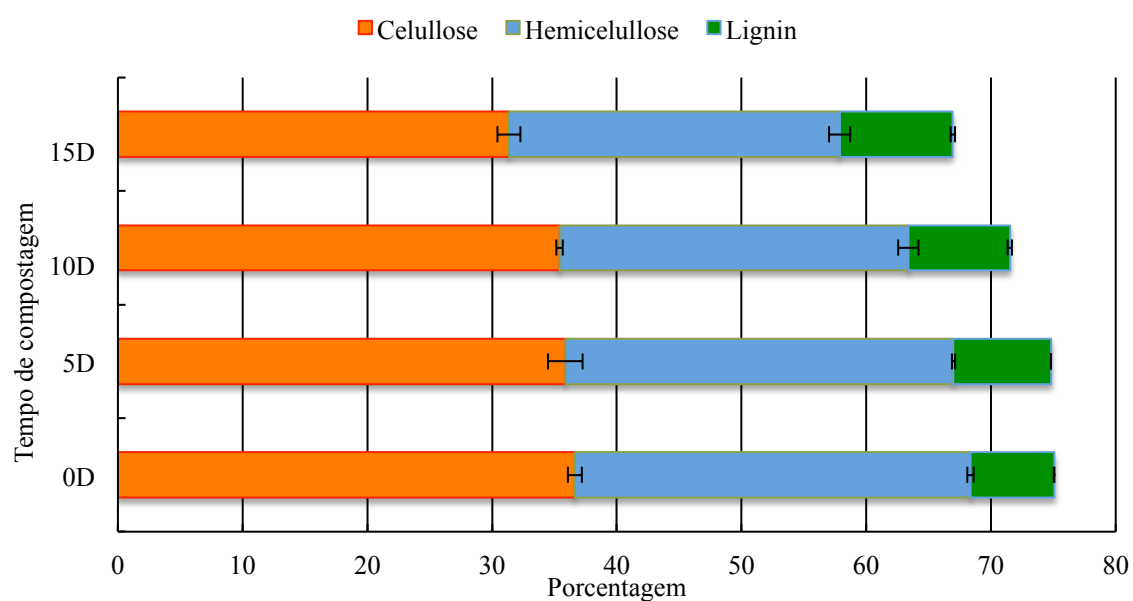


Figura 11. Teores relativos de celulose, hemicelulose e lignina na fase I da compostagem. 0D – início da compostagem; 5D - cinco dias de compostagem; 10D - 10 dias de compostagem; 15D - 15 dias de compostagem.

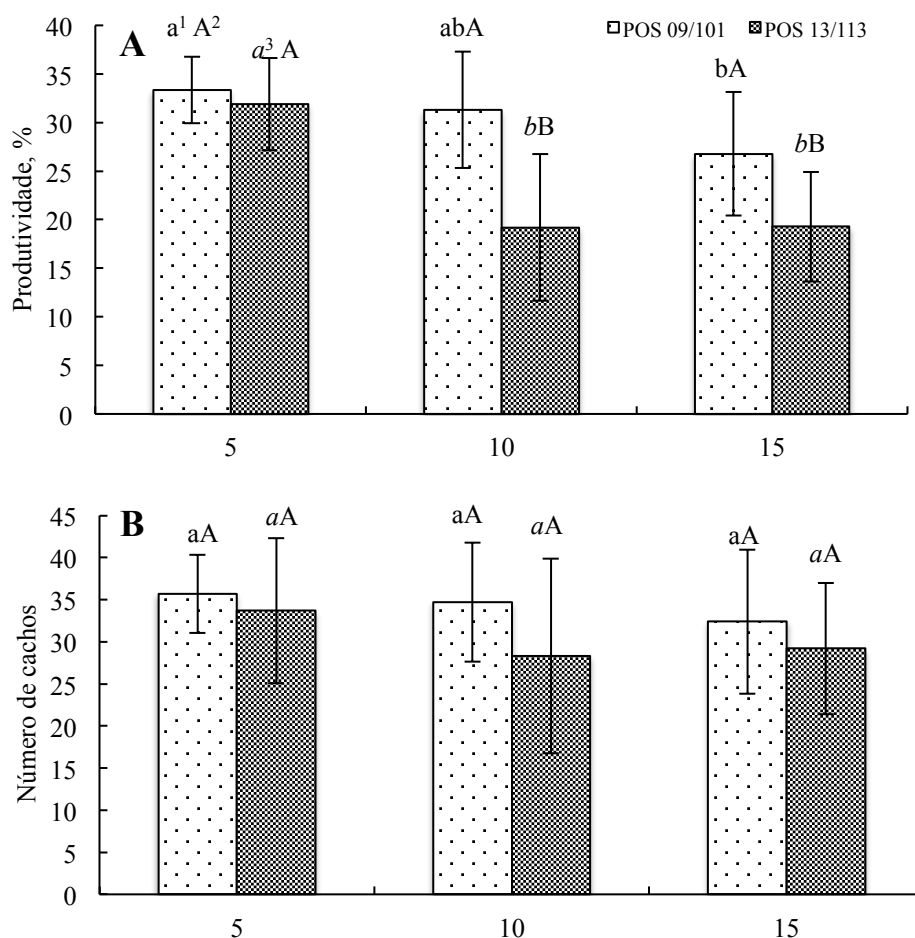


Figura 12. Produtividade e número de cachos de *Pleurotus ostreatus* cultivado em diferentes substratos. **A** – produtividade nos substratos obtidos a partir 5, 10 e 15 dias da fase I e duas linhagens de *Pleurotus ostreatus* (POS 09/101 e POS 13/113); **B** - número de cachos nos substratos obtidos a partir 5, 10 e 15 dias da fase I e duas linhagens de *Pleurotus ostreatus* (POS 09/101 e POS 13/113).

As barras indicam o desvio padrão (DP $\pm$) para as séries individualmente;

¹ Valores médios seguidos de mesma letra minúscula para a linhagem POS 09/101, nos diferentes substratos (5, 10 e 15 dias da Fase I), não diferem pelo teste de Tukey (5%);

² Valores médios seguidos de mesma letra maiúscula dentro do mesmo substrato (5 dias ou 10 dias ou 15 dias), entre as duas linhagens (POS 09/101 e POS 13/113), não diferem pelo teste de Tukey (5%);

³ Valores médios seguidos de mesma letra minúscula em itálico para a linhagem POS 13/113, nos diferentes substratos (5, 10 e 15 dias da Fase I), não diferem pelo teste de Tukey (5%).

CAPÍTULO III

METAGÊNOMICA DA COMUNIDADE MICROBIANA EM DIFERENTES SITUAÇÕES DE PASTEURIZAÇÃO (TEMPO/TEMPERATURA) DO COMPOSTO PARA O CULTIVO DO COGUMELO *Agaricus bisporus*

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência de diferentes condições de pasteurização (tempo/temperatura) na comunidade microbiana e variáveis químicas do composto final para o cultivo do cogumelo *Agaricus bisporus*. Para isto, em biorreatores, foram simuladas três diferentes situações de pasteurização (57°C por 6 horas, 60°C por 2 horas e 68°C por 2 horas). A caracterização da comunidade microbiana foi realizada através do sequenciamento na plataforma *Illumina MiSeq* utilizando iniciadores da região 16S rRNA para bactérias e ITS1 para fungos. A avaliação química do composto foi realizada através de análises de carbono total, nitrogênio total, relação C/N, matéria orgânica, sólidos totais e emissão de NH₃. Os resultados revelaram a predominância dos filos Proteobacteria e Firmicutes durante as fases I e II de compostagem, respectivamente. Os gêneros bacterianos mais abundantes foram *Pseudomonas* e *Thermobifida*, durante a fase I, e *Ureibacillus*, *Luteimonas*, *Truepera*, *Pseudoxathomonas*, *Clostridium* e *Paenebacillus*, durante a fase II. A comunidade fúngica foi composta predominantemente por indivíduos do filo Ascomycota, com maior abundância dos gêneros *Thermomyces* e *Scedosporium*, durante a fase I, e *Thermomyces* e *Mycothermus*, durante a fase II. O composto submetido

à pasteurização a 60°C por 2 horas apresentou maior redução no teor de matéria orgânica, sólidos totais e relação C/N. Por outro lado, o composto pasteurizado a 68°C apresentou menor teor de nitrogênio, consequência da maior emissão de NH₃, durante a fase II. Os diferentes binômios (tempo/temperatura) da pasteurização alteraram a composição da comunidade microbiana e, consequentemente, a composição química final do composto de cultivo.

Palavras-chaves: *Agaricus bisporus*, compostagem, comunidade microbiana, metagenômica, biorreatores.

METAGENOMIC OF MICROBIAL COMMUNITY IN DIFFERENT PASTEURIZATION CONDITIONS (TIME/TEMPERATURE) OF COMPOST TO *Agaricus bisporus* CULTIVATION

ABSTRACT

We aimed evaluate the influence of different pasteurization conditions (time/temperature) on microbial community and chemical variables of final compost for *Agaricus bisporus* cultivation. In bioreactors, three different pasteurization conditions were simulated (57°C for 6 hours, 60°C for 2 hours and 68°C for 2 hours). The characterization of microbial community was carried out through *Illumina MiSeq* platform using 16S rRNA and ITS1 primers for bacteria and fungi, respectively. Chemical composition of compost was evaluated through total carbon, total nitrogen, C/N ratio, organic matter, total solids and NH₃ emission. The results revealed predominance of Proteobacteria and Firmicutes bacterial phyla during phases I, and II, respectively. The most abundant bacterial genera were *Pseudomonas* and *Thermobifida* during phase I, and *Ureibacillus*, *Luteimonas*, *Truepera*, *Pseudoxathomonas*, *Clostridium* and *Paenebacillus* during phase II. Fungal community was predominantly composed of Ascomycota phylum with higher abundance of *Thermomyces* and *Scedosporium* genera during phase I, and *Thermomyces* and *Mycothermus* during phase II. The compost pasteurized at 60°C showed reduction in organic matter content, total solids, and C/N ratio. Moreover, the compost pasteurized at 68°C showed reduction in nitrogen content, a consequence of higher emission of NH₃ during phase II. Finally, we conclude that different pasteurization conditions influenced the

microbial community as well as final chemical composition of compost for *A. bisporus* cultivation.

Keywords: *Agaricus bisporus*, composting, microbial community, metagenomic, bioreactors.

INTRODUÇÃO

O *Agaricus bisporus*, conhecido popularmente como champignon ou agaricus, é o cogumelo mais cultivado no mundo (CHANG; MILES, 2004; ROYSE, 2013). A produção é realizada através de uma massiva e sofisticada operação de preparo do substrato de cultivo (fases I e II) e, posteriores fases de colonização (fase III), frutificação e colheita (fase IV).

A elaboração do substrato de cultivo, também chamado de composto, é a etapa mais importante do cultivo, fornecendo os nutrientes para o cogumelo a ser cultivado, além de representar a maior parte dos custos de produção. O processo de elaboração do composto, conhecido como “compostagem curta”, baseia-se no método descrito por Sinden e Hauser (1950), o qual é formado principalmente por palhas e/ou capins, suplementado com fontes orgânicas (esterco de cavalo, frango e farelos de grãos, como soja e trigo) ou inorgânicas (ureia, sulfato de amônia, entre outros) de nitrogênio e corretivos do pH, como gesso agrícola e/ou calcário (VAN GRIENSVEN, 1988; OEI, 2003).

Atualmente, os cultivos em larga escala, após a mistura e umedecimento dos ingredientes (2-4 dias, pré-umedecimento), iniciam a fase de auto-aquecimento (fase I), onde a mistura é disposta em leiras ou “bunkers” (sistema semi-controlado com ventilação forçada), com temperatura atingindo 80°C no pico de aquecimento. Esta fase varia de 6-20 dias (bunkers – processo mais rápido), com frequente homogeneização e correção da umidade (intervalos de 2-4 dias). Posteriormente, o substrato segue para uma fase com temperatura controlada, chamada fase II, dividida em dois “estágios”, pasteurização e condicionamento, com duração em torno de 5-8 dias (GERRITS, 1988; VAN GRIENSVEN, 1989; STRAATSMA et al., 2000).

Apesar da compostagem ser um processo contínuo, as fases I e II variam em sua natureza e função. Durante a fase I, até 40% da matéria seca do composto pode ser degradada pela ação da comunidade microbiana residente, servindo como fonte de

nutrientes para o cogumelo a ser cultivado mas, somente após a pasteurização e condicionamento do composto, este será seletivo ao cultivo do champignon (STRAATSMA et al., 1989; NOBLE; GAZE, 1996; BEYER, 2003). Desta forma, as duas fases complementam-se, sendo a fase I responsável pela preparação dos nutrientes (transformação do substrato bruto) e a fase II, pela sanitização (eliminação de insetos, nematóides e microrganismos competidores) e maturação do composto (redução do nível de amônia livre e a formação de uma microbiota benéfica ao champignon) (ROSS; HARRIS, 1982; MILLER et al. 1990; STRAATSMA et al., 1994).

Ao contrário da compostagem convencional, empregada na reciclagem de resíduos orgânicos e/ou elaboração de fertilizantes, a compostagem curta é melhor controlada e monitorada, mas ambas têm como componente principal a ação intensa da comunidade microbiana (VAN GRIENSVEN, 1988; TUOMELA et al., 2000; PETERS et al., 2000).

Nos últimos dez anos, as ferramentas em biologia molecular proporcionaram explorar de forma mais abrangente essas comunidades, revelando elevada complexidade, tanto em sua composição como em sua funcionalidade. Neste sentido, alguns estudos utilizando técnicas moleculares avaliaram a comunidade microbiana envolvida na compostagem para o cultivo de champignon, focando o final da fase I e II (SZÉKELY et al., 2009; SONG et al., 2001), o composto gasto após a colheita (NTOUGIAS et al., 2004), ou fases durante o período de produção (ZHANG et al., 2014). Estes estudos utilizaram técnicas moleculares de baixa resolução, como DGGE ou T-RFLP entre outras. Mais recentemente, a metagenômica, reunindo um conjunto de técnicas moleculares proporcionou avaliar comunidades microbianas complexas como esta da compostagem com maior profundidade e precisão (HANDELSMAN, 2005; NEHER et al., 2013)

O processo de compostagem como um todo merece atenção, mas o binômio tempo/temperatura, principalmente durante a pasteurização (fase controlada), não é de senso comum entre muitos produtos e consultores ao redor do mundo. Desta forma, objetivou-se, no presente estudo, avaliar em condições experimentais a influência de diferentes situações de pasteurização (tempo/temperatura) na comunidade microbiana (metagenômica) e na composição química final do composto de cultivo para o cogumelo *Agaricus bisporus*.

MATERIAL E MÉTODOS

Compostagem fase I e II

O composto em escala experimental foi preparado no Mushroom Research Center (MRC), na Pennsylvania State University – PSU, Pensilvânia, Estados Unidos, seguindo o método padrão de compostagem, exceto a fase II (realizada em biorreatores). A fórmula padrão do composto foi à base de palha de trigo (baías de equinos) suplementada com esterco de galinha, farelo de soja e gesso (Tabela 1, página 98). Inicialmente, a palha de trigo, o esterco de galinha e o gesso foram misturados a seco (umidade natural) em um misturador (Jaylor^R) e, durante a homogeneização adicionou-se água em nível de 75% de umidade. Posteriormente, a mistura foi transferida para um bunker com aeração forçada, configurado em função da resposta às condições do nível de O₂, em torno de 8%. No pico de aquecimento (3º dia), a temperatura do composto chegou a 82°C. O composto foi removido do bunker no terceiro dia e novamente homogeneizado no misturador, procedendo-se a adição do farelo de soja e manutenção da umidade ao redor de 75% e, novamente transferido para o bunker por mais 3 dias, totalizando 6 dias de fase I.

A fase II de compostagem foi realizada em biorreatores, simulando três diferentes condições de pasteurização (binômio tempo/temperatura): P1 – 57°C/6h, P2 – 60°C/2h e P3 – 68°C/2h (Figura 1, página 100). O sistema de biorreatores foi desenvolvido a partir de vasos de 4 litros de capacidade (altura de 35 cm e diâmetro de 15 cm), confeccionados de PVC e alojados em incubadoras (Binder BD-53 Universal Incubator) com temperaturas pré-definidas de pasteurização (binômio) e condicionamento a 47°C por 5 dias. Cerca de 1,5 kg de composto úmido (72%), coletado imediatamente ao término da fase I, foi depositado sobre uma tela de metal (1 mm quadrado) posicionada à 5 cm de altura do fundo dos biorreatores.

Para conseguir um processo aeróbico nos biorreatores, o fluxo de ar foi controlado a uma taxa de 100 mL/min com auxílio de um rotâmetro (Figura 2, página 101). O fluxo de ar gerado pelo compressor anexo ao sistema de biorreatores foi conduzido através de frascos erlenmeyer contendo 250 ml de água destilada esterilizada à temperatura de 20°C, evitando o ressecamento do composto, mantendo a umidade em torno de 70%. A entrada de ar deu-se pela parte inferior nos biorreatores e a saída na parte superior. Após a

passagem do ar através do composto no interior dos biorreatores, os pequenos dutos de ar foram conectados a frascos erlenmeyer contendo 200 ml de uma solução com 42 g.l⁻¹ de ácido bórico e metilo vermelho/verde de bromocresol restando o gás amoníaco para posterior titulação com solução ácido clorídrico (HCL 0,7 M). Estes frascos foram mantidos em banho Maria (água) no interior de um refrigerador regulado a 4°C para condensar a umidade do gás efluente, bem como para regular a temperatura da solução de ácido bórico. O “off-gás”, em seguida foi conduzido a um detector de CO₂ (ENVICO Environment Control B.V., model ZFP9 CO₂ Controller) e O₂ (J. Dittrich Elektronik GmbH & Co, model MF010-O). Os dados de O₂ e CO₂, assim como de temperatura do composto no interior dos biorreatores foram armazenados automaticamente a cada 1 minuto através do software Mushroom Master (J. Mähr electronic), possibilitando o monitoramento das condições aeróbias da fase II (dados não mostrados).

Amostragem durante o processo de compostagem

As amostras de composto foram coletadas no dia 0 (D0 - início da fase I, após a mistura e adição de água), no dia 6 (D6 - final da fase I, após a homogeneização e adição de água) e após a pasteurização (P57°C, P60°C e P68°C) e condicionamento (C57°C, C60°C e C68°C). No total, foram gerados oito pontos amostrais, dois durante a fase I e seis pontos durante a fase II (Tabela 2, página 99). Cada ponto ou momento de amostragem foi realizado em triplicata, totalizando 24 amostras. Durante a fase I, foram coletadas dez sub-amostras de 50 g, totalizando 500 g. Na fase II, nos biorreatores, foram coletadas três sub-amostras de 20 g, totalizando 60g. As amostras foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido após a amostragem e mantidas a -80°C até o momento da extração de DNA genômico.

Extração do DNA genômico

O DNA genômico foi extraído com o auxílio do PowerLyser™ PowerSoil DNA Isolation Kit (MoBio, Carlsbad, CA, USA). Dez gramas (10 g) de composto foram submersas em 30 mL de solução salina (0,9% NaCl) e mantidas sob agitação durante 8 horas em tubos do tipo falcon de 50ml. Posteriormente, 12ml desta solução foram transferidas para um tubo falcon de 15 mL, e foram centrifugados a 4000

rpm por 20 minutos a temperatura de 4°C para formação de um “pellet” celular, descartando-se o sobrenadante. Em seguida, 400mg deste “pellet” celular foram utilizados para a extração de DNA genômico seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante do kit de extração. O DNA foi extraído em triplicata biológica. Após a extração, o DNA genômico foi quantificado em espectrofotômetro (NanoDrop, modelo 2000c – Thermo Scientific) e visualizado em gel de agarose (1%, 90 v for 40 minutos). Assumindo-se que a razão $A_{260/280}$ foi $\geq 1,8$ e que, desta forma o DNA extraído foi considerado puro ou com boa qualidade, prosseguindo-se com a montagem das bibliotecas genômicas.

Amplificação da região 16S

Os iniciadores (*primers*) utilizados para amplificação da região 16S rRNA bem como a metodologia empregada seguiu a proposta de Caparoso et al. (2012), F515 (forward *primer*) 5'-GTG CCA GCM GCC GCG TAA-3' e R806 (reverse *primer*) 5'-GGA CTA CHV GGG TWT CTA AT-3'. A reação da PCR foi realizada a partir de 40 ng de DNA genômico, da seguinte forma: 5 µL de tampão 5X (OneTaq standard buffer), 0,5 µL de dNTPs (concentração de 10 µM cada), 0,5 µL de cada *primer* (forward e reverse, concentração de 10 µM), 0,15 µL OneTaq DNA polymerase (New England BioLabs) e água livre de nuclease (Qiagen Sciences, Maryland, USA) com reação final ajustada para volume de 25 µL. As condições de amplificação foram: 94°C por 3 minutos, seguidos de 30 ciclos de 94°C por 30s, 50°C por 45s e 68°C por 60s, com extensão final de 5 minutos a 68°C. As amplificações foram realizadas em triplicata (25 µL), para cada réplica biológica, e 5 µL dos produtos da PCR foram utilizados para a visualização em eletroforese (gel de agarose 1%, 100 v por 45 minutos). Após confirmação do tamanho dos fragmentos (entre 300-330 pb), fez-se um “pool” das três amplificações, totalizando 60 µL, dos quais 5 µL foram novamente visualizados em gel de agarose, confirmando os tamanho dos fragmentos de ~315 pb.

Amplificação da região ITS1

Para a amplificação da região ITS1 utilizaram-se os *primers* específicos ITS1F12 (forward *primer*) 5'-GAA CCW GCG GAR GGA TCA-3' e ITS2 (reverse *primer*) 5'- GCT GCG TTC TTC ATC GAT GCC-3' desenvolvidos por Schmidt

et al. (2013) e White et al. (1990), respectivamente. Utilizou-se o mesmo DNA genômico, alterando-se somente as condições da PCR. A reação da PCR foi realizada a partir de 40 ng de DNA, da seguinte forma: 5 µL de tampão 5X (Q5 standard buffer), 0,5 µL de dNTPs (concentração de 10 µM cada), 1,25 µL de cada *primer* (forward e reverse, concentração de 10 µM), 0,25 µL Q5 Hot Start DNA polymerase (New England BioLabs) e água livre de nuclease (Qiagen Sciences, Maryland, USA) com reação ajustada para volume final de 25 µL. As condições de amplificação foram: 98°C por 30 segundos, seguidos de 35 ciclos de 98°C por 10s, 68°C por 30s e 72°C por 20s, com extensão final de 2 minutos a 72°C. As amplificações foram realizadas em triplicata (25 µL) e visualizadas individualmente em gel de agarose (1%, 100 v por 45 minutos) e, após confirmação do tamanho dos fragmentos em gel, fez-se um “pool” das três amplificações, totalizando 60 µL, dos quais 5 µL foram novamente visualizados em gel de agarose, confirmando os tamanhos dos fragmentos entre 300-320 pb.

Montagem das bibliotecas e sequenciamento via *MiSeq*

A montagem das bibliotecas e o sequenciamento na plataforma *MiSeq Illumina* seguiu o protocolo “16S Metagenomic sequencing library preparation” sugerido pela fabricante *Illumina*. Resumidamente, após a primeira amplificação (região de interesse, 16S e ITS1), os produtos da PCR foram purificados com o auxílio de “micro esferas magnéticas” (AmPure magnetic beads) e qualificados (tamanho do fragmento) através da eletroforese capilar (Agilent 2100 Bioanalyzer). O segundo “round” da PCR foi realizado para inserir os index *Illumina* (código de barras) e novamente purificados com auxílio de micro esferas magnéticas e novamente qualificados no Bioanalyzer. A normalização das bibliotecas foi realizada com auxílio do Qubit dsDNA kit, seguindo as instruções do fabricante. Após a normalização, realizou-se novamente a purificação com esferas magnéticas dando-se continuidade ao protocolo de sequenciamento *Illumina*. Utilizou-se o kit *Nextera XT* e o *MiSeq Reagnt Kit V2* de 500 ciclos, capaz de gerar fragmentos finais de 300 paras de base (paired-end 300 x 300 bp).

Processamento dos dados após o sequenciamento

Os arquivos foram baixados do servidor (Huck Institute Life

Science) no formato *fasta* e analisados no software Mothur (SCHLOSS et al., 2013), seguindo o protocolo proposto por Kozich et al., (2013). O sequenciamento gerou cerca de 5 milhões de sequências (reads) brutos para as 48 amostras (24 para bactérias e 24 para fungos). Resumidamente, os arquivos contendo forward e reverse “reads” foram pareados, removido os *primers*, selecionados em relação a tamanho (~250 bp sem iniciadores), clusterizados, remoção de quimeras e classificados utilizando o banco de dados SILVA para bactérias (QUAST et al., 2013) e UNITE v7 à 99% de similaridade para fungos (KÖLJALG et al., 2013). Após a classificação os dados foram manipulados no Excel e no diagrama de Venn (<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>).

Amônia (NH₃)

O nitrogênio liberado na forma de amônia (NH₃) durante a pasteurização e condicionamento (fase II de compostagem) foi determinado pelo método do ácido bórico, adaptando-se um sistema de coleta de gases na saída do fluxo de ar dos biorreatores, como mencionado anteriormente, na seção compostagem. Os valores gerados a partir da titulação (1 mL de HCL = 11,9 mg de NH₃) foram convertidos e expressos em mg de NH₃ por tonelada de composto úmido por hora e, posteriormente, calculou-se o desvio padrão e erro padrão. A detecção de NH₃ foi realizada em triplicata.

Sólidos totais, matéria orgânica, carbono, nitrogênio e relação C/N

Resumidamente, os métodos utilizados para as análises físico-químicas foram: porcentagem de sólidos totais via condutividade elétrica; matéria orgânica através do método de “loss on ignition”, carbono e nitrogênio total, pelo método de oxidação, e a relação C/N, a partir dos valores de carbono e nitrogênio total. As análises foram realizadas no Agricultural Analytical Services Lab na Universidade Estadual da Pensilvânia, PA, Estados Unidos de acordo com Test (2002). Todas as análises foram em triplicata biológica, com posterior cálculo do desvio padrão e o erro padrão.

RESULTADOS

A compostagem em escala experimental (aproximadamente 3 toneladas de composto), realizada em bunkers com aeração forçada, apresentou elevada temperatura durante a fase I de compostagem, 82°C no quarto dia, mantendo-se até o final da fase I da compostagem (sexto dia) (Figura 1, página 100).

Foram detectadas sequências de 14 filos bacterianos ao longo da compostagem (fases I e II), dentre os quais, Actinobacteria, Bacteroidetes, Deinococcus-Thermus, Proteobacteria e Firmicutes apresentaram abundância relativa superior a 1%. O filo Proteobacteria foi predominante na fase I, seguido por Firmicutes e Actinobacteria (Figura 3, página 102). Ao final da fase I, o filo Proteobacteria apresentou 80% das sequências e Firmicutes, 13%, restando 7% das sequências para os demais filos e sequências não classificadas.

Durante a fase II, nos biorreatores, observou-se predominância do filo Firmicutes seguido de Proteobacteria. Firmicutes aumentou em abundância seguindo o gradiente de temperatura da pasteurização (57°C, 60°C e 68°C) com 82, 86 e 90% das sequências, ao contrário de Proteobacteria, que apresentou diminuição em abundância de 8,96 para 6,92 e 2,67%. Mesma tendência foi observada durante o estágio de condicionamento, onde Firmicutes foi o filo mais abundante principalmente no composto pasteurizado a 68°C. Por outro lado, Proteobacteria mostrou-se relativamente mais abundante ao final do condicionamento, quando comparado com as amostras após a pasteurização.

Em nível de gênero, observou-se, que durante a fase I, ocorreu a predominância de sequências dos gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas*, no início da compostagem (dia 0), e *Acinetobacter*, no final da fase I (dia 6). No início da compostagem, o número de sequências incluídas na categoria outros gêneros foi relativamente superior que nos demais pontos analisados, demonstrando maior distribuição entre os gêneros com abundância relativa menor que 1%. Durante a pasteurização, observou-se a predominância de sequências dos gêneros *Luteimonas*, *Paenibacillus*, *Pseudoxanthomonas*, *Clostridium*, e *Ureibacillus*, este último com elevada abundância relativa durante a pasteurização a 68°C (Figura 4, página 103).

O número de gêneros bacterianos no início da compostagem foi superior ao dos demais pontos amostrados, com diminuição na diversidade de sequências

nos momentos de elevada temperatura, final da fase I e sob o regime de pasteurização a 68°C. Entre o início da compostagem (D0) e o final da fase I, o número de gêneros reduziu de 287 para 151, respectivamente (Figura 5, página 104). Durante a fase II, a redução seguiu o gradiente da temperatura de pasteurização, com redução de 157 para 120 e 122 gêneros, nas temperaturas 57, 60 e 68°C, respectivamente. Durante o condicionamento, observou-se um aumento no número de gêneros em comparação com as amostras coletadas após a pasteurização (Figura 5, página 104).

A abundância de sequências fúngicas detectadas em nível de filo foi predominantemente pertencente ao filo Ascomycota, com máxima abundância de 99,64% no início da compostagem, e mínimo de 72,26% após o condicionamento para a amostra pasteurizada a 60°C (Figura 6, página 105). Além do filo Ascomycota, também foram detectados os filos Basidiomycota e Zycomycota. O número de sequências não classificadas em nível de filo foi maior após o condicionamento, principalmente para as amostras pasteurizadas a 57 e 60°C.

Entre os gêneros fúngicos classificados, *Thermomyces*, *Mycothermus* e *Scedosporium* apresentaram maior abundância de sequências durante a compostagem. *Thermomyces* mostrou-se predominante em todos os momentos analisados, exceto após o condicionamento para as amostras pasteurizadas a 57 e 60°C, onde *Mycothermus* foi mais abundante (Figura 7, página 106).

Na figura 8 (página 107), são apresentados os resultados para os gêneros fúngicos. Dos 37 gêneros fúngicos detectados durante a fase I, 23 foram compartilhados entre o início e final da fase I. O maior número de gêneros fúngicos detectados foi durante a etapa de pasteurização (44), no composto pasteurizado a 68°C. Observou-se aumento do número de gêneros fúngicos com a elevação da temperatura durante a pasteurização. Os gêneros detectados após a pasteurização foram de 14, 40 e 44 nas temperaturas de 57, 60 e 68°C, respectivamente. O mesmo ocorreu após o condicionamento, onde o número de gêneros aumentou em função do gradiente de temperatura.

A emissão de NH₃ na fase II da compostagem foi mais acentuada durante a pasteurização, com valores ao redor de 650, 670 e 1015 mg de NH₃/por tonelada de composto/hora, nas temperaturas de 57, 60 e 68°C, respectivamente (Figura 9, página 108). A matéria orgânica diminuiu com o avanço da compostagem, principalmente durante a fase II. O teor inicial de matéria orgânica (base seca) foi de 80%, reduzindo para 78% ao

final da fase I e 74, 73 e 74% ao final do condicionamento para os compostos pasteurizados a 57, 60 e 68°C, respectivamente (Figura 10, página 109). Assim como o teor de matéria orgânica, a porcentagem de sólidos totais também apresentou redução ao longo da compostagem, com redução de 35%, no início da compostagem, para 30%, ao final da fase I, e 25,6; 25,6 e 26,5%, no final do condicionamento para os compostos pasteurizados a 57, 60 e 68°C, respectivamente.

O teores de carbono e nitrogênio apresentaram redução ao longo da compostagem, influenciando a relação C/N do composto. A relação C/N inicial foi de 22:1, apresentando queda para 19:1, ao final da fase I, e 16,2:1, 15,7:1 e 17,4:1, ao final do condicionamento para os compostos pasteurizados a 57, 60 e 68°C, respectivamente (Figura 11, página 110).

DISCUSSÃO

O uso de novas e robustas técnicas de biologia molecular aplicadas a estudos de ecologia microbiana proporcionará uma melhor compreensão da comunidade microbiana envolvida na compostagem para o cultivo de cogumelos. Esta melhor compreensão pode abrir novas possibilidades para a eliminação de odores gerados pela compostagem, disponibilidade de nutrientes para o cogumelo a ser cultivado, controle de doenças, entre outros fatores da produção com base na manipulação de grupos específicos de microrganismos.

O sistema de biorreatores mostrou-se promissor para estudos controlados da compostagem e, de acordo com os resultados obtidos neste experimento, o nível de controle do sistema (fluxo de ar, detecção de gases e amostragem) está de acordo com a proposta dos biorreatores sugeridos inicialmente por Ross e Harris (1982).

O sequenciamento de regiões conservadas das comunidades bacteriana e fúngica revelou que estas são diversificadas e alteraram-se ao longo da compostagem, adaptando-se a fatores externos, como o manejo da compostagem (temperatura) (WAID, 1999; TUOMELA et al., 2000).

Os principais gêneros bacterianos encontrados no início da compostagem eram esperados, especialmente *Pseudomonas*, típicas bactérias colonizadoras de resíduos em decomposição em estágio inicial com elevado teor de matéria orgânica e disponibilidade de componentes de fácil assimilação, como açúcares

solúveis (ALFREIDER et al., 2002). Interessantemente, a abundância elevada de sequências do gênero *Thermobifida* pode estar relacionada com a origem da matéria prima utilizada na elaboração do composto, especialmente a palha de trigo oriunda de baias de equinos, consistindo em uma mistura rica de nitrogênio de fácil assimilação (esterco e urina) e ambiente mesófilo (25-35°C) (TAYLOR et al., 2012).

Ao final da fase I (bunkers), a predominância de *Acinetobacter* pode estar relacionada com a capacidade de desenvolvimento deste gênero em diversos ambientes (DOUGHARI et al., 2011). Martins et al. (2013), utilizando o sequenciamento de alto rendimento através da plataforma *MiSeq Illumina*, reportaram a predominância deste gênero durante a fase termófila da compostagem de resíduos, concordando com os resultados obtidos neste experimento. Song et al. (2014), utilizando a técnica de (DGGE), também relatam a presença deste gênero na fase termófila da compostagem de resíduos.

Os gêneros mais abundantes, detectados na fase II, foram reportados em experimentos anteriores (compostagem para a elaboração de fertilizantes), seja através do isolamento em meio de cultura ou pelo sequenciamento da região 16S rRNA usando diferentes técnicas moleculares. O gênero *Luteimonas*, encontrado principalmente durante a pasteurização, foi isolado da compostagem de resíduos alimentícios por Young et al. (2007) e *Bacillus* foi detectado através do sequenciamento por Martins et al. (2012), durante a fase termófila da compostagem de resíduos. O gênero *Paenobacillus*, criado a partir de espécies do gênero *Bacillus*, foi isolado em meio de cultura a partir da compostagem de resíduos orgânicos (LIDA et al., 2005). A predominância de sequências do gênero *Ureibacillus*, 73% (Figura 4, página 103), durante a pasteurização a 68°C pode estar associada com a capacidade de desenvolvimento das espécies deste grupo em altas temperaturas, como reportado por Weon et al. (2007).

O menor número de gêneros fúngicos detectados durante o processo de compostagem, se comparado com a comunidade bacteriana, justifica-se pela incapacidade dos eucariotos desenvolverem-se em ambientes com elevadas temperaturas (TANSEY; BROCK, 1972; POWELL et al., 2010). Por outro lado, as condições nutricionais do composto, após a fase I, proporcionou o aumento de gêneros fúngicos em altas temperaturas, que aumentaram em abundância seguindo o gradiente de temperatura. Os gêneros *Thermomyces* e *Scedosporium*, considerados termófilos, foram isolados a partir de uma compostagem de resíduos orgânicos municipais por Anastasi et al. (2005). O gênero *Mycothermus* compreende importantes espécies termofílicas celulolíticas, como,

por exemplo, a espécie *Scytalidium thermophilum*, que recentemente foi realocada no gênero *Mycothermus*, chamando-se *Mycothermus thermophilum* (NATVIG et al., 2015). Esta espécie atua como promotor de crescimento do micélio de *A. bisporus* e foi isolada a partir da fase II de compostagem por Straatsma et al. (1994).

Do ponto de vista qualitativo (gêneros), as diferentes situações de pasteurização testadas promoveram alterações na composição da comunidade microbiana, definindo a seletividade final do composto. Aliado a isso, observa-se que a emissão de NH_3 durante a pasteurização a 68°C por 2 horas foi maior se comparada às demais situações (57 e 60°C). Por outro lado, a relação C/N, a matéria orgânica e sólidos totais apresentaram menores valores ao final do condicionamento para o composto pasteurizado a 60°C.

Desta forma, a comunidade microbiana presente no composto pasteurizado a 68°C promoveu maior perda nitrogênio que a do composto pasteurizado a 60°C, justificado pelo valor de nitrogênio total (Figura 11, página 110). Por outro lado, o composto pasteurizado a 60°C perdeu mais carbono que o composto pasteurizado a 68°C (Figura 11, página 110), justificando a menor relação C/N e menor teor de matéria orgânica.

Portanto, os resultados obtidos neste experimento revelam que o manejo (tempo/temperatura de pasteurização) da compostagem interferiu na composição da comunidade microbiana e consequente na composição final do substrato.

Assim, no processo de modernização dos cultivos, a ecologia microbiana terá importante papel na tomada de decisão referente ao manejo da compostagem, o qual interfere diretamente na qualidade final do composto e, consequentemente, na produção do cogumelo *A. bisporus*. Desta forma, sugere-se a continuidade nas pesquisas com foco na ecologia microbiana da compostagem assim como o seu papel funcional. Além disso, pela complexidade de análise dos dados gerados a partir do sequenciamento, os quais demandam tempo de análise e computadores com grande capacidade de processamento de dados (bioinformática), os resultados obtidos neste estudos continuarão a ser processados e analisados.

CONCLUSÕES

- As diferentes condições de pasteurização (tempo/temperatura) promoveram mudanças na comunidade bacteriana e fúngica;

- As alterações da comunidade microbiana promoveram mudanças na composição química final do substrato de cultivo;
- Por último, sugere-se a experimentação a campo para avaliar a influência de diferentes condições de pasteurização na produtividade do cogumelo *Agaricus bisporus*.

REFERÊNCIAS

- ALFREIDER, A. et al. Microbial community dynamics during composting of organic matter as determined by ribosomal DNA analysis. **Compost Science and Utilization**. Philadelphia, v. 10, n. 4, p. 303-312, 2002.
- ANASTASI, A. et al. Isolation and identification of fungal communities in compost and vermicompost. **Mycologia**. Lawrence, v. 97, n. 1, p. 33-44, 2005.
- BEYER, D. M. 2003. Basic procedures for *Agaricus* mushroom growing. College of Agricultural Sciences, The Pennsylvania State University, University Park, PA.
- BIDDLESTONE, A. J.; GRAY, K. R. Composting. In: ROBINSON, C. W.; HOWELL, A. (Coord.) **Comprehensive Biotechnology: the practice of biotechnology, speciality products and service activities**. Oxford: Rergamon, 1985. v. 4, Cap. 6, p.1059-1070.
- CAPAROSO, J. G. et al. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. **The ISME Journal**, Londres, v. 6, p. 1621-1624, 2012.
- CHANG, S. T.; MILES, P. G. **Mushrooms: cultivation, nutritional value, medicinal effect, and environmental impact**. Boca Raton: CRC Press, 2004. 480 p.
- DOUGHARI, H. J.; et al. The ecology, biology and pathogenesis of *Acinetobacter* spp.: an overview. **Microbes and Environments**, Ibaraki, v. 26, n. 2, p. 101-112, 2011.
- GERRITS, J. P. G. Nutrition and compost. In: VAN GRIENSVEN, L. J. L. D. (ed.) **The cultivation of mushrooms** (1. ed.). Rustington: Darlington Mushroom Laboratories, p. 29-72. 1988.
- KÖLJALG, U.; et al. Towards a unified paradigm for sequence-based identification of

fungi. **Molecular Ecology**, Chichester, v. 22, p. 5271-5277, 2013.

KOZICH, J. J. et al. Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform. **Applied and Environmental Microbiology**. Washington, v. 79, n. 17, p. 5112-20, 2013.

HANDELSMAN, J. Metagenomics or Megagenomics? **Nature Reviews Microbiology**, Londres, v. 3, p. 457-458, 2005.

LIDA, K. I. et al. *Paenibacillus motobuensis* sp. Nov., isolated from a composting machine utilizing soil from Motobutown, Okinawa, Japan. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. Londres. v. 55, p. 1811-1816, 2005.

MARTINS, L. F. et al. Metagenomic analysis of a tropical composting operation at the Sao Paulo Zoo Park reveals diversity of biomass degradation functions and organisms. **Plos One**, São Francisco, v. 8, n. 4, e61928, 2013.

MILLER, F. C.; HARPER, E. R.; MACAULEY, B. J.; GULLIVER, A. Composting based on moderately thermophilic and aerobic conditions for the production of commercial mushroom growing compost. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, Collingwood, v. 30, n. 2, p. 287-296, 1990.

NATVIG, D. O. et al. *Mycothermus thermophilus* gen. et comb. nov., a new home for the itinerante thermophile *Scytalidium thermophilum* (*Torula thermophila*). **Mycologia**. Lawrence, v. 107, n. 2, p. 319-327, 2015.

NEHER, D. A. et al. Changes in bacterial and fungal communities across compost recipes, preparation methods, and composting times. **Plos one**, Washington, v. 8, n. 11, e79512, 2013.

NOBLE, R.; GAZE, R. H. Preparation of mushroom (*Agaricus bisporus*) composts in controlled environments: Factors influencing compost bulk density and productivity. **International Biodeterioration and Biodegradation**, Londres, v. 37, n. 1-2, p. 93-100, 1996.

NOBLE, R. et al. Bench-Scale preparation of mushroom substrates in controlled environments. **Compost Science and utilization**. Philadelphia, v. 5, n. 3, p. 32-43, 1997.

NTOUGIAS, S. et al. Bacterial diversity in spent mushroom compost assessed by

amplified rDNA restriction analysis and sequencing of cultivated isolates. **Systematic and Applied Microbiology**, Jena, v. 27, n. 6, p. 746–754, 2004.

OEI, P. **Mushroom cultivation**. 3. ed. Leiden: Backhuys Publishers, 2003. 429 p.

PETERS, S. et al. Succession of microbial communities during hot composting as detected by PCR-Single-Strand-Conformation Polymorphism-Based genetic profiles of small-subunit rRNA genes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 33, p. 930-936, 2000.

POWELL, A. J. et al. Thermophilic fungi in an aridland ecosystem. **Mycologia**. Lawrence, v. 104, p. 813–825, 2010,

QUAST, C. et al. The SILVA ribosomal RNA gene database Project: improved data processing and web-based tools. **Nucleic Acids Research**. Oxford, v. 41, p. 590-596, 2013.

ROSS, R. C.; HARRIS, P. J. Some factors involved in Phase II of mushroom compost preparation. **Scientia Horticultura**, Amsterdam, v. 17, p. 223-229, 1982.

ROYSE, D. J. Trends in Mushroom production worldwide. In: Anais do VII Simpósio internacional sobre cogumelos no Brasil, 2013, Manaus. **Proceedings...** Manaus: INPA. 2013. p. 38-47.

SCHLOSS, P. D. et al. Weber introducing mothur: Open-Source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 75, n. 23, p. 7537-41, 2009.

SCHMIDT, P. A. et al. Illumina metabarcoding of a soil fungal community, **Soil Biology and Biochemistry**, Londres, v. 65, p. 128-138, 2013.

SINDEN, J. W.; HAUSER, E. The short method of composting. **Mushroom Science**, Leamington Spa, v. 1, p. 52-59, 1950.

SONG, C. et al., Comparison of bacterial community structure and dynamics during the thermophilic composting of diferente types of solid wastes: anaerobic digestion residue, pig manure and chicken manure. **Microbial Biotechnology**. Londres, v. 7, p. 424-433, 2014.

SONG, J. et al. Phylogenetic diversity of thermophilic actinomycetes and *Thermoactinomyces* spp. isolated from mushroom composts in Korea based on 16S rRNA gene sequence analysis. **FEMS Microbiology Letters**, Chichester, v. 202, n. 7, p. 97n–102, 2001.

STAMETS, P. **MycoMedicinals: An informational booklet on medicinal**

STRAATSMA, G. et al. Adjustment of the composting process for mushroom cultivation based on initial substrate composition. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 72, n. 1, p. 67-74, 2000.

STRAATSMA, G. et al. 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, 1994.

STRAATSMA, G. et al. Population dynamics of *Scytalidium thermophilum* in mushroom compost and stimulatory effects on growth rate and yield of *Agaricus bisporus*. **Journal of General Microbiology**, Shinfield, v. 135, p. 751-759, 1989.

SZÉKELY, A. J. et al. DGGE and T-RFLP analysis of bacterial succession during mushroom compost production and sequence-aided T-RFLP profile of mature compost. **Microbial Ecology**, New York, v. 57, n. 3, p. 522–533, 2009.

TANSEY, M. R.; BROCK, T. D. The upper temperature limit for eukaryotic organisms. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. Washington, v. 69, n. 9, p. 2426-2428, 1972.

TAYLOR, C. R. et al. Isolation of bacterial strains able to metabolize lignina from screening of environmental samples. **Journal of Applied Microbiology**. Washington, v. 113, p. 521-530, 2012.

TEST Methods for the Examination of Composting and Compost. Maryland: USDA and US Composting Council, 2002. Disponível em: <http://compostingcouncil.org/test-methods-parameters/>. Acesso em 02 nov. 2015.

TUOMELA, M. et al. Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 72, p. 169–183, 2000.

VAN GRIENSVEN, L. J. L. D. **The cultivation of mushrooms**. Sussex: Rustington, 1988. 515 p.

VEDDER, P. J. C. Cultivation. In: CHANG, S. T.; AYES, W. (eds.) **The biology and cultivation of edible mushrooms**. New York: Academic Press, p. 377-392, 1978

WAID, J. S. Does soil biodiversity depend upon metabiotic activity and influences? **Applied soil Ecology**. Amsterdam, v. 13, p. 151-158, 1999.

WEON, H-Y. et al. *Ureibacillus composti* sp. Nov. and *Ureibacillus thermophilus* sp. nov., isolated from livestock-manure composts. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. Londres, v. 57, p. 2908-2911, 2007.

WHITE, T.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: GELFAND, M.; SHINSKY, D.; WHITE, T. (Coord.). **PCR protocols: a guide to methods and applications**. San Diego: Academic Press, 1990, pp. 315-322.

YOUNG, C. C. et al. *Luteimonas composti* sp. nov., a moderately thermophilic bacterium isolated from food wast. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. Londres, v. 57, p. 741-744, 2007.

ZHANG, X. et al. Diversity and dynamics of the microbial community on decomposing wheat straw during mushroom compost production. **Bioresource Technology**. Amsterdam, v. 170, p. 183-195, 2014.

Tabela 1. Fórmula padrão do composto utilizado no Mushroom Research Center (MRC) para o cultivo de *Agaricus bisporus*.

Material	Massa seca	N %
Cama de trigo (baidas de equinos)	1360	1,2
Farelo de soja	57	4,5
Esterco de galinha	72	3,6
Gesso	--	--
N total*		1,9%

* porcentagem de nitrogênio total em relação à massa seca do composto.

Tabela 2. Identificação e pontos amostrados durante a compostagem (fases I e II).

Número das amostras¹	Identificação das amostras	Ponto amostrado	Fases da compostagem
1-3	D0	Dia 0	Fase I – bunker
4-6	D6	Dia 6	
7-9	P57°C	57°C/6h	Fase II - Após a pasteurização em biorreatores
10-12	P60°C	60°C/2h	
13-15	P68°C	68°C/2h	
16-18	C57°C	57°C/6h	Fase II - Após o condicionamento em biorreatores
19-21	C60°C	60°C/2h	
22-24	C68°C	68°C/2h	

¹ Extração de DNA genômico realizado em triplicata para cada ponto amostral.

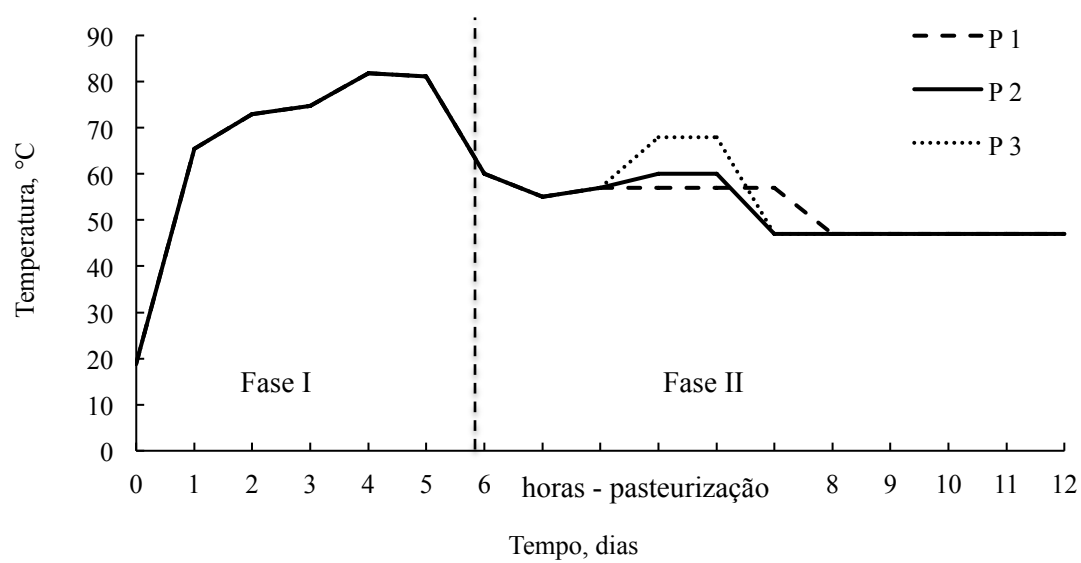


Figura 1. Ilustração das diferentes situações de pasteurização durante a fase II de compostagem, P1 – 57°C/6h; P2 – 60°C/2h e P3 - 68°C/2h.

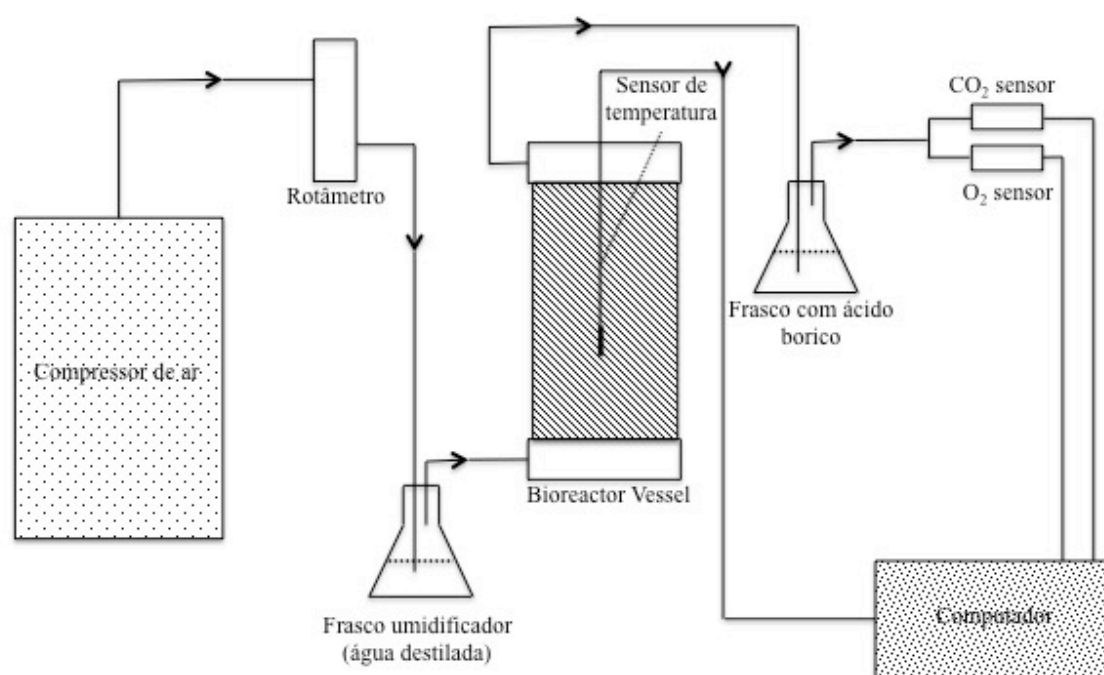


Figura 2. Ilustração dos biorreatores utilizados para simular a fase II de compostagem.

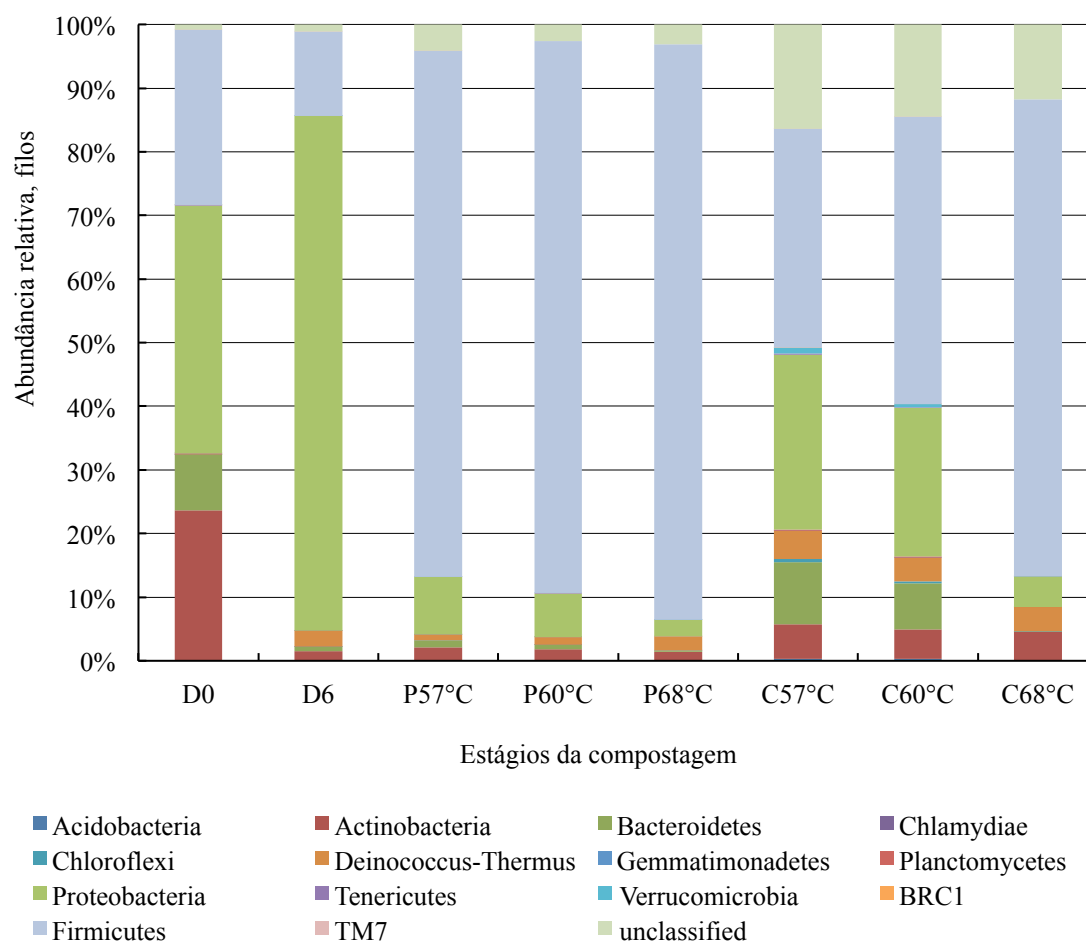


Figura 3. Abundância relativa dos filos bacterianos durante o processo de compostagem (fases I e II). D0 – início da compostagem; D6 – final da fase I; P57°C – pasteurização a 57°C por 6 horas; P60°C – pasteurização a 60°C por 2 horas; P68°C – pasteurização a 68°C por 2 horas; C57°C – condicionamento a 47°C por 5 dias do composto pasteurizado a 57°C por 6 horas; C60°C - condicionamento a 47°C por 5 dias do composto pasteurizado a 60°C por 2 horas; C68°C - condicionamento a 47°C por 5 dias do composto pasteurizado a 68°C por 2 horas.

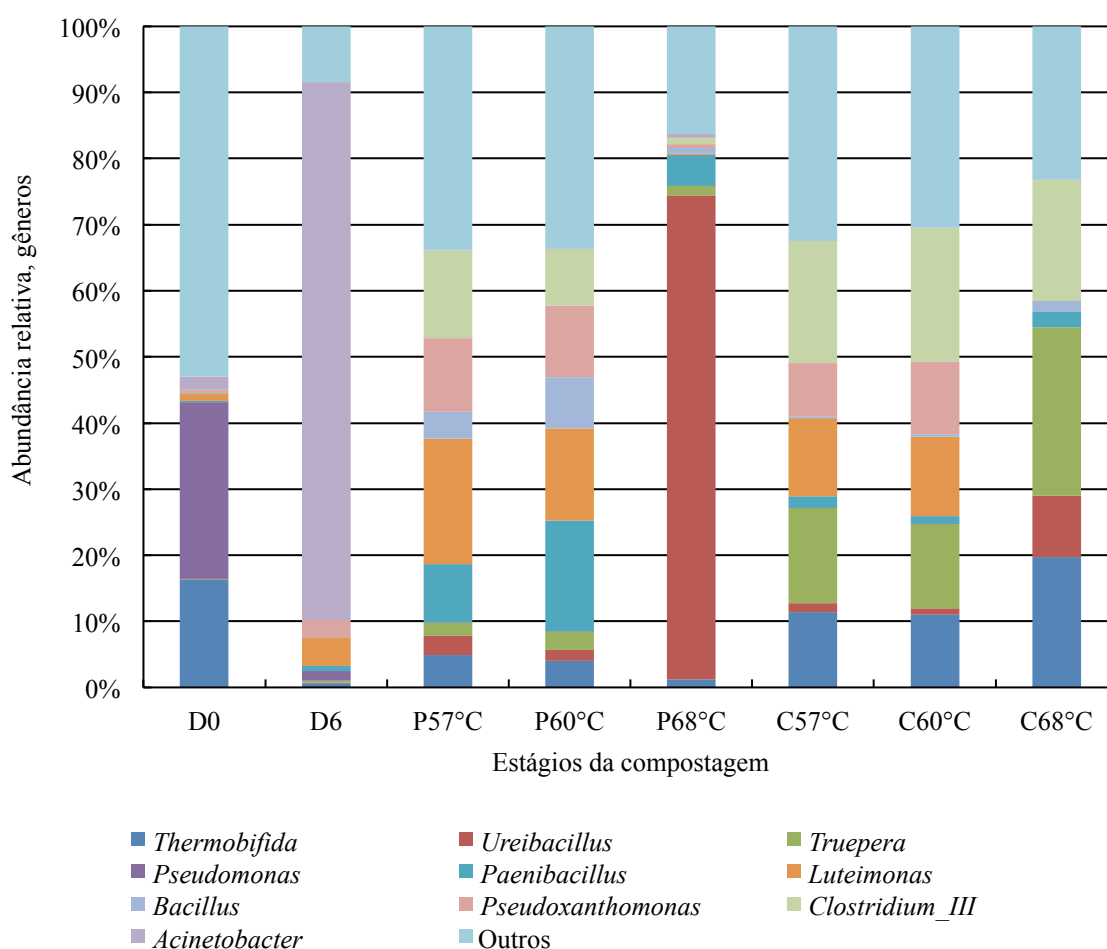


Figura 4. Abundância relativa dos gêneros bacterianos durante o processo de compostagem, fases I e II (os 10 mais abundantes gêneros foram plotados acima e os demais estão inseridos na categoria outros). D0 – início da compostagem; D6 – final da fase I; P57°C – pasteurização a 57°C por 6 horas; P60°C – pasteurização a 60°C por 2 horas; P68°C – pasteurização a 68°C por 2 horas; C57°C – condicionamento a 47°C por 5 dias do composto pasteurizado a 57°C por 6 horas; C60°C - condicionamento a 47°C por 5 dias do composto pasteurizado a 60°C por 2 horas; C68°C - condicionamento a 47°C por 5 dias do composto pasteurizado a 68°C por 2 horas.

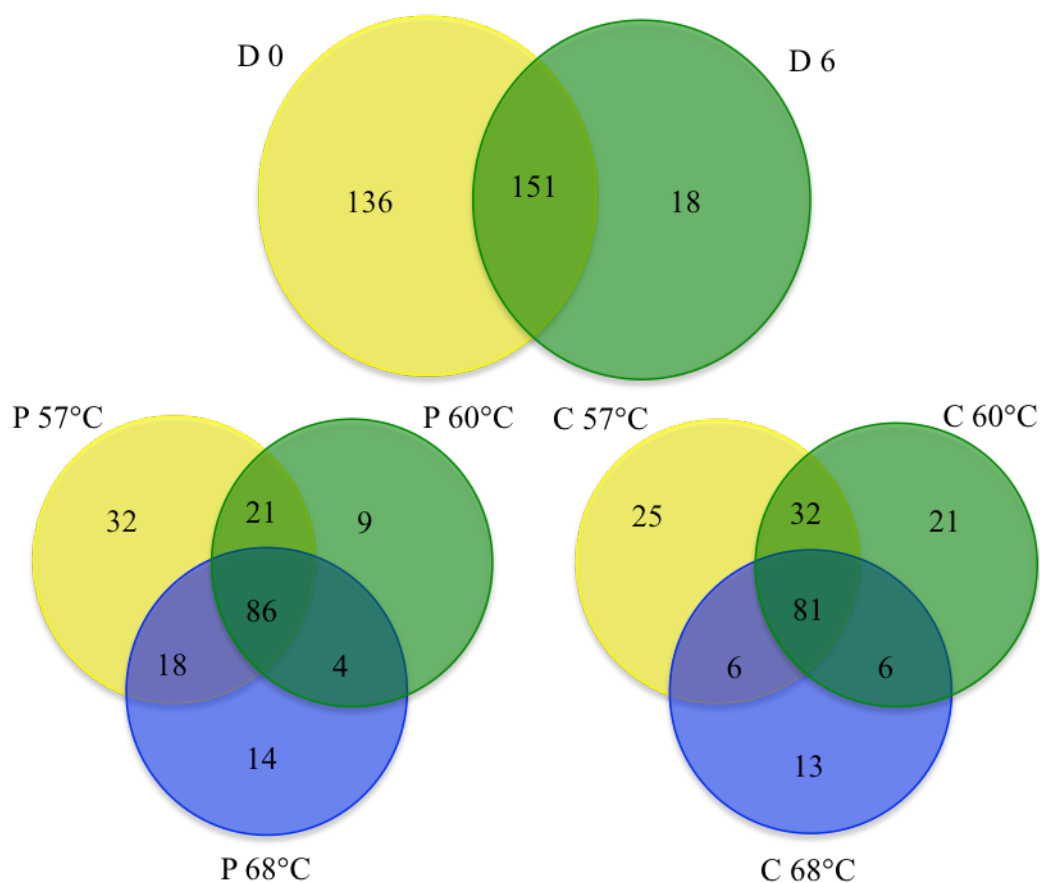


Figura 5. Distribuição dos gêneros bacterianos durante o processo de compostagem (fases I e II). D0 – início da compostagem; D6 – final da fase I; P57°C – pasteurização a 57°C por 6 horas; P60°C – pasteurização a 60°C por 2 horas; P68°C – pasteurização a 68°C por 2 horas; C57°C – condicionamento a 47°C por 5 dias do composto pasteurizado a 57°C por 6 horas; C60°C - condicionamento a 47°C por 5 dias do composto pasteurizado a 60°C por 2 horas; C68°C - condicionamento a 47°C por 5 dias do composto pasteurizado a 68°C por 2 horas.

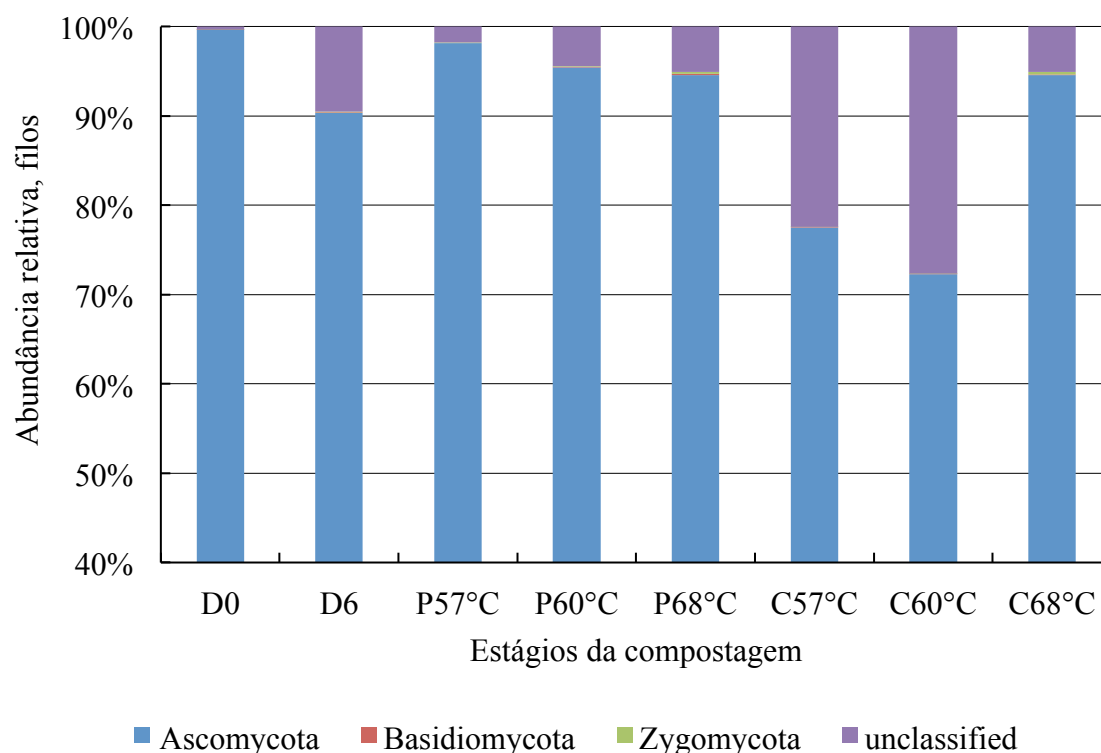


Figura 6. Abundância relativa dos filos fúngicos durante o processo de compostagem (fases I e II). D0 – início da compostagem; D6 – final da fase I; P57°C – pasteurização a 57°C por 6 horas; P60°C – pasteurização a 60°C por 2 horas; P68°C – pasteurização a 68°C por 2 horas; C57°C – condicionamento a 47°C por 5 dias do composto pasteurizado a 57°C por 6 horas; C60°C - condicionamento a 47°C por 5 dias do composto pasteurizado a 60°C por 2 horas; C68°C - condicionamento a 47°C por 5 dias do composto pasteurizado a 68°C por 2 horas.

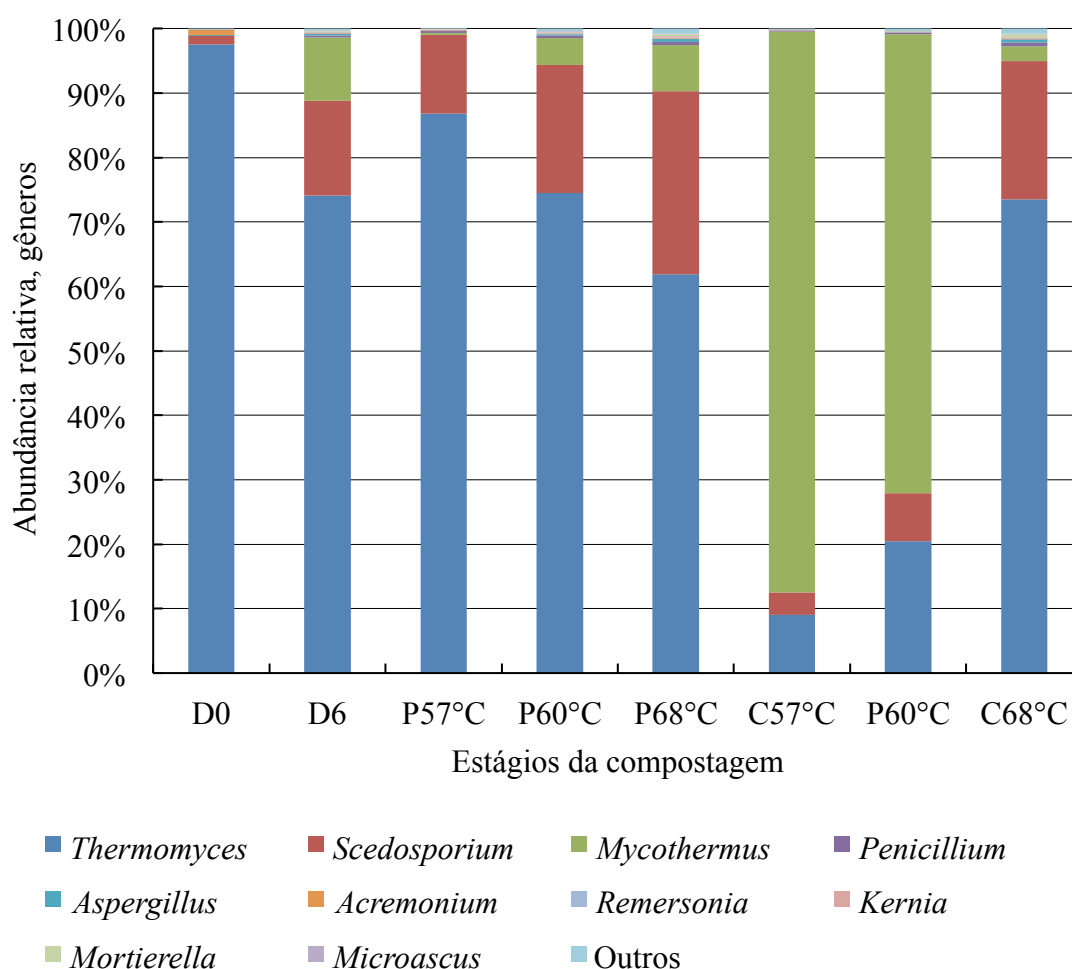


Figura 7. Abundância relativa dos dez gêneros fúngicos mais abundantes durante o processo de compostagem (fases I e II). D0 – início da compostagem; D6 – final da fase I; P57°C – pasteurização a 57°C por 6 horas; P60°C – pasteurização a 60°C por 2 horas; P68°C – pasteurização a 68°C por 2 horas; C57°C – condicionamento a 47°C por 5 dias do composto pasteurizado a 57°C por 6 horas; C60°C - condicionamento a 47°C por 5 dias do composto pasteurizado a 60°C por 2 horas; C68°C - condicionamento a 47°C por 5 dias do composto pasteurizado a 68°C por 2 horas.

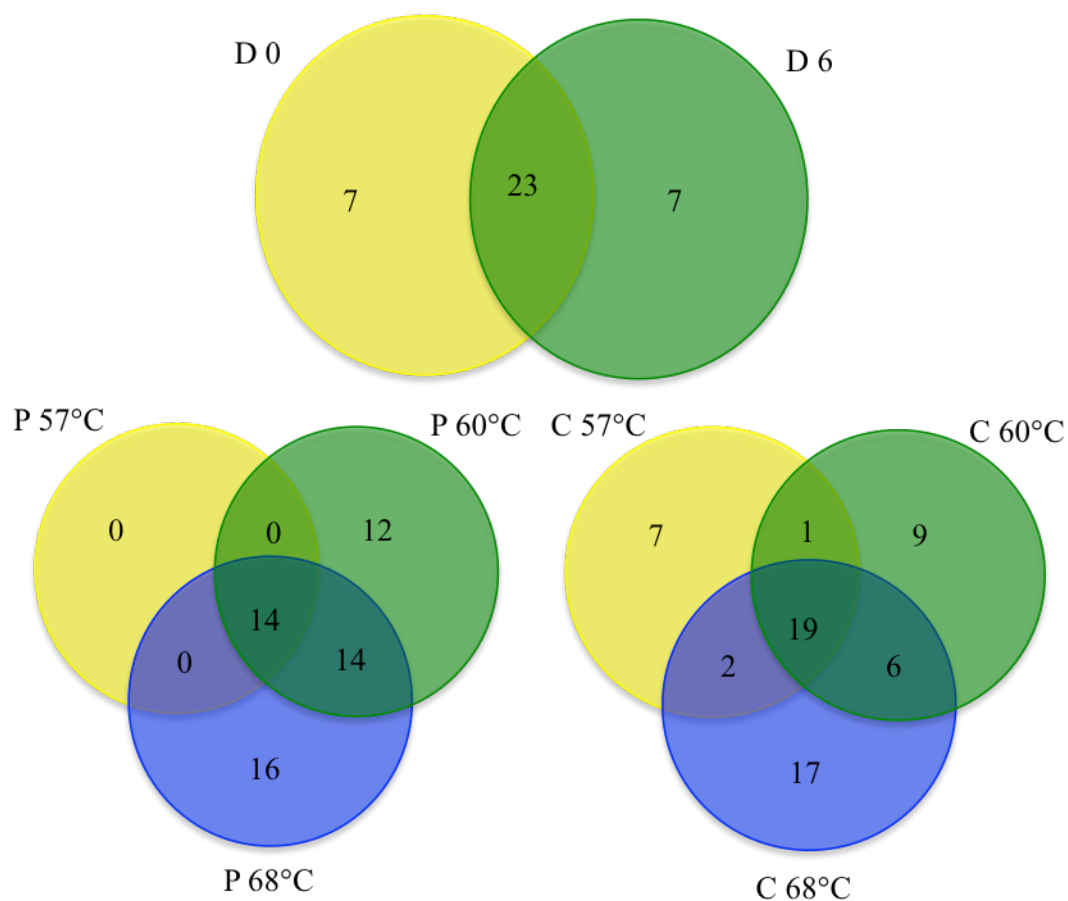


Figura 8. Distribuição dos gêneros fúngicos durante o processo de compostagem (fases I e II). D0 – início da compostagem; D6 – final da fase I; P57°C – pasteurização a 57°C por 6 horas; P60°C – pasteurização a 60°C por 2 horas; P68°C – pasteurização a 68°C por 2 horas; C57°C – condicionamento a 47°C por 5 dias do composto pasteurizado a 57°C por 6 horas; C60°C - condicionamento a 47°C por 5 dias do composto pasteurizado a 60°C por 2 horas; C68°C - condicionamento a 47°C por 5 dias do composto pasteurizado a 68°C por 2 horas.

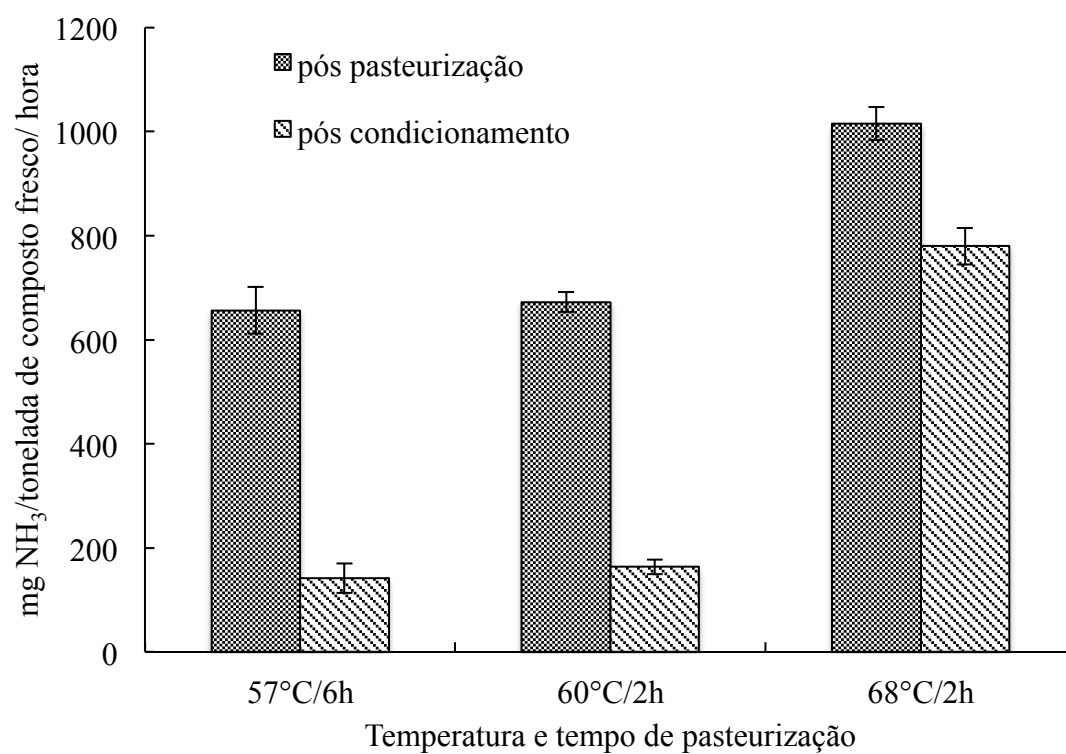


Figura 9. Emissão de NH₃ pós pasteurização e pós condicionamento do composto em condições experimentais (biorreatores).

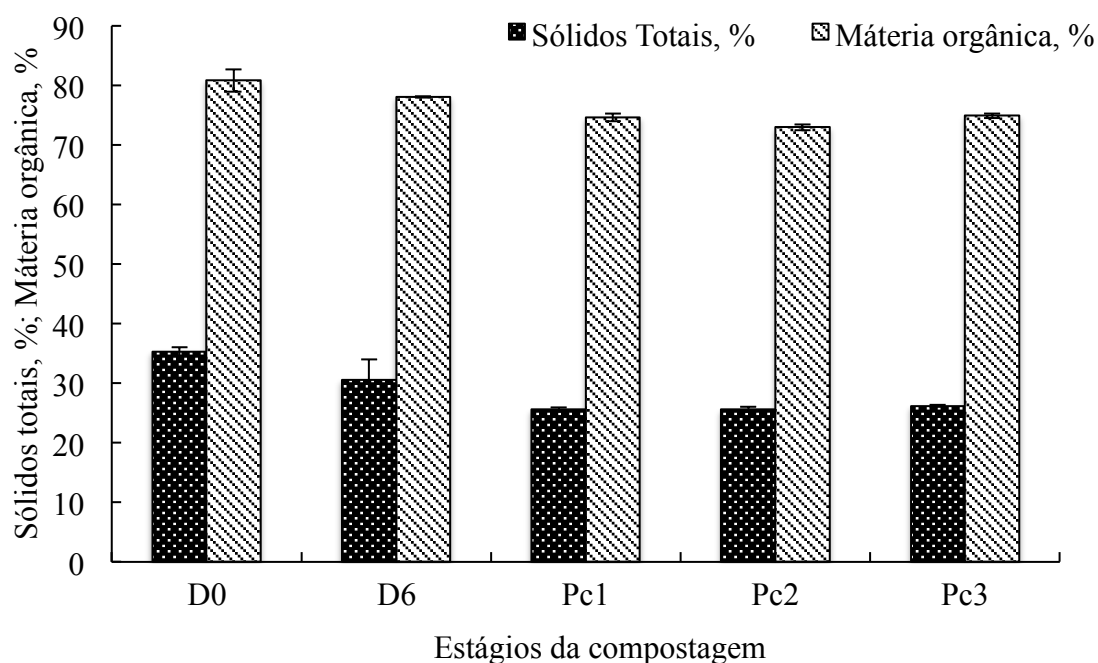


Figura 10. Porcentagem de sólidos totais e matéria orgânica do composto (base seca) durante a fases I e II de compostagem. D0 – início da compostagem; D6 – final da fase I; Pc1 - condicionamento à 47°C por 5 dias do composto pasteurizado à 57°C por 6 horas; Pc2 - condicionamento à 47°C por 5 dias do composto pasteurizado à 60°C por 2 horas; Pc3 - condicionamento à 47°C por 5 dias do composto pasteurizado à 68°C por 2 horas.

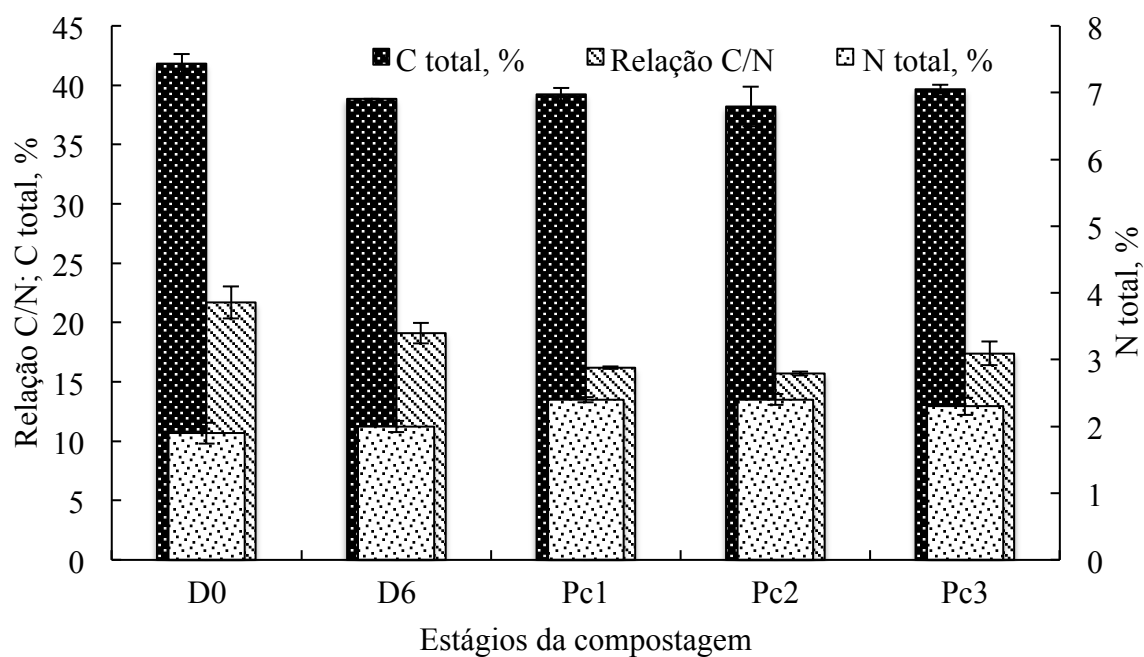


Figura 11. Porcentagem de carbono (C), nitrogênio (N) e relação C/N do composto durante a fases I e II da compostagem (base seca). D0 – início da compostagem; D6 – final da fase I; Pc1 - condicionamento a 47°C por 5 dias do composto pasteurizado a 57°C por 6 horas; Pc2 - condicionamento a 47°C por 5 dias do composto pasteurizado a 60°C por 2 horas; Pc3 - condicionamento a 47°C por 5 dias do composto pasteurizado a 68°C por 2 horas.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A seletividade do substrato para o cultivo dos cogumelos *Pleurotus ostreatus* e *Agaricus bisporus* ainda não está totalmente elucidada, necessitando de continuidade nas pesquisas com foco na ecologia microbiana durante a compostagem. Desta forma, sugere-se, para estudos futuros, além de análises taxonômicas da comunidade microbiana, a inclusão de análises funcionais, como a metatranscriptoma e metaproteoma, possibilitando compreender o papel funcional destes microrganismos no processo e, conseqüentemente, a melhoria do manejo da compostagem.

6 CONCLUSÕES GERAIS

De acordo com os resultados obtidos nas condições experimentais deste trabalho, pode-se concluir que:

1) O tempo de compostagem da fase I e II influenciou a produtividade e o número de cachos do cogumelo ostra. A compostagem com 7 dias de fase I seguida de pasteurização e condicionamento apresentou os melhores resultados.

2) A metagenômica da comunidade microbiana na fase I de compostagem revelou que substratos compostados por períodos curtos (5 e 10 dias) possuem uma atividade microbiana menos intensa, proporcionando um substrato de cultivo mais seletivo para o cultivo do cogumelo ostra.

3) A metagenômica da comunidade microbiana da fase II de compostagem mostrou que o manejo da temperatura de pasteurização em condições experimentais apresentou mudanças na composição da comunidade microbiana e, conseqüentemente, na composição final do composto, ressaltando a necessidade de continuidade das pesquisas em ecologia microbiana da compostagem, focando a produção de um substrato mais seletivo para o cultivo do cogumelo *Agaricus bisporus*.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. **Introductory Mycology**. 4. ed. New York: John Wiley & Sons, 1996. 868 p.

AMANN, R. I.; LUDWIG, W.; SHLEIFER, K-H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 59, n. 1, p. 143-169, 1995.

ANPC. São Paulo: Associação Nacional dos Produtores de Cogumelos, 2014. Disponível em: <http://www.anpc.org.br/index.php/informacoes/139-produtores-brasileiros-de-cogumelos-enfrentam-forte-concorrencia-com-produto-chines>. Acesso em: 15 jun. 2014.

BALDRIAN, P.; GABRIEL, J. Lignocellulose degradation by *Pleurotus ostreatus* in the presence of cadmium. **FEMS Microbiology Letters**, Chichester, v. 220, p. 235-240, 2003.

BAYSAL, E. et al. Cultivation of oyster Mushroom on waste paper with some added supplementary materials. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 89, p. 95-97, 2003.

BERNARDI, E.; MINOTTO, E.; NASCIMENTO, J. S. Aproveitamento de resíduos de curtume como suplemento no cultivo de *Pleurotus ostreatus*. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 75, n. 2, p. 243-246, 2008.

BELS-KONING, H. C.; BELS, P. J. **Handleiding voor de Champignoncultuur**. Horst: Instituut voor Tuinbouwtechniek, 1958. 295 p.

BERTOLDI, M.; VALLINI, G.; PERA, A. The biology of composting: a review. **Waste Management Research**, Londres, v. 1, p. 157-176, 1983.

BRASIL. Resolução N. 36, de 18 de dezembro de 2003. Encerrar a investigação de revisão decidindo pela prorrogação do direito antidumping definitivo sobre as importações de cogumelos conservados da espécie *Agaricus bisporus*. **Diário oficial da União**, Brasília, DF, n. 247, p. 7, 23 dez. 2003. Seção 1.

BONATTI, M. et al. Evaluation of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus sajor-caju* nutritional characteristics when cultivated in different lignocellulosic wastes. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 88, n. 3, p. 425-428, mar., 2004.

BONONI, V. L. et al. **Cultivo de cogumelos comestíveis**. 2. ed. São Paulo: Ícone, 1999. 206 p.

CARVALHO, C. S. M.; ANDRADE, M. C. N.; SALES-CAMPOS, C. Mushrooms of the *Pleurotus* genus: a review of cultivation techniques. **Interciência**, Caracas, v. 35, n. 3, p. 177-182, 2010.

CHANDNA, P. et al. Assessment of bacterial diversity during composting of agricultural byproducts. **BMC Microbiology**, Londres, v. 13, 99, 2013.

CHANG, S. –T. The world mushroom industry: trends and technological development. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, Danbury, v. 8, n. 4, p. 297-314, 2006.

CHANG, S. T.; MILES, P. G. **Mushrooms: cultivation, nutritional value, medicinal effect, and environmental impact**. Boca Raton: CRC Press, 2004. 480 p.

COONEY, D. G.; EMERSON, R. **Thermophilic Fungi – an account of their biology, activities and classification**. São Francisco: Freeman Co., 1964. 210 p.

DIAS, E. S. Mushroom Cultivation In Brazil: Challenges and Potential For Growth. **Ciência Agrotecnologia Lavras**, Lavras, v. 34, n. 4, p. 795-803, 2010.

DIAS, E. S. Truths and myths about the mushroom *Agaricus blazei*. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 61, n. 5, p. 545-549, 2004.

DIAS, E. S. et al. Cultivo do cogumelo *Pleurotus sajor-caju* em diferentes resíduos

agrícolas. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 6, p. 1363-1369, 2003.

DONINI, L. P.; BERNARDI, E.; NASCIMENTO, J. S. Colonização do substrato capim-elefante suplementado com farelos por *Pleurotus ostreatus*. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, Londrina, v. 6, n. 2, p. 185-193, 2006.

EGER, G.; EDEN, G.; WISSIG, E. *Pleurotus ostreatus* – Breeding potential of a new cultivation mushroom. **Theoretical and Applied Genetics**, Heidelberg, v. 47, n. 4, p. 155-164, 1976.

EIRA, A. F.; MINHONI, M. T. A. **Manual de cultivo do "hiratake" e "shimeji"** (*Pleurotus* spp.). Botucatu: FEPAF, 1997. 345 p.

EUGENIO, C. P.; ANDERSON, N. A. The genetics and cultivation of *Pleurotus*. **Mycologia**, Lawrence, v. 60, p. 627-634, 1968.

FAOSTAT: Food and agriculture organization of the United Nations, 2014. Disponível em: <http://faostat.fao.org>. Acesso em: 23 Jan. 2014.

FERGUS, C. L. Thermophilic and thermotolerant molds and actinomycetes of mushroom compost during peak heating. **Mycologia**, Lawrence, v. 56, n. 2, p. 267-284, 1964.

FERGUS, C. L.; SINDEN, J. W. A new thermophilic fungus from mushroom compost: *Thielavia thermophila* spec. nov. **Canadian Journal Botany**, Ottawa, v. 47, n. 10, p. 1635-1637, 1969.

GEML, J.; LABUSCHAGNE, P.; ROYSE, D. J. Oyster mushroom production on three continents: An overview of cultivation in Hungary, South Africa and the United States. **Mushroom News**, Washington, v. 49, n. 2, p. 4-13, 2001.

GERRITS, J. P. G. Nutrition and compost. In: VAN GRIENSVEN, L. J. L. D. **The cultivation of mushrooms**. 1. ed. Horst: Darlington Mushroom Laboratories, 1988. Cap. 2, p. 29-72.

GERRITS, J. P. G. et al. Phase I process in tunnels for the production of *Agaricus bisporus* compost with special reference to importance of water. **Mushroom Science**, Leamington Spa, v. 1, n. 14, p. 203-212, 1995.

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

GIARDINA, P. et al. The gene, protein and glycan structures of laccase from *Pleurotus ostreatus*. **European Journal of Biochemistry**, Chichester, v. 235, n. 3, p. 508-515, 1996.

HANDELSMAN, J. Metagenomics or Megagenomics? **Nature Reviews Microbiology**, Londres, v. 3, p. 457-458, 2005.

HANDELSMAN, J. Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 68, p. 669-685, 2014.

HANDELSMAN, J.; RONDON, M. R.; BRADY, S. F.; CLARDY, J.; GOODMAN, R. M. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. **Cell Chemical Biology**, Amsterdam, v. 5, n. 10, p. 245-249, 1998.

HERNÁNDEZ, D.; SÁNCHEZ, J. E.; YAMASAKI, K. A simple procedure for preparing substrate for *Pleurotus ostreatus* cultivation. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 90, n. 2, p. 145-150, 2003.

HOLTZ, M.; et al. Cultivo de *Pleurotus ostreatus* utilizando resíduos de algodão da indústria têxtil. **Revista de Ciências Ambientais**, Londrina, v. 3, n. 1, p. 37-51, 2009.

HUGENHOLTZ, P.; GOEBEL, B. M.; PACE, N. R. Impact of culture-Independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 180, n. 18, p. 4765-4774, 1998.

IBGE, Brasília: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2014. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/paisesat/main_frameset.php. Acesso em: 10 jul. 2014.

INDEX FUNGORUM, 2015. Disponível em: <http://www.indexfungorum.org/names/namesrecord.asp?RecordID=292246>. Acesso em: 20 dez. 2015.

IEA. Instituto de Economia Agrícola. São Paulo: Banco de dados do IEA. 2014. Disponível em: http://ciagri.iea.sp.gov.br/nia1/subjetiva.aspx?cod_sis=1&idioma=1. Acesso em: 3 Set de 2012.

JANN, G. J.; HOWARD, D. H.; SALLE, A. J. Method for the determination of completion of composting. **Applied Microbiology**, Washington, v. 7, n. 5, p. 271-275, 1959. Disponível em: <http://aem.asm.org/content/7/5/271.full.pdf+html?sid=b4e0b65a-ea56-4c99-9a5d-f7295eaf5cf9>. Acesso em: 10 nov. 2013.

KAUFERT, F. **The biology of *Pleurotus corticatus* Fries**. Minnesota: Minnesota Agricultural Experiment Station Bulletin, 1936, 114 p.

KIEHL, E. J. **Fertilizantes Orgânicos**. Piracicaba: Editora Ceres, 1985. 492 p.

KIRK, P. M. et al. **Dictionary of the Fungi**. Wallingford: CABI, 2011. 771 p.

KUO, M. *Agaricus bisporus*: The button mushroom. Mushroom expert, 2004. Disponível em: http://www.mushroomexpert.com/agaricus_bisporus.html. Acesso em: 20 dez. 2015.

LABORDE, J.; DELIVIAS, J.; DELPECH, P. Preparation rapide des substrats pour la culture du cahmpingon de couche: questions posees et tentative de response. **Mushroom Science**, Londres, v. 10, n. 2, p. 85-104, 1979.

LANGE, J. E. "Studies in the agarics of Denmark. Part VI. *Psalliota*, *Russula*". **Dansk botanisk Arkiv**, v. 4, n. 12, p. 1-52, 1926.

LEE, H. Y. et al. Automation of solid-state bioreactor for Oyster Mushroom composting. **Microbiology**, Seul, v. 30, n. 4, p. 228-232, 2002.

LEÓN, V. T. C.; LARA, H. L. Factores que influyen en la producción de substratos selectivos para el cultivo de *Pleurotus ostreatus*. In: VÁZQUEZ J. E. S.; CARRERA, D. M.; MATA, G.; LARA, H. L. (Coord.). **El cultivo de setas *Pleurotus* spp. en México**. Chiapas: Ecosur, 2007. v. 1, Cap. 3, p. 81-90.

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

LI, Y. Present development situation and tendency of edible mushroom industry in China. **Mushroom Science**, Leamington Spa, v. 18, p. 3-9, 2012.

LIANG, C.; DAS, K. C.; MCCLENDON, R. W. The influence of temperature and moisture contents regimes on the aerobic microbial activity of a biosolids-composting blend. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 86, p. 131-137, 2003.

LIN, Z.; CHEN, H.; LIN, F. Influence of treatments and blanching treatments on the yield and color of canned mushrooms. **Journal of Food Processing and Preservation**, Londres, v. 25, p. 381–388, 2001.

MACAYA-LIZANO, A. V. Cultivo de *Pleurotus ostreatus* y especies afines (Funghi: Pleurotaceae) sobre medios naturales semi-esteriles. **Revista de Biología Tropical**, San Jose, v. 36, n. 2, p. 255-260, 1988.

MACHADO, R. M.; TOLEDO, M. C. Sulfitos em Alimentos. **Brazilian Jorunal of Food Technology**, Campinas, v. 9, n. 4, p. 65-75, 2006.

MANZI, P.; PIZZOFERRATO, L. Beta-glucans in edible mushrooms. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 68, n. 3, p. 315-318, 2000.

MARTINS, L. F. et al. Metagenomic analysis of a tropical composting operation at the Sao Paulo zoo park reveals diversity of biomass degradation functions and organisms. **Plos One**, São Francisco, v. 8, n. 4, e61928, 2013.

MARINO, R. H. et al. Crescimento e cultivo de diferentes isolados de *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer em serragem da casca de coco. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 75, n. 1, p. 29-36, 2008.

MARINO, R. H.; EIRA, A. F.; CARDOSO, E. Q. Melhoramento genético de *Pleurotus ostreatus* (Jap. : Fr.) Kumm. Por cruzamentos multispóricos visando a obtenção de isolados resistentes ao calor. **Hoehnea**, São Paulo, v. 33, n. 3, p. 349-357, 2006.

MATTILA, P. et al. Contents of vitamins, mineral elements, and some phenolic compounds in cultivated mushrooms. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 49, n. 5, p. 2343–2348, 2001.

MOLENA, O. **O moderno cultivo de cogumelos**. São Paulo: Nobel, 1986. 170 p.

MUEZ, M. A.; PARDO, J. La preparación del substrato. In: VÁZQUEZ, J. E. S.; ROYSE, D. J. (Coords.) **La biología y el cultivo de *Pleurotus* spp. en México**. Chiapas: Editora Limusa, 2001, v. 1, Cap. 4, p. 157-186.

NEHER, D. A. et al. Changes in bacterial and fungal communities across compost recipes, preparation methods, and composting times. **Plos one**, Washington, v. 8, n. 11, e79512, 2013.

NOBLE, R.; GAZE, R. H. Preparation of mushroom (*Agaricus bisporus*) composts in controlled environments: Factors influencing compost bulk density and productivity. **International Biodeterioration and Biodegradation**, Londres, v. 37, n. 1-2, p. 93-100, 1996.

NUNES, D. M. et al. Nitrogen supplementation on the productivity and the chemical composition of oyster mushroom. **Journal Food Research**, Toronto, v. 1, n. 2, p. 113-119, 2012.

OEI, P. **Mushroom cultivation**. 3. ed. Leiden: Backhuys Publishers, 2003. 429 p.

ORORBIA, M. Á. M.; NÚÑEZ, J. P. La preparación del substrato. In: VÁZQUEZ, J. E. S.; ROYSE, D. J. (eds.) **La biología y el cultivo de *Pleurotus* spp.** Chiapas: Ecosur, 2001, cap. 3, p. 157–186.

PARTANEN, P. et al. Bacterial diversity at different stages of the composting process. **BMC Microbiology**, Londres, v. 10, p. 1-12, 2010.

PEDRA, W. N.; MARINO, R. H. Cultivo axênico de *Pleurotus* spp. em serragem da casca de coco (*Cocos nucifera* Linn.) suplementada com farelo de arroz e/ou de trigo. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 73, n. 2, p. 219-225, 2006.

PETERS, S. et al. Succession of microbial communities during hot composting as detected by PCR-Single-Strand-Conformation Polymorphism-Based genetic profiles of small-subunit rRNA genes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 33, p. 930-936, 2000.

RAMÍREZ, L.; LARRAYA, L. M.; PISABARRO, A. G. Molecular tools for breeding basidiomycetes. **International Microbiological**, Madri, v. 3, p. 146-152, 2000.

REIS JUNIOR, F. B. et al. Uso de ferramentas Moleculares em estudos da diversidade de microrganismos do solo. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2002. 33 p.

REISENFELD, C.; SCHLOSS, P.; HANDELSMAN, J. Metagenomics: Genomic Analysis of Microbial Communities. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v. 38, p. 525-552,

2004.

ROYSE, D. J. Trends in Mushroom production worldwide. In: Anais do VII Simpósio internacional sobre cogumelos no Brasil, 2013, Manaus. **Proceedings...** Manaus: INPA. 2013. p. 38-47.

ROYSE, D. J. et al. Yield, mushroom size and time to production of *Pleurotus cornucopiae* (oyster mushroom) grown on switch grass substrate spawned and supplemented at various rates. **Bioresource Technology**, Amsterdam, n. 78, p. 293-300, 2004.

RÜHL, M.; KÜES, U. Mushroom production. In: KÜES, U. (ed.) **Wood production, wood technology, and biotechnological impacts**. Göttingen: Universitätsverlag Göttingen, 2007. p. 555–559.

SAIKI, R. K. et al. Enzymatic amplification of B-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, Washington, v. 230, n. 4732, p. 1350-1354, 1985.

SAMSON, R. A. et al. **Introduction to Food-Borne Fungi**. 4. ed. Baarn: Centraalbureau Voor Schimmelcultures, 1995. 247 p.

SÁNCHEZ, C. Cultivation of *Pleurotus ostreatus* and other edible mushrooms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Heidelberg, v. 85, n. 5, p. 1321-1337, 2010.

SCHLOSS, P. D.; HANDELSMAN, J. Status of the microbial census. **Microbiology and Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 68, n. 4, p. 686-691, 2004.

SCHMIDT, T. M.; DELONG, E. F.; PACE, N. R. Analysis of a marine picoplankton community by 16S rRNA gene cloning and sequencing. **Journal of Bacteriology**, New York, v. 173, n. 14, p. 4371–4378, 1991.

SHARMA, H. S. S.; LYONS, G.; CHAMBERS, J. Comparison of the changes in mushroom (*Agaricus bisporus*) compost during windrow and bunker stages of phase I and II. **Annals of Applied Biology**, Chichester, v. 136, n. 1, p. 59-68, 2000.

SILVA, C. F. et al. Microbial diversity in a bagasse-based compost prepared for the production of *Agaricus brasiliensis*. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 40,

n. 3, p. 590-600, 2009.

SILVA, E. G. et al. Análise química de corpos frutificação *Pleurotus sajor-caju* cultivado em diferentes concentrações de nitrogênio. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 1 p. 72-75, 2007.

SINDEN, J. W.; HAUSER, E. The short method of composting. **Mushroom Science**, Leamington Spa, v. 1, p. 52-59, 1950.

SINDEN, J. W.; HAUSER, E. The nature of the composting process and its relation to short composting. **Mushroom Science**, Leamington Spa, v. 2, p. 123, 1953.

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

SMITH, J. F.; SPENCER, D. M. Rapid preparation of composts suitable for the production of the cultivated mushroom. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 5, n. 1, p. 23-31. 1976.

SWEENWY, M. D.; XU, F. Biomass converting enzymes as industrial biocatalysts for fuels and chemicals: recent developments. **Catalysts**, Knoxville, v. 2, n. 2, p. 244-263, 2012.

SONG, J. et al. Phylogenetic diversity of thermophilic actinomycetes and *Thermoactinomyces* spp. isolated from mushroom composts in Korea based on 16S rRNA gene sequence analysis. **FEMS Microbiology Letters**, Chichester, v. 202, n. 1, p. 97-102, jul., 2001. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/store/10.1111/j.1574-6968.2001.tb10786.x/asset/j.1574-6968.2001.tb10786.x.pdf?v=1&t=i0fi7gt1&s=5c8618aa88c9cab5d3ea231c968ba948244704ee>. Acesso em: 12 mar. 2014.

STAMETS, P. **MycoMedicinals: An informational booklet on medicinal mushrooms**. 2. ed. Berkeley: Ten Speed Press, 2000. 48 p.

STAMETS, P. **Mycelium running: how mushrooms can help save the world**. Berkeley: Ten speed press, 2005. 330 p.

STAMETS, P.; CHILTON, J. S. **The mushroom cultivator**: a practical guide to growing mushrooms at home. Olympia: Agarikon Press, 1983. 415 p.

STEELE, H. L.; STREIT, W. R. Metagenomics: Advances in ecology and biotechnology. **FEMS Microbiology Letters**, Chichester, v. 247, n. 2, p. 105-111, 2005.

STÖLZER, S.; GRABBE, K. Mechanisms of substrate selectivity in the cultivation of edible fungi. In: MAHER, M. J. **Science and cultivation of edible fungi**. Rotterdam: Balkema. 1991. Cap. 3, p. 141-146.

STRAATSMA, G. et al. Adjustment of the composting process for mushroom cultivation based on initial substrate composition. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 72, n. 1, p. 67-74, mar., 2000. Disponível em: http://ac.els-cdn.com/S0960852499000887/1-s2.0-S0960852499000887-main.pdf?_tid=faf7229a-4331-11e4-8b12-00000aab0f27&acdnat=1411484447_2e71682f36e7cbaf0a9dba5b1a4ebd28. Acesso em: 11 fev. 2013.

STRAATSMA, G. et al., Ecology of thermophilic fungi in mushroom compost, with emphasis on *Scytalidium thermophilum* and growth stimulation *Agaricus bisporus* mycelium. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 60, n. 2, p. 454-458, 1994.

STRAATSMA, G. et al. Population dynamics of *Scytalidium thermophilum* in mushroom compost and stimulatory effects on growth rate and yield of *Agaricus bisporus*. **Journal of General Microbiology**, Shinfield, v. 135, p. 751-759, 1989.

SZÉKELY, A. J. et al. DGGE and T-RFLP analysis of bacterial succession during mushroom compost production and sequence-aided T-RFLP profile of mature compost. **Microbial Ecology**, New York, v. 57, n. 3, p. 522-533, 2009.

TEATHER, R. M.; WOOD, P. J. Use of congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 43, n. 4, p. 777-780, 1982.

TORSVIK, V.; ØVREÅS, L.; THINGSTAD, T. F.; Prokaryotic diversity--magnitude, dynamics, and controlling factors. **Science**, Washington, v. 296, n. 5570, p. 1064-1066, 2002.

TUOMELA, M. et al. Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 72, p. 169-183, 2000.

TOUSSAINT-SAMAT, M. **History of food**. New York: Barnes & Noble Books, 1992. 659 p.

URBEN, A. F. **Produção de cogumelos por meio de tecnologia chinesa modificada**. Brasília, DF: Embrapa. 187p. 2004.

VAJNA, B. et al. Microbial community structure changes during oyster mushroom substrate preparation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Heidelberg, v. 86, n. 1, p. 367–375, dez., 2010. Disponível em: http://download.springer.com/static/pdf/998/art%253A10.1007%252Fs00253-009-2371-3.pdf?auth66=1411666416_c2e89a0e63ffadb90e89e39ac75cf0c3&ext=.pdf. Acesso em 19 set. 2013.

VALÊNCIA, N. R.; LÓPEZ, C. J. **Cultivo de hongos comestibles del género *Pleurotus*: sobre residuos agrícolas de la zona cafetera**. Chinchiná: Cenicafé, Boletín Técnico no. 27, 2005. 54 p.

VAN DEN BRINK, J.; DE VRIES, R. P. Fungal enzyme sets for plant polysaccharide degradation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Heidelberg, v. 91, n. 6, p. 1477–1492, 2011.

VAN GRIENSVEN, L. J. L. D. **The cultivation of mushrooms**. 1. ed. Sussex: Rustington, 1988. 515 p.

VAN LIER, J. J. C. et al. Composting of mushroom substrate in a fermentation tunnel: compost parameters and a mathematical model. **Netherlands Journal of Agricultural Science**, Amsterdam, v. 42, n. 4, p. 271-292, 1994.

VAN SOEST, P. J. Voluntary intake relation to chemical composition and digestibility. **Journal Animal Science**, Champaign, v. 24, n. 3, p. 834-844, 1985.

VARGAS-GARCIA, M. C. et al. Microbial population dynamics and enzyme activities in composting processes with different starting materials. **Waste Management**, Oxford, v. 30, n. 5, p. 771–778, 2010.

VEDDER, P. J. C. **Cultivo moderno del champiñón**. Madri: Mundi-Prensa. 1996. 370 p.

VIEIRA, F. R. **Potencial de uso de gramíneas como substrato pasteurizado no cultivo do cogumelo *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm.** 2012. 115 f. Dissertação (Mestrado em

Agronomia/Energia na Agricultura) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2012.

VIEIRA, F. R. et al. Molecular characterization of *Pleurotus ostreatus* comercial strains by random amplified polymorphic DNA (RAPD). **African Journal of Agricultural Research**, Victoria Island, v. 8, n. 24, p. 3146-3150, 2013.

VIJAYALAKSHMI, K.; VIJAYALAKSHMI, M. Studies on cultural, physiological and antimicrobial activities of *Streptomyces rochei*. **Journal Applied Science Research**, Ma'an, v. 3, p. 2026-2029, 2007.

VIVAR-QUINTANA, A. M.; GONZÁLEZ-SAN J. M. L.; COLLADO-FERNÁNDEZ, M. Influence of canning process on colour, weight and grade of mushrooms. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 66, p. 87–92, 1999.

WANG, D.; SAKODA, A.; SUZUKI, M. Biological efficiency and nutritional value of *Pleurotus ostreatus* cultivated on spent beer grain. **Bioresource Technology**, Amsterdam, n. 78, p. 293-300, 2001.

WEBSTER, J.; WEBER, W. S. **Introduction to fungi**. Cambridge: Cambridge University Press, 2007. 817 p.

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

WHITMAN, W. B.; COLEMAN, D. C.; WIEBE, W. J. Prokaryotes: The unseen majority. **PNAS**, Washington, v. 95, p. 6578- 6583, 1998.

WOOD, D. A.; FERMOR, T. R. Nutrition of *Agaricus bisporus*. In: FLEGG, P. B.; SPENCER, D. M.; WOOD, D. A. **The Biology of the Cultivated Mushroom**. Chichester: John Wiley & Sons. 1985. Cap. 2, p. 43-66.

YAMANAKA, K. Commercial cultivation of *Lyophyllum shimeji*. **Mushroom News**, Washington, p. 2-6, fev., 2008. Disponível em: <http://www.thefreelibrary.com/Commercial+cultivation+of+Lyophyllum+shimeji.-a0194723672> Acesso em: 12 jul. 2014.

YANG, B. et al. Enzymatic hydrolysis of cellulosic biomass. **Biofuels**, Abingdon, v. 2, n. 4, p. 421-450, 2011.

ZANETTI, A. L.; RANAL, M. A. Suplementação da cana-de-açúcar com guandu no cultivo de *Pleurotus* sp. 'Florida'. **Pesquisas Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 9, p. 959-964, 1997.

ZHANG, R. H.; LI, X.; FADEL, J. G. Oyster Mushroom cultivation with rice and wheat straw. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 82, n. 3, p. 277-284, 2002.