

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

**PRODUTIVIDADE E EFICIÊNCIA BIOLÓGICA DE *Agaricus blazei*
(MURRILL) HEINEMANN, EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE
CULTIVO**

JOÃO KOPYTOWSKI FILHO

Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agronômicas da UNESP – Campus de
Botucatu, para obtenção do título de Doutor
em Agronomia – Área de Concentração em
Energia na Agricultura.

BOTUCATU – SP
Junho – 2006

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

**PRODUTIVIDADE E EFICIÊNCIA BIOLÓGICA DE *Agaricus blazei*
(MURRILL) HEINEMANN, EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE
CULTIVO**

JOÃO KOPYTOWSKI FILHO

Orientadora: Profa. Dra. Marli Teixeira de Almeida Minhoni

Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agronômicas da UNESP – Campus de
Botucatu, para obtenção do título de Doutor
em Agronomia – Área de Concentração em
Energia na Agricultura.

BOTUCATU – SP
Junho – 2006

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

K83p Kopytowski Filho, João, 1971-
Produtividade e eficiência biológica de *Agaricus blazei*
(Murrill) Heinemann, em diferentes condições de cultivo/
João Kopytowski Filho.- Botucatu : [s.n.], 2006.
xvi, 134 f. : il., color., gráfs, tabs.

Tese (Doutorado)-Universidade Estadual Paulista, Faculda-
de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2006
Orientador: Marli Teixeira de Almeida Minhoni
Inclui bibliografia

1. Cogumelos medicinais. 2. Cogumelos - Cultivo. 3. Ions
metálicos. 4. Microbiologia. 5. Resíduos agrícolas. I.
Minhoni, Marli Teixeira. II. Universidade Estadual Paulis-
lista "Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Fa-
culdade de Ciências Agrônômicas. III. Título.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS

CAMPUS DE BOTUCATU

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: "PRODUTIVIDADE E EFICIÊNCIA BIOLÓGICA DE *Agaricus blazei*
(MURRILL) HEINNEMANN, EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE
CULTIVO"

ALUNO: JOÃO KOPYTOSWKI FILHO

ORIENTADORA: PROFª DRª MARLI TEIXEIRA DE ALMEIDA MINHONI

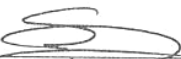
Aprovado pela Comissão Examinadora



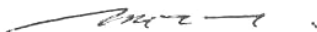
PROFª DRª MARLI TEIXEIRA DE ALMEIDA MINHONI



PROF. DR. FERNANDO BROETTO



PROF. DR. JOSÉ SOARES DO NASCIMENTO



DR. MARIO BARRETO FIGUEIREDO



DRª VERA LÚCIA RAMOS BONONI

Data da Realização: 05 de junho de 2006

Dedico

Aos meus pais

João e Inacita

AGRADECIMENTOS

À Professora Dra. Marli Teixeira de Almeida Minhoni, pela amizade, orientação, sugestões e paciência para a realização deste trabalho.

Ao Dr. Élvio Cardoso Queiroz, pela grande amizade e pelas importantes sugestões para este trabalho.

À Bióloga MSc. Meire Cristina Nogueira de Andrade pelo apoio durante os experimentos.

Aos funcionários do Módulo de Cogumelos, Márcio de Jesus Fogaça, Ivando Roberto Fogaça e José Antônio Fogaça, pela ajuda nas diversas fases desta pesquisa.

À técnica de laboratório, Maria de Fátima Almeida Silva, pelo auxílio na coletas de dados e análises de laboratório.

Ao CNPq pela bolsa de estudos e financiamento de parte desta pesquisa.

Ao Curso de Pós-Graduação em Energia na Agricultura, pela oportunidade de obtenção do título de Doutor e pelo apoio financeiro sempre constante para a realização deste trabalho, em especial aos Coordenadores Prof. Dr. Kleber Pereira Lanças e Prof. Dr. Zacarias Xavier de Barros.

Aos funcionários da Biblioteca da FCA, pelos importantes serviços prestados e informações repassadas para a elaboração desta Tese.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xiv
1. RESUMO.....	1
2. SUMMARY.....	3
3. INTRODUÇÃO.....	5
4. REVISÃO DE LITERATURA.....	7
4.1. Cogumelo <i>Agaricus blazei</i>	7
4.2. Composto e processo de compostagem	11
4.3. Fase III.....	14
4.4. Camada de cobertura.....	16
4.5. Tecnologia de cultivo.....	18
4.6. Certificação orgânica.....	20
4.7. Elementos metálicos e semi metálicos no cultivo de basidiomas.....	21
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	27
5.1. Experimento 1: Produção de <i>Agaricus blazei</i> em três tipos de compostos e seus efeitos na produtividade e nos teores de elementos metálicos nos compostos e basidiomas.....	27
5.1.1. Produção de matrizes.....	28
5.1.1.1. Isolamento.....	28
5.1.1.1.1. Coleta de basidiomas.....	28
5.1.1.1.2. Preparo do meio de cultura.....	29

5.1.1.1.3. Processo de isolamento.....	29
5.1.1.2. Matriz primária.....	30
5.1.1.3. Matriz secundária.....	31
5.1.1.4. Inóculo.....	33
5.1.2. Composto.....	34
5.1.2.1. Procedência dos ingredientes utilizados na formulação dos compostos.....	34
5.1.2.2. Determinação de carbono, nitrogênio e pH dos ingredientes.....	35
5.1.2.3. Teores de elementos metálicos dos ingredientes e água de abastecimento público utilizados no preparo dos compostos.....	36
5.1.2.4. Formulação dos compostos.....	38
5.1.3. Processo de compostagem.....	39
5.1.3.1. Pré-umedecimento.....	40
5.1.3.2. Fase I (Fase de pátio).....	40
5.1.3.3. Fase II (Pasteurização e Condicionamento).....	42
5.1.4. Fase III (Colonização do composto).....	47
5.1.4.1. Inoculação.....	47
5.1.4.2. Incubação.....	49
5.1.5. Camada de cobertura.....	49
5.1.5.1. Materiais utilizados na composição da camada de cobertura.....	49

5.1.5.2. Teores de Cd, Cr, Hg, Pb e Ni, nos materiais utilizados na camada de cobertura.....	52
5.1.5.3. Preparo da camada de cobertura.....	52
5.1.5.3.1. Adição de calcário.....	52
5.1.5.3.2. Desinfestação.....	53
5.1.5.4. Cobertura dos compostos.....	54
5.1.5.5. Colonização da camada de cobertura.....	54
5.1.6. Indução de primórdios e colheita de basidiomas.....	55
5.1.6.1. Indução de primórdios.....	55
5.1.6.2. Colheita.....	57
5.1.7. Processamento de basidiomas.....	57
5.1.7.1. Desidratação dos basidiomas.....	59
5.1.7.2. Moagem dos basidiomas.....	59
5.1.8. Parâmetros avaliados.....	60
5.1.8.1. Umidade do composto.....	60
5.1.8.2. Massa fresca total de composto.....	60
5.1.8.2.1. No início da Fase I.....	60
5.1.8.2.2. Ao final das Fases I, II e III.....	61
5.1.8.3. Densidade aparente do composto ao final da Fase I.....	62
5.1.8.4. Teores de Cd, Cr, Hg, Pb e Ni.....	62
5.1.8.5. Fator de acumulação.....	63
5.1.8.6. Massa média dos basidiomas.....	63
5.1.8.7. Produtividade.....	64

5.1.8.8. Eficiência biológica.....	64
5.1.8.9. Delineamento experimental.....	65
5.2. Experimento 2: Efeito da suplementação nitrogenada (farelo de soja e Champ Food®) e época de adição (inoculação e pós colonização) na produtividade de <i>Agaricus blazei</i>	66
5.2.1. <i>Agaricus blazei</i>	66
5.2.2. Composto.....	66
5.2.2.1. Formulação do composto.....	66
5.2.2.2. Processo de compostagem.....	67
5.2.2.2.1. Pré -umedecimento e compostagem Fase I.....	67
5.2.2.2.2. Compostagem Fase II.....	68
5.2.3. Fase III.....	68
5.2.4. Camada de cobertura.....	70
5.2.5. Indução de primórdios.....	70
5.2.6. Parâmetros avaliados.....	71
5.3. Experimento 3: Produtividade e teores de elementos metálicos nos basidiomas de <i>Agaricus blazei</i> cultivado em três tipos de compostos e em dois ambientes diferentes.....	72
5.3.1. <i>Agaricus blazei</i>	73
5.3.2. Composto.....	73
5.3.2.1. Processo de Compostagem.....	73
5.3.2.1.1. Fase I.....	73
5.3.2.1.2. Fase II (Pasteurização e Condicionamento).....	74

5.3.3. Fase III.....	74
5.3.4. Camada de cobertura.....	75
5.3.5. Indução de primórdios.....	75
5.3.5.1. Câmara climatizada Dalsem Mushrooms.....	75
5.3.5.2. Ambiente parcialmente controlado (Estufa modelo comercial).....	77
5.3.6. Colheita e processamento dos basidiomas.....	78
5.3.7. Teores de elementos metálicos dos ingredientes do composto e da camada de cobertura.....	78
5.3.8. Parâmetros avaliados.....	80
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	81
6.1. Experimento 1.....	81
6.1.1. Umidade e densidade do composto.....	84
6.1.2. Teores de Carbono, Nitrogênio, relação C/N e pH.....	89
6.1.3. Teores de elementos metálicos.....	92
6.1.3.1. Composto.....	92
6.1.3.2. Basidiomas.....	93
6.1.3.2.1. Teores de elementos metálicos no estípete no primeiro fluxo de colheita.....	94
6.1.3.2.2. Teores de elementos metálicos no píleo no primeiro fluxo de colheita.....	95
6.1.3.2.3. Teores de elementos metálicos no estípete no segundo fluxo de colheita.....	97

6.1.3.2.4. Teores de elementos metálicos no píleo no segundo fluxo de colheita.....	98
6.1.4. Fator de acumulação (FA).....	101
6.1.5. Produtividade.....	104
6.1.6. Eficiência biológica.....	108
6.1.7. Massa média de basidiomas.....	109
6.2. Experimento 2.....	111
6.2.1. Produtividade.....	111
6.2.2. Massa média de basidiomas.....	113
6.3. Experimento 3.....	119
6.3.1. Produtividade e Eficiência biológica.....	119
6.3.2. Teores de elementos metálicos e As.....	121
7. CONCLUSÕES.....	127
8. REFERÊNCIAS.....	128

LISTA DE TABELAS

Tabela	Página
1. Elementos traços e suas funções no metabolismo dos fungos.....	22
2. Classificação de qualidade de compostos agrícolas e limites máximos para os teores de alguns elementos químicos.....	23
3. Teores máximos de elementos metálicos no composto e solo para cultivo de plantas.....	24
4. Dose máxima permitida de Cd em fertilizantes agrícolas em função da CTC do solo.....	26
5. Processamento de preparo de grãos para a produção de inóculo de <i>Agaricus blazei</i> e rendimento destes.....	32
6. Teores médios de carbono (C), nitrogênio (N) e relação C/N de ingredientes utilizados na formulação dos compostos (Média de três repetições).....	36
7. Comprimentos de onda e limite mínimo de detecção de alguns elementos químicos no Spectrômetro de Plasma (ICP).....	37
8. Teores de Cd, Cr, Hg, Pb e Ni dos ingredientes e da água de abastecimento público utilizados no preparo dos compostos T1, T2 e T3 (média de três repetições).....	38
9. Formulação dos compostos T1, T2 e T3.....	39
10. Quantidade de ingredientes adicionados aos tratamentos na montagem da leira.....	40
11 Resultados de análise do solo utilizado na camada de cobertura (Média de duas repetições).....	51
12. Resultados de análise do calcário utilizado na camada de cobertura.....	51
13. Teores de Cd, Cr, Hg, Pb e Ni nos materiais utilizados na camada de cobertura (Média de três repetições).....	52
14. Formulação do composto.....	67
15. Descrição dos tratamentos.....	68
16. Formulação dos compostos T1, T2 e T3.....	74

17. Teores de Zn, Cu e As nos ingredientes dos compostos T1, T2 e T3, água de abastecimento público e nos materiais da camada de cobertura (Média de três repetições).....	79
18. Umidade dos compostos ao final das Fases I e II de compostagem (Média de três repetições).....	81
19. Densidade dos compostos ao final de Fase I de compostagem (média de 63 repetições).....	86
20. Teores de carbono, nitrogênio e pH dos compostos ao final das Fases I e II de compostagem (Média de três repetições).....	89
21. Perda de massa (kg) e porcentagem (%) de carbono, nos compostos T1, T2 e T3, no período entre o final da Fase I e o final da Fase II.....	90
22. Teores de Cd, Cr, Hg, Pb e Ni nos compostos T1, T2 e T3, ao final da Fase II (Média de três repetições).....	92
23. Teores de Cd no estípite de basidiomas de <i>Agaricus blazei</i> no 1º fluxo de colheita, em função de duas linhagens (ABL99/30 e ABL 04/49) e três tipos de composto (T1, T2 e T3) (Média de três repetições).....	94
24. Teores de Cd no píleo de basidiomas de <i>Agaricus blazei</i> no 1º fluxo de colheita, em função de duas linhagens (ABL99/30 e ABL 04/49) e três tipos de composto (T1, T2 e T3) (Média de três repetições).....	96
25. Teores de Hg no píleo de basidiomas de <i>Agaricus blazei</i> (ABL99/30), em três tipos de compostos (T1, T2 e T3) (Média de três repetições).....	96
26. Teores de Cd no estípite de <i>Agaricus blazei</i> no 2º fluxo de colheita, em função de duas linhagens (ABL99/30 e ABL 04/49) e três tipos de composto (T1, T2 e T3) (Média de três repetições).....	97
27. Teores de Hg no píleo de <i>Agaricus blazei</i> no 2º fluxo de colheita, em função de duas linhagens de A. blazei (ABL99/30 e ABL 04/49) e três tipos de composto (T1, T2 e T3).....	99
28. Teores de Hg no píleo de <i>Agaricus blazei</i> no 2º fluxo de colheita, em função de duas linhagens (ABL99/30 e ABL 04/49) e três tipos de compostos (T1, T2 e T3). (Média de três repetições).....	100

29. Teores de Pb no píleo de basidiomas de <i>Agaricus blazei</i> (ABL99/30) no 2º fluxo, em três tipos de compostos (T1, T2 e T3). (Média de três repetições).....	101
30. Fator de acumulação (FA) de Cd em basidiomas de <i>Agaricus blazei</i> , em função duas linhagens (ABL99/30 e ABL 04/49), três tipos de composto (T1, T2 e T3) e parte do basidioma (píleo e estípete).....	102
31. Fator de acumulação (FA) de Cr em basidiomas de <i>Agaricus blazei</i> , em função de duas linhagens (ABL99/30 e ABL 04/49), três tipos de composto (T1, T2 e T3) e parte do basidioma (píleo e estípete).....	102
32. Fator de acumulação (FA) de Pb em basidiomas de <i>Agaricus blazei</i> , em função de duas linhagens (ABL99/30 e ABL 04/49), três tipos de composto (T1, T2 e T3) e parte do basidioma (píleo e estípete) (Média de três repetições).....	103
33. Fator de acumulação (FA) de Hg em basidiomas de <i>Agaricus blazei</i> , em função de duas linhagens (ABL99/30 e ABL 04/49), três tipos de composto (T1, T2 e T3) e parte do basidioma (píleo e estípete).....	103
34. Produtividade de basidiomas em função dos tipos de compostos e linhagens de <i>Agaricus blazei</i> , aos 100 dias de cultivo.....	104
35. Eficiência biológica de basidiomas em função dos tipos de compostos e linhagens de <i>Agaricus blazei</i> , aos 100 dias de cultivo.....	118
36. Produtividade (P, %) e Eficiência biológica (EB, %) de três compostos (T1, T2 e T3) em dois ambientes de cultivo (câmara climatizada e estufa comercial) da linhagem ABL 99/30 de <i>Agaricus blazei</i>	119
37. Teores médios de As, Cd, Cr, Cu, Hg, Pb, Zn e Ni, em basidiomas de <i>Agaricus blazei</i> (linhagem ABL99/30), em três tipos de composto (T1, T2 e T3) (média de três repetições).....	121
38. Teores de As, Cd, Cr e Cu em basidiomas de <i>Agaricus blazei</i> (ABL99/30), em três tipos de composto (T1, T2 e T3).....	124
39. Teores de Hg, Pb, Zn e Ni, em basidiomas de <i>A. blazei</i> (linhagem ABL99/30), em três tipos de composto (T1, T2 e T3).....	127

40. Fator de acumulação (FA) As, Cd, Cr, Cu Hg, Pb, Zn, Ni Ca, Na, Mg, Mn em basidiomas de <i>A. blazei</i> (linhagem ABL 99/30).....	128
--	-----

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura</i>	<i>Página</i>
1. Basidiomas da linhagem ABL 99/30 de <i>Agaricus blazei</i>	28
2. Basidiomas da linhagem ABL 04/49 de <i>Agaricus blazei</i>	28
3. Betoneira com grãos de triticales, adicionados de calcário e gesso.....	32
4. Frascos de matriz terciária de <i>Agaricus blazei</i> à base de grãos de triticales, com 12 dias de incubação.....	32
5. Sacos plásticos com grãos preparados para autoclavagem.....	34
6. Inóculo de <i>Agaricus blazei</i> à base de triticales com 10 dias de incubação.....	34
7. Montagem de leira de composto.....	41
8. Primeira revirada de composto.....	41
9. Acondicionamento de composto para Pasteurização e Condicionamento.....	41
10. Esquema do processo de Pré-umedecimento das palhas e compostagem Fase I.....	43
11. Vista interna de câmara climatizada Dalsem Mushrooms.....	44
12. Disposição de caixas treliçadas com composto em câmara climatizada (final da Fase II).....	44
13. Painel de controle de dados durante o Condicionamento (a. temperatura média dos compostos).....	44
14. Disposição de sensor de temperatura em composto durante a Fase II.....	44
15. Gráfico de temperatura dos compostos durante a pasteurização, tratamentos T1, T2 e T3.....	45
16. Esquema da compostagem Fase II (Pasteurização e Condicionamento).....	46
17. Inóculo de <i>Agaricus blazei</i> (ABL 04/49).....	47
18. Bandeja plástica com inóculo de <i>Agaricus blazei</i> (linhagem ABL 04/49), preparada para a inoculação do composto.....	47

19.Deposição de filme plástico para acondicionamento de composto para a colonização.....	48
20.Composto inoculado com <i>Agaricus blazei</i>	48
21.Dobramento de filme plástico com composto inoculado.....	49
22.Caixa treliçada com composto inoculado, preparada para a inoculação.....	49
23.Esquema dos procedimentos da Fase III (Colonização do composto).....	50
24.Camada de cobertura.....	55
25.Camada de cobertura a ser adicionada sobre o composto.....	55
26.Entrada das estruturas de ferro com caixas de composto na câmara de incubação.....	55
27.Camada de cobertura ao final da fase de colonização.....	55
28.Esquema da colonização da camada de cobertura pelo micélio de <i>Agaricus blazei</i>	56
29.Esquema dos procedimentos da primeira indução e colheita.....	58
30.Basidiomas de <i>Agaricus blazei</i> em desenvolvimento.....	59
31.Basidiomas de <i>Agaricus blazei</i> colhidos.....	59
32.Esquema dos procedimentos da compostagem da Fase I.....	69
33.Esquema do processo de “Indução lenta” e colheita de <i>Agaricus blazei</i> , em câmara climatizada Dalsem.....	71
34.Foto de câmara climatizada Dalsem Mushrooms.....	76
35.Esquema do manejo da temperatura durante o processo de “Indução rápida” e colheita de <i>Agaricus blazei</i> , em câmara climatizada Dalsem Mushrooms.....	76
36. Estufa de cultivo modelo comercial.....	80
37.Umididade dos compostos ao final das Fases I e II da compostagem e ao final da Fase III, inoculado com a linhagem ABL 99/30 de <i>Agaricus blazei</i>	84
38.Umididade dos compostos ao final das Fases I e II da compostagem e ao final da Fase III, inoculado com a linhagem ABL 04/49 de <i>Agaricus blazei</i>	84
39.Massa fresca dos compostos T1, T2 e T3, na montagem da leira, início e final da Fase I e, ao final das Fases II e III.....	88
40.Massa seca dos compostos T1, T2 e T3, na montagem da leira, no início da Fase I e, ao final das Fases I, II e III.....	88

41. Produção diária de massa fresca de basidiomas da linhagem ABL 99/30 de <i>Agaricus blazei</i> em três compostos (T1, T2 e T3), no período de 100 dias, em câmara climatizada.....	106
42. Produção diária de massa fresca de basidiomas da linhagem ABL 04/49 de <i>Agaricus blazei</i> em três compostos (T1, T2 e T3), no período de 100 dias, em câmara climatizada.....	107
43. Massa média de basidiomas (g), em função da linhagem, composto e fluxo colheita.	110
44. Produtividade de <i>Agaricus blazei</i> em função do tipo (farelo de soja e Champ food®) e época da adição de suplemento ao composto (inoculação e pós-colonização).....	111
45. Produção diária de basidiomas frescos da linhagem ABL 04/44 de <i>Agaricus blazei</i> com três tratamentos (CI, composto sem suplementação, FSI e CFI, farelo de soja e Champ Food na inoculação, respectivamente), no período de 100 dias de cultivo.....	115
46. Produção diária de basidiomas frescos da linhagem ABL 04/44 de <i>Agaricus blazei</i> , com três tratamentos (CCO, composto fragmentado sem suplementação, FSC e CFC, farelo de soja e Champ Food na pós colonização, respectivamente), no período de 100 dias de cultivo.....	116
47. Massa média de basidiomas (g) em função do tipo de suplemento adicionado ao composto na inoculação e o fluxo de colheita no cultivo de <i>Agaricus blazei</i>	117
48. Massa média de basidiomas (g) em função do tipo de suplemento adicionado ao composto na inoculação e o fluxo de colheita no cultivo de <i>Agaricus blazei</i>	118
49. Produção de basidiomas frescos em três compostos (T1, T2 e T3), no período de cultivo de 177 dias, em ambiente parcialmente controlado (Estufa modelo comercial).....	122
50. Produção de basidiomas frescos em três compostos (T1, T2 e T3), no período de cultivo de 177 dias, em ambiente totalmente controlado (Estufa climatizada Dalsem).....	123

1. RESUMO

A. blazei tem sido comercializado como um produto “natural”, sem aplicação de agrotóxicos e livre de resíduos tóxicos. De outro modo, elevados teores de elementos metálicos com potencial tóxico tem sido detectados em basidiomas. Outrossim, além da possibilidade de causarem danos á saúde, acarretam grandes prejuízos na comercialização. Avaliou-se o efeito de três tipos de compostos (orgânico, e semi-sintético and sintético) sobre a produtividade e teores de elementos metálicos em basidiomas de *A. blazei*. O Experimento 1 conduzido em câmara climatizada, constou de seis tratamentos (15 repetições), dispostos inteiramente ao acaso, em esquema fatorial 3x2, (três tipos de composto e duas linhagens de *A. blazei*). Avaliou-se a produtividade, a eficiência biológica, o massa média de basidiomas, os teores de Cd, Cr, Hg, Pb e Ni nos compostos e basidiomas e, o fator de acumulação no píleo e no estípete, em dois fluxos de colheita. Durante o processo de compostagem e de colonização, determinou-se o massa fresca e seca, teor de carbono, nitrogênio, pH densidade e umidade dos compostos. Constatou-se que os teores de elementos metálicos nos basidiomas não são proporcionais aos teores dos mesmos nos compostos cultivados, ocorre uma maior concentração destes no píleo em relação ao estípete e há variação em função do fluxo de colheita, a densidade e a umidade dos compostos ao final das Fases II e III, foram maiores nos compostos sintético e semi-sintético e as maiores produtividades de 7,24 e 7,09% para as linhagens ABL 99/30 e ABL 04/49, respectivamente, foram alcançadas quando cultivadas no composto orgânico certificado. Para o Experimento 2,

foram avaliados a produtividade e a massa média de basidiomas da linhagem ABL 04/44, cultivada em composto sintético adicionado ou não de dois tipos de suplemento (farelo de soja e Champ food[®]), em duas fases de cultivo (inoculação do composto e pós-colonização). Houve uma tendência de maior produtividade nos compostos suplementados na inoculação e, em geral uma alternância de elevação e redução das massas médias de basidiomas a cada fluxo de colheita. O Experimento 3, avaliou-se os teores de elementos metálicos (Cd, Cr, Cu, Hg, Pb, Zn e Ni) e Arsênio (As) nos basidiomas da linhagem ABL 99/30 de *A. blazei*, a produtividade e a eficiência biológica em função de três tipos de composto, em dois ambientes de cultivo. Houve uma tendência de produtividade e eficiência biológica mais elevadas quando a linhagem foi cultivada em composto orgânico, em ambiente climatizado. Não se observou proporcionalidade entre os teores de elementos metálicos nos compostos e nos basidiomas. Nos basidiomas, o Pb apresentou o maior fator de acumulação e não detectou-se teores de As, Cr e Ni.

PRODUCTIVITY AND BIOLOGICAL EFFICIENCY OF *Agaricus blazei* (MURRILL)

HEINEMANN IN DIFFERENT TYPES OF CULTIVATIONS. Botucatu, 2006. 144f.

Tese (Doutorado em Agronomia - Energia na Agricultura) - Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista.

Author: JOAO KOPYTOWSKI FILHO

Advisor: MARLI TEIXEIRA DE ALMEIDA MINHONI

A. blazei has been commercialized as a “natural” product, without use of pesticides and free from toxic waste. However, high contents of potentially toxic metallic elements in the basidiomata have usually been detected. Besides the health hazard, they may cause great loss for commercialization. The effect of three different types of compost was evaluated (organic, semi-synthetic and synthetic) on the productivity and metallic elements contents in basidiomatas of *A. blazei*. The Experiment 1 was carried out in a climatized room, with six treatments (15 repetitions), arranged in a factorial scheme 3x2, (three different types of compost and two strains of *A. blazei*). Productivity, biological efficiency, mean weight of basidiomatas, Cd, Cr, Hg, Pb and Ni contents in the compost and basidiomata and the accumulation factor in the pilei and stalk, in two flushes were evaluated. During composting and colonization, fresh and dry weight, carbon and nitrogen contents, pH, density and moisture of the compost were evaluated. No direct relationship between the metallic elements contents in the mushroom and in the compost was found. The concentration of metallic elements was greater in the pileus than in the stalk, varying during the flushes. Density and moisture of the compost Phase II and III, were greater in the synthetic and semi-synthetic composts. The greatest productivities, 7.24 and 7.09% for the strains ABL 99/30 and ABL 04/49, respectively, were reached when cultivated in organic compost. For the Experiment 2, productivity and mean weight of the basidiomatas of the strain ABL 04/44, cultivated in synthetic compost added or not with two different types of supplement (soybean meal and Champ food®), in two cultivation phases (at spawning and before casing) were evaluated. There was a tendency for greater productivity on the supplemented compost at spawning and, in general, a reduction of the mean weight of the basidiomatas in each flush. In Experiment 3, metallic elements contents (Cd, Cr, Cu, Hg, Pb, Zn e Ni) and Arsenic (As) in the basidiomata

of the strain ABL 99/30 of *A. blazei*, the productivity and the biological efficiency of the three composts, in two types cultivation room were assessed. There was a tendency for higher productivity and biological efficiency when the strain was cultivated in organic compost, in a climatized room. A correlation between the metallic elements content in the compost and in the basidiomata could be seen. In the basidiomata, Pb presented the highest accumulation factor and it contents of As, Cr and Ni were not detected.

Keywords: *Agaricus blazei*, mushroom, metallic elements, composting, organic production.

3. INTRODUÇÃO

O cogumelo *A. blazei* comumente é cultivado utilizando-se técnicas do *A. bisporus*. Neste sentido, fatores importantes e específicos tem sido feito para viabilizar a atividade economicamente. Porém, ainda há pouco conhecimento sobre as técnicas de indução de primórdios e o preparo de composto para cultivo de *A. blazei*.

Os teores de elementos metálicos em cogumelos cultivados, comumente apresentam teores mais reduzidos de elementos metálicos do que os cogumelos silvestres. Ademais, esses teores de elementos, para ambos os tipos de cogumelos, variam com a espécie, com a fração analisada (píleo ou estípete), a época da colheita, o tipo de substrato e o local de crescimento.

A forma de processamento, como por exemplo a limpeza em água e o cozimento dos cogumelos, também podem influenciar os teores de elementos metálicos nos basidiomas.

Dentro dos diversos padrões de comercialização de cogumelos, o produto “orgânico” é um dos mais valorizados e discutidos, porém, com ausência e/ou indefinição de parâmetros para a caracterização e a qualificação de compostos e de basidiomas.

A busca crescente por produtos alimentícios de maior qualidade é um fato na sociedade atual. Ademais, os cogumelos destacam-se ainda mais pelo seu valor nutracêutico.

Deste modo, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a produtividade e eficiência biológica de diversos compostos e a qualidade de basidiomas em relação aos teores de elementos metálicos, potencialmente tóxicos, produzidos nos mesmos, sejam aqueles oriundos de cultivo convencional, ou oriundos de cultivos ditos orgânicos, ou seja, com ingredientes orgânicos certificados em sua formulação.

4. REVISÃO DE LITERATURA

Os cogumelos são macrofungos formadores de um “corpo de frutificação”, epígeo ou hipógeo, podendo ser um ascomicota ou basidiomicota, serem visualizados a olho nú e que possam ser coletados com as mãos (MILES; CHANG, 1997)

São seres heterótrofos, desprovidos de clorofila e consequentemente, sem a capacidade fotossintética. Desta forma, necessitam de um substrato para o fornecimento de nutrientes e energia (CHO, 2004).

Os gregos acreditavam que os cogumelos vinham por meio de raios enviados pelo Deus Zeus, devido ao surgimento inexplicável nos campos, em seguida das chuvas. Na antiguidade, os cogumelos alucinógenos eram considerados “cogumelos dos deuses”, por seus supostos poderes sobrenaturais (LINCOFF, 1981).

4.1. Cogumelo *Agaricus blazei*

A. blazei é de ocorrência natural no Brasil (IWADE; MIZUNO, 1997; BRAGA et al., 1998). Segundo Braga et al. (1998) e Zhanxi e Zhanhua (2001), na década de 60/70, algumas amostras de basidiomas coletados na região de Piedade/SP foram levados para o Japão para o estudo de supostas propriedades medicinais. Mais tarde, algumas matrizes foram enviadas novamente ao Brasil para serem cultivadas.

Na China, o cultivo comercial iniciou-se na Província de Fujian no ano de 1994, em composto tradicional para o cultivo de *Agaricus* sp. Um ano mais tarde, iniciou-se o cultivo em substrato produzido à base de palhas de gramíneas, denominado “Juncao” Zhanxi e Zhanhua (2001). Segundo Amazonas (2004), é possível que grande parte das linhagens cultivadas atualmente em diversos países no mundo tenham origem de isolados coletados na região de Piedade.

O nome científico *A. blazei* foi apresentado por Murrill em 1945, no estado da Flórida, nos Estados Unidos (MURRILL, 1945). Mais tarde, incluiu-se no sensu de Heinemann e passou-se a denominar *A. blazei* (Murrill) Heinemann.

O basidioma de *A. blazei* possui píleo de coloração marrom, levemente escamado, semi-esférico, com 6 a 12 cm de diâmetro e aproximadamente 11 mm de espessura. Possui lamelas de 8-10 mm de largura, inicialmente brancas, tornando-se amarelo-rosa e, na maturidade, apresentam-se com coloração marrom. O estípite possui comprimento de 4 a 14 cm e espessura de 1 a 3 cm (ZHANXI; ZHANHUA, 2001).

Nos últimos 5 anos, o nome científico bem como a procedência da espécie têm sido sujeitos à controvérsias e diversos autores citam a mesma espécie com diversas denominações: *A. brasilienses* (NASCIMENTO; EIRA, 2003) *A. blazei* (OEI, 2003; KOPYTOWSKI FILHO; MINHONI, 2004) e *A. subrufescens* (MAZIERO, 2005).

Wasser et al. (2002), em estudo morfológico comparativo, concluiu que a espécie *A. blazei* ss. Heinemann coletado no Brasil e o *A. blazei* ss. Murrill identificado nos Estados Unidos são espécies diferentes e, desta forma, propuseram um novo nome para a espécie originária do Brasil, definindo-a como *A. brasiliensis*. Kerrigan (2005) propôs que as linhagens provenientes do Brasil são biologicamente e filogeneticamente semelhantes ao *Agaricus subrufescens*, espécie descrita por Peck em 1893 e produzida comercialmente nos Estados Unidos no final do século XIX e início do século XX. Ainda segundo Kerrigan (2004)¹, o *A. subrufescens* ocorre naturalmente nos estados do Havaí e Califórnia, nos Estados Unidos.

¹ Kerrigan, R. W. (Sylvan Research-Kittaning, Pennsylvania, Estados Unidos). Comunicação pessoal.

Ainda assim, *A. blazei* é o nome mais utilizado pela maioria das empresas de comercialização, cultivadores e a comunidade científica. No Brasil, é conhecido popularmente como “Cogumelo Piedade”, “Cogumelo de Deus”, “Cogumelo Princesa” ou simplesmente “Blazei”. No Japão, é conhecido como “Kawariharatake” e “Himematsutake”, nos Estados Unidos como “Almond Portobello” (MINHONI et al., 2005; KOPYTOWSKI FILHO et al., 2006) e em alguns países é conhecido como “Cogumelo Brasileiro”.

Diversos cultivadores de *A. bisporus*, visando o aumento da rentabilidade nas suas estruturas de cultivo e atraídos por um produto quase exclusivo para exportação iniciaram o cultivo de *A. blazei* na década de 90 (NASCIMENTO, 2003). À partir do ano 2000, o *A. blazei* tornou-se mais conhecido em diversas regiões com tradição no cultivo de agaricáceos e, desta forma, alguns países da comunidade europeia e os Estados Unidos também iniciaram o seu cultivo.

Não existem dados oficiais sobre a produção de cogumelos no Brasil e, em relação à produção de *A. Blazei*, uma estimativa de sua produção é mais complexa ainda, em função da informalidade da comercialização e da instabilidade sua de produção (produtividade e época de cultivo) por grande parte dos cultivadores.

Deste modo, Braga et al. (1998) relatam que a produção anual de *A. blazei* no período de 1996-97 foi estimada em 20 toneladas de basidiomas desidratados. Mendonça et al. (2005) apresentaram dados de exportação, no ano de 2001, próximos a 35 toneladas, enquanto que Minhoni et al. (2005) estimaram a produção brasileira no ano de 2003-2004 em 120 toneladas.

À partir de 2003, em função da concorrência do produto chinês exportado para o Japão, do aumento da produção em outros países, do valor reduzido do dólar em relação ao real, aliado a problemas de importação pelo mercado japonês em função da indentificação de resíduos considerados cancerígenos em basidiomas desidratados, o mercado de *A. blazei* entrou em “crise”. Ocorreu redução na compra do produto brasileiro, redução do preço para os produtores e como consequência, a redução do número de cultivadores propriamente ditos.

Através de dados parciais coletados em levantamento nos anos de 2005-2006, sobre o perfil do produtor de *A. blazei* no Estado de São Paulo², estima-se que aproximadamente 20% dos produtores estão na atividade, mas com apenas 10% aproximadamente de sua capacidade de produção.

A. blazei no Brasil é comercializado comumente na forma desidratada (em pedaços ou pó) e, na maioria das vezes, é consumido na forma de chá, cápsulas e pílulas. No Japão, por sua vez, além da forma desidratada, tem-se também a comercialização de basidiomas frescos (IWADE; MIZUNO, 1997). Têm sido consumido tradicionalmente como um complemento alimentar ou por possuir propriedades terapêuticas. Deste modo, diversas pesquisas têm sido conduzidas para se avaliar as propriedades antimutagênicas, anticarcinogênicas e antitumorais (KAWAGISHI et al., 1989; MIZUNO et al., 1998; DENADAI et al., 2001; MENOLI et al., 2001).

Além da sua utilização como suplemento alimentar ou até com fins medicinais, o *A. blazei* tem atraído consumidores devido ao seu aroma persistente, textura e o sabor bastante diferenciado das outras espécies de cogumelos (KOPYTOWSKI FILHO et al., 2006).

Algumas alternativas de adição do *A. blazei* em diferentes tipos de alimentos têm sido testadas. Biscoitos doces e conservas de *A. blazei* foram apresentados em Feira de Alimentação no Estado do Paraná (SIQUEIRA, 2004). Neste mesmo sentido, Kopytowski e Escouto (2003)³, no desenvolvimento de produtos panificáveis com a adição de farinha mista de *A. blazei*, avaliaram a aceitabilidade de biscoitos semi-amanteigados e obtiveram resultados bons ou ótimos para o produto, segundo mais de 80% dos participantes.

Para o cultivo deste cogumelo no Brasil, adotou-se, em grande parte, as técnicas utilizadas para o cultivo de *A. bisporus*, em função da similaridade destas, aliado à falta de conhecimentos específicos para a produção de composto e condução das outras fases de cultivo do *A. blazei* propriamente dito. Este comportamento também é verdadeiro em outros países, onde as técnicas de cultivo de *A. blazei* são consideradas as mesmas utilizadas

² Dados não publicados. Projeto de Extensão Rural e Pesquisa CNPq/Módulo de Cogumelos: O Cultivo do Cogumelo *Agaricus blazei* na agricultura familiar e a conseqüente melhoria das condições sócio-econômicas”.

³ Dados não publicados. Teste de aceitabilidade, Taquaritinga/SP.

para o *A. bisporus*, desde o preparo do meio de cultura para as matrizes, temperatura de colonização de composto e camada de cobertura, dentre outros (OEI, 2003; UNICORN 2006).

Desta forma, de modo semelhante ao cultivo de *A. bisporus*, considera-se os estágios de cultivo do *A. blazei* como: compostagem Fase I e II de compostagem, Fase de “pátio” e fase de túnel (Pasteurização e Condicionamento), respectivamente e, Fase III (inoculação e colonização do composto), cobertura do composto, indução, formação de primórdios e colheita.

4.2. Composto e processo de compostagem

Os ingredientes utilizados na formulação de compostos incluem camas de animais (equinos e aves), fibras ligno-celulósicas (palhas de cereais e/ou capins, bagaço de cana-de-açúcar e outros), fontes nitrogenadas (orgânicas e/ou minerais), calcário e gesso.

A formulação de compostos para produção de *A. blazei* tem sido pouco pesquisada e, na maioria das vezes, os produtores têm obtido produtividades baixas. Kopytowski Filho (2002) avaliou proporções de ingredientes nitrogenados e a relação C/N inicial de compostos sintéticos sobre a produtividade de *A. blazei*. O autor obteve produtividades maiores com o nitrogênio proveniente de ingrediente misto de farelo de soja/uréia, na proporção de 1,5/1, e C/N inicial do composto entre 27 a 37/1. Com os dados obtidos neste experimento, inferiu-se em maior economia do *A. blazei* em relação ao *A. bisporus*, o qual é comumente cultivado em compostos com C/N mais estreita, ou seja, de 17 a 20/1 (BONONI et al., 1995; EIRA; MINHONI, 1997; MENDONÇA et al., 2005).

Deste modo, as formulações de composto com relação C/N mais elevadas, tende-se à reduzir erros de teores elevados de amônia no composto ao final da Fase II. Segundo Griensven (1988), a relação C/N inicial do composto está intimamente associada aos níveis de amônia durante a compostagem e, neste sentido, é fundamental que esta não ultrapasse teores de 5-10 mg kg⁻¹ de composto, ao final da Fase II, pois, acima destes, torna-se tóxica ao cogumelo.

O método de compostagem usualmente utilizado para o *A. bisporus* e para o *A. blazei* é o método de compostagem curta, desenvolvido por Sinden e Hauser na década de 50 (GERRITS, 1988; LABORDE et al., 1993) e que compreende o pré-

umedecimento das palhas e a compostagem propriamente dito, a qual possui duas fases (I e II).

O pré-umedecimento das palhas tem a função de facilitar a absorção de água, por meio da quebra mecânica das palhas, principalmente as de textura rígida e a redução da cerosidade destas. Deste modo, reduzem-se os riscos dos ingredientes do composto apresentarem-se em diferentes graus de degradação durante as Fases I e II, o que poderia resultar no fato de muitos destes não serem aproveitados pela comunidade microbiana e pelo cogumelo propriamente dito.

A Fase I consiste na montagem das leiras com dimensões de 1,8-2,0 m de altura e 1,8-2,0 m de largura, e reviradas destas a cada 2 a 3 dias. Durante as reviradas, tem-se como objetivos: homogeneizar, oxigenar, suplementar, umedecer e diminuir a cerosidade de alguns ingredientes (VEDDER, 1996), possibilitando a produção de um substrato seletivo para o *Agaricus*, tanto sob aspectos microbiológicos quanto químicos (GRIENSVEN, 1988).

Nesta Fase I, com duração de 6 a 16 dias, o controle da temperatura e da umidade do composto é parcial. A temperatura pode variar de 35°C a 80°C e a umidade pode atingir níveis superiores a 75%, dependendo da estrutura dos materiais utilizados (WUEST, 1982; BONONI et al., 1995; OEI, 2003; SHARMA et al., 2004). No início desta fase, o pH é elevado, podendo atingir valores acima de 8,5, tendendo ao final desta, reduzir-se para 6,5 – 7,5.

A quantidade de água a ser adicionada ao composto pode ser calculada em função da quantidade de substrato e estado de decomposição dos ingredientes. Quando os ingredientes se apresentam em diferentes graus de decomposição, esta prática torna-se imprecisa e susceptível a erros (STRAATSMA, 2004). Neste sentido, o pré-umedecimento das palhas torna-se um processo imprescindível à padronização do processo de compostagem e consequentemente, da qualidade do composto.

A Fase I é considerada completa quando os substratos lignocelulósicos perderem a rigidez e possuírem capacidade elevada de retenção de água. Neste momento, o odor de amônia tornar-se quase imperceptível e a coloração do composto, é marrom escura (WUEST, 1982).

A Fase II compreende os estágios de pasteurização (60-62°C por 6-8 horas ou 56-60°C por 8 a 10 horas) e de condicionamento do composto (45 a 50°C por 6 a 11

dias, com aeração de 50 a 200 m³ h⁻¹ ton⁻¹ de composto) em instalações fechadas, genericamente chamadas de “túneis” (FERMOR et al., 1985; MILLER et al., 1990; DAHR, 1994; STRAATSMA et al., 2000; KOPYTOWSKI FILHO, 2002)

Na Fase II, pode-se corrigir alguns erros advindos da Fase I, tais como de formulação e/ou de manejo do processo de compostagem. Estas falhas são muito comuns devido à falta de dados sobre a composição adequada de compostos e/ou de cálculos de concentração de nitrogênio inicial, podendo resultar em compostos com produtividade insatisfatória (VEDDER, 1996).

A função da pasteurização é a eliminação de pragas e de patógenos que tenham sobrevivido após a Fase I de compostagem. Em experimentos de laboratório, a eliminação eficiente destes organismos foi atingida em temperatura de 55°C por 5 horas (GRIENSVEN, 1988; BONONI et al., 1995; VEDDER, 1996). Para a eliminação do *Diehliomyces microsporus* (Falsa Trufa), considerado um dos fungos competidores mais prejudiciais ao cultivo de *A. blazei*, Nascimento (2003), em condições de laboratório, obteve controle eficiente pasteurizando-se o composto a 60-62°C por 6 horas. Temperaturas e tempos de pasteurização acima ou abaixo destes níveis devem ser evitados. Em condições de temperaturas do composto mais baixas, entre 45 a 50°C durante uma hora, foram ótimas para a quebra de dormência dos ascósporos do *D. microsporus*. Nesta situação, de erros de pasteurização, pode-se ter a incidência aumentada deste contaminante.

O processo de pasteurização pode ocorrer naturalmente, em consequência da atividade metabólica da comunidade microbiana presente no composto. Ocorre liberação gradativa de calor, cuja intensidade é controlada por um sistema de entrada e de saída de ar no túnel, de modo automático ou manual.

Inicialmente, com o aquecimento da massa de composto, uma faixa de temperatura de 20 a 40°C permite o crescimento e o desenvolvimento de microrganismos mesófilos, os quais são, em seguida, substituídos por termófilos quando a temperatura atinge níveis mais elevados, de 45 a 60°C.

Diversos grupos de microrganismos termófilos são citados na literatura pelos seus efeitos benéficos no cultivo de cogumelos e, dentre estes, cita-se a degradação de compostos lignocelulósicos e da própria biomassa microbiana, as quais servem de nutrição ao

A. bisporus, além da redução da população de fungos competidores (VIJAY; GUPTA, 1994; CELSO, 1999).

Nas Fases I e II de compostagem, destacam-se três grandes grupos de microrganismos termófilos, os quais possuem faixas de temperaturas distintas para seu desenvolvimento (VEDDER, 1996): bactérias termófilas: 55 a 63°C; actinobactérias: 50 a 55°C; fungos termófilos: 48 a 53°C.

Durante o processo de compostagem, ocorre uma redução parcial dos teores de celulose e hemicelulose, um aumento relativo dos teores de lignina e nitrogênio e a formação de um complexo ligno-proteico, denominado “Complexo Lignina-Húmus”, o qual é nutricionalmente seletivo para os Basidiomicotas, os quais são capazes de degradar tais complexos (FERMOR, 1985; GRIENSVEN, 1988).

Um novo método de compostagem vem sendo utilizado atualmente. É denominado de sistema “*Indoor*” e refere-se à combinação das Fases I e II num sistema único, fechado (LABORDE et al., 1993; OEI, 2003). A emissão de odores e os níveis de amônia nas áreas adjacentes da produção de composto foram determinantes para o desenvolvimento deste sistema, o qual vem sendo adotado em grande escala em países desenvolvidos. Neste método, inicialmente, as palhas e/ou as camas de animais (comumente de equinos) são misturados e umedecidos em abundância por até 8 dias. Após este período, esta massa é misturada periodicamente com os outros ingredientes e, por meio de um sistema denominado “*spigt floor*”, situado no piso, injeta-se ar com alta pressão, através do composto. O processo é mais controlado que o método de compostagem curta, minimizando os custos operacionais, a perda de matéria orgânica e a emissão de amônia para o ambiente externo do sistema de compostagem.

4.3. Fase III

Compreende a fase de colonização do composto pelo *A. blazei*. A temperatura ótima do processo situa-se em torno de 27±1°C (MINHONI et al., 2005). Outros autores consideram a temperatura de desenvolvimento do micélio entre 22 a 30°C (PARK, 2001; OEI, 2003; UNICORN, 2006). Após a inoculação do composto com micélio de *A. blazei*, este, se desenvolve no composto e participa de interações com a comunidade microbiana presente no composto (FERMOR et al., 1985).

Nesta fase, o micélio de *A. blazei* não necessita de luz e desenvolve-se melhor sob concentrações elevadas de CO₂. Não se tem conhecimento do efeito do CO₂ sobre o crescimento miceliano do *A. blazei*. Para o *A. bisporus*, Gerrits (1988) menciona o desenvolvimento ótimo do micélio na faixa de 3000 a 9000 mg L⁻¹ de CO₂.

Para o *A. blazei*, é comum o acondicionamento do composto em sacos com capacidade de 10 a 15 kg de composto fresco (BRAGA, 1999; NEVES, 2000; CAVALCANTE, 2003) ou através prateleiras com aproximadamente 20 cm de espessura e capacidade de 50 a 85 kg m⁻².

Visando aumentos de produtividade nos cultivos de *A. bisporus*, muitas vezes adiciona-se uma suplementação de nutrientes no composto ao final da Fase II ou após a colonização, porém, antes da adição da camada de cobertura.

Inicialmente, na década de 60, os farelos de soja e de algodão foram utilizados como suplementos nitrogenados (FLEGG et al. 1985). Atualmente, nos Estados Unidos, Canadá e Europa, a suplementação do composto é uma técnica rotineira em produções automatizadas e conduzidas em sistema de cultivo em prateleiras. Diversos produtos comerciais à base de soja e algodão e/ou milho, tais como Champ Food[®], Millichamp[®], Spawn Mate II SE[®], ProMycel 450[®], ProMycel 600[®] e ProMycel Gold[®], foram desenvolvidos, possuindo de 27 a 60% de proteína, com o objetivo de fornecer lentamente nutrientes, principalmente o nitrogênio durante fluxos de colheita do *Agaricus* sp. As doses adicionadas variam de 1 a 1,5% da massa fresca ou de 3 a 5 % da massa seca do composto.

A suplementação no composto de *A. bisporus* nos momentos da inoculação ou na adição da camada de cobertura, possibilita aumentos de 11% e 22% na produtividade, respectivamente, (OEI, 2003). A suplementação durante a inoculação é vantajosa, pois, tem-se a condução de duas atividades ao mesmo tempo, porém, apresenta o risco de contaminação maior em comparação à suplementação na cobertura. Outrossim, a desvantagem da suplementação durante a cobertura é a necessidade de um sistema automatizado eficiente para a adição do suplemento ao composto.

Randle e Smith (1986) obtiveram produtividades de no mínimo 10% superior quando da adição de suplemento na fase de inoculação de compostos sintéticos para produção de *A. bisporus*. Segundo o autor, esta técnica é viável somente quando a

suplementação é utilizada como um fator de aumento de produtividade e não como um elemento enriquecedor de compostos “pobres”.

4.4. Camada de cobertura

A camada de cobertura deve ser colonizada pelo micélio o mais rápido possível, pois, caso contrário, esta pode se tornar vulnerável a contaminantes e pragas.

A camada de cobertura tem como funções: proteção do composto contra desidratação; desenvolvimento de micro-clima que possibilite o crescimento do micélio do cogumelo e o desenvolvimento de bactérias benéficas à formação de basidiomas; fonte de água para desenvolvimento do micélio e dos basidiomas (GRIENSVEN, 1988).

Adiciona-se calcário à camada de cobertura para se elevar o pH para um valor próximo a 7, pois, na maioria das vezes, os solos brasileiros que são utilizados como camada de cobertura e as turfas possuem pH reduzido. Para a correção do pH das camadas de cobertura, comumente adiciona-se o calcário calcítico ($< 3 \text{ mg kg}^{-1}$) ou carbonato de cálcio. O uso do calcário dolomítico, muito utilizado na agricultura, é desaconselhável, pois possui concentração elevada de Mg ($> 20 \text{ mg kg}^{-1}$). Deste modo, o magnésio em elevada proporção, pode ser tóxico ao cogumelo, atrasando o início da formação de primórdios e conduzindo à produtividades baixas (ATKINS, 1974, citado por KURTSMAN, 1991).

Em função do calcário ser pouco solúvel em água e, por não ter reação imediata no solo, é aconselhável proceder-se a sua aplicação aos solos, em condições de campo com antecedência de pelo menos 2 meses de antecedência, devido à falta de garantia de condições de umidade e de temperatura adequadas durante o período de correção do pH (OSAKI, 1990). Neste sentido, para a utilização de calcário em camadas de cobertura para o cultivo de cogumelos, aconselha-se a incorporação com pelo menos 20 dias de antecedência da cobertura e umedecimento a 60-65% (MINHONI et al., 2005).

No Brasil, o método mais utilizado para a determinação da quantidade de calcário para a correção de pH das camadas de coberturas é o da saturação de bases, determinado em laboratório (MINHONI et al., 2005). Ainda assim, muitos produtores utilizam aparelhos de determinação de pH no campo e fitas colorimétricas. Este último método é pouco preciso, possibilitando erros graves na correção da acidez das camadas de cobertura. Neste

sentido, determinou-se o pH, por métodos de campo (fitas colorimétricas) e o de Saturação de Bases, de diversas amostras de camada de cobertura coletadas na região de São José de Rio Preto/SP. Os dados observados acusaram variações de até 1,8 nos valores do pH, demonstrando a falta de precisão dos métodos de campo utilizados, ocasionando correção parcial do índice pH das camadas de cobertura⁴.

Usualmente, os produtores utilizam solos da região do próprio cultivo de cogumelos como camada de cobertura, adicionados de 30% de carvão vegetal fragmentado (0,5 a 3 cm), com o objetivo de se aumentar a capacidade de absorção de água e de se evitar a compactação excessiva em função da adição de água à camada de cobertura por meio das regas (MINHONI et al., 2005).

Outra opção como camada de cobertura é a turfa. É um material orgânico formado pelo acúmulo de material de origem vegetal, parcialmente decomposto, encontrado em camadas e geralmente em regiões alagadas. A absorção de água pode ser de até quatro vezes em relação à sua massa seca (GRIENSVEN, 1988).

Em Experimentos conduzidos no Módulo de Cogumelos, a turfa SC (Criciúma-Santa Catarina) proporcionou incrementos de até 100% de produtividade do *A. blazei* em comparação à camada de cobertura terra+carvão (EIRA, 2003).

Na Holanda, é comum o uso de uma mistura de turfas ou seja, 20% turfa marrom (“brown peat”) e 80% turfa negra (“black peat”), com pH 7, fornecida por empresas especializadas (BVB-Euroveen).

Alguns produtores utilizam uma técnica denominada SFC – “Simultaneous Filling and Casing”, que consiste na aplicação da camada de cobertura simultaneamente ao enchimento de prateleiras de cultivo com o composto, o qual acabou de ser inoculado. Este sistema tem como principal objetivo a redução do tempo de início do 1º fluxo de colheita e, conseqüentemente, redução do ciclo de cultivo (OEI, 2003).

⁴ Dados não publicados. Projeto de Extensão Rural e Pesquisa CNPq/Módulo de Cogumelos: O Cultivo do Cogumelo *Agaricus blazei* na agricultura familiar e a conseqüente melhoria das condições sócio-econômicas”

4.5. Tecnologia de cultivo

Em função da origem das linhagens, alguns autores (PARK, 2001; MENDONÇA et al., 2005; NASCIMENTO, 2003; OEI, 2003; KOPYTOWSKI FILHO et al., 2006) consideram uma faixa ampla para a temperatura ótima de desenvolvimento do micélio de *A. blazei*, ou seja, 22 a 30°C. Linhagens conservadas no banco de matrizes do Módulo de Cogumelos da FCA desenvolvem-se em temperaturas de 27±1°C.

O cultivo de *A. blazei* foi inicialmente conduzido em campo aberto, com custos de implantação reduzidos. Os produtores acreditavam que obteriam produtividades maiores e de melhor qualidade comercial, bem como teores maiores de glucanas nos basidiomas, um polissacarídeo considerado possuidor de efeitos medicinais. Neste sistema, abrem-se valas no solo, com aproximadamente 30 cm de profundidade e 20 de cm de largura, onde se deposita o composto. Como camada de cobertura, utiliza-se o próprio solo que foi retirado das valas. O controle de ambiente usualmente é feito somente com irrigação por aspersão e, em geral, obtem-se ciclos longos de cultivo (mais de 4 meses).

Em algumas regiões do Estado de São Paulo, é comum os produtores de *A. blazei* conduzirem seus cultivos em estufas revestidas com plástico e sombrite. Estas estufas possuem, em média, 3 a 4 m de pé direito, prateleiras de madeira ou de bambu para a deposição dos sacos de compostos ou em sistema de cultivo em “camas”, sistema de irrigação por aspersão e em algumas destas, sistema de ventilação ou exaustão do ar por meio de motores elétricos.

Muitas teorias têm sido apresentadas sobre os fatores de influência na formação de primórdios e em função do grande número destes, o controle de cada um e/ou de um conjunto destes é extremamente difícil. A temperatura, o teor de CO₂, a concentração de oxalato, o pH da camada de cobertura, a presença de bactérias, dentre outros, afetam a formação de primórdios (VERBEKE et al., 1991).

As amplitudes da temperatura ambiental e o tempo de permanência do composto colonizado nestas condições tendem a afetar o sincronismo dos fluxos de colheita. O *A. blazei*, em determinadas épocas do ano, caracterizadas por temperaturas constantes, sejam elas elevadas (acima de 30°C) ou reduzidas (menores que 15°C) e, em cultivos com ambiente parcialmente controlado, observa-se o prolongamento dos fluxos de colheita e

consequentemente do ciclo de cultivo, o qual pode se estender de 20 e 180- dias, respectivamente.

Braga (1999), testando o efeito de diferentes ambientes de cultivo, massas de composto e espessuras de camada de cobertura, obteve produtividade de 9,36 a 15,76%, quando os cultivos foram conduzidos em estufa de cobertura plástica, com massa de 10 kg de composto fresco e 5 cm de espessura da camada de cobertura.

Cavalcante (2003), avaliando o efeito de três camadas de cobertura em dois ambientes de cultivo de *A. blazei* no Estado do Ceará, obteve resultados de produtividade variando de 6,51 a 9,62%, em ambiente desprotegido (sob mata e em região montanhosa), com amplitude térmica diária de 4°C a 7 °C. Neste mesmo estudo, o cultivo em ambiente controlado e amplitude térmica diária média foi de 3,1°C, com umidade relativa do ar em 60 a 90%, a produtividade variou entre 2,73 a 4,14%. O autor considerou que as menores produtividades obtidas em ambiente controlado em relação ao cultivo de campo (desprotegido), deveu-se à falta de um fator eficiente de indução de primórdios (amplitude térmica e aeração).

Kopytowski Filho (2002), em ambiente controlado, obteve produtividade de 7,92% num período de cultivo de 151 dias. Neste mesmo experimento, o autor obteve 6 fluxos de colheita com a indução feita através do binômio aumento de aeração e redução de temperatura do ambiente de 28°C para 20-22°C, por 3 dias, seguido de elevação para 28°C.

O ácido oxálico, é formado pelo micélio do fungo (*A. bisporus*) e, quando na forma solúvel no composto apresenta um papel negativo na formação de primórdios. Contudo, o processo de indução por meio de redução da temperatura do composto acarreta diminuição na solubilização do oxalato. Por outro lado, este mesmo processo de indução pode afetar negativamente a formação de Fe^{++} , considerado benéfico na camada de cobertura para a formação de primórdios (VERBEKE et al., 1991).

No Estado de São Paulo, os produtores consideram o cultivo como sendo economicamente viável quando a produtividade situa-se acima de 10% (10 kg de massa fresca de basidiomas produzidos em 100 kg de massa fresca de composto). Contudo, a média de produtividade tem sido de aproximadamente 7% em ciclos de cultivo que se estendem por 100 a 180 dias, comumente produzidos em épocas de temperaturas mais elevadas (primavera-

verão). Perdas totais de composto são muito comuns, chegando a aproximadamente a 50% dos lotes produzidos.

4.6. Certificação orgânica

O alimento “orgânico” possui maior valor agregado em comparação ao produto convencional ou sem certificação. Para os cogumelos orgânicos comercializados na forma “in natura” e direcionados ao mercado nacional, os preços são mais elevados. Contudo para o *A. blazei*, comumente desidratado e direcionado à exportação, observam-se preços muito similares entre o produto orgânico certificado e o produto convencional. Porém, observa-se uma preferência dos importadores pelo produto certificado.

O cogumelo *A. blazei* é comumente comercializado para fins terapêuticos e, desta forma, intensifica-se a busca por basidiomas com qualidade sanitária e nutricional, com teores reduzidos de elementos químicos passíveis de causarem danos à saúde e que estejam dentro dos padrões aceitáveis por órgãos de fiscalização, controle e certificação de produtos alimentícios, fármacos e outros.

Segundo Darolt (2000), o mercado de produtos orgânicos é um dos que mais cresce no Brasil, sendo uma alternativa para que os produtores rurais possam diversificar a produção e aumentar a renda de suas propriedades.

Para que um produto seja considerado alimento “orgânico”, a legislação brasileira determina que o mesmo seja produzido sem ou com mínima utilização de insumos sintéticos e que tenha o acompanhamento de um órgão fiscalizador (agência certificadora), o qual, através de inspetores, reconhece o produto como sendo de origem orgânica (BRASIL, 2003).

As certificadoras com reconhecimento internacional (DEMETER, OCIA, IBD, ALASKA ORGANIC) possuem diretrizes específicas para a produção de cogumelo orgânico, as quais, na maioria das vezes, são adaptações das diretrizes utilizadas na produção de vegetais e na criação de animais (KOPYTOWSKI FILHO, 2004).

O programa de certificação holandês MBT (“Cultivo amigo do meio ambiente”) oferece a possibilidade dos próprios produtores auto certificarem-se com a etiqueta MBT. Neste programa, os auditores fiscalizam periodicamente o local de cultivo e sugerem

quando necessário, mudanças no processo de cultivo e/ou no manejo geral da empresa. A ênfase deste programa é o manejo de pragas, delineado através de procedimentos considerados ecologicamente corretos.

Para a produção de cogumelos com certificação orgânica, há falta de padronização de diretrizes entre as certificadoras e, algumas vezes, há ausência destas. Em 2003, o Instituto Biodinâmico (IBD) elaborou as primeiras diretrizes específicas para a produção de cogumelos com certificação orgânica no Brasil e, desde então, estas têm servido como base para muitas certificadoras nacionais e internacionais.

Neste sentido, algumas certificadoras no Brasil têm permitido o uso de ingredientes não certificados para a produção de composto para cultivo de cogumelos e também, o uso de outros ingredientes para as outras fases do cultivo.

Esta flexibilidade era prevista até dezembro de 2005 e após, seria obrigatória a utilização de todos os ingredientes das formulações dos compostos e de qualquer outro substrato durante o cultivo, com certificação orgânica. Porém, devido à dificuldade do fornecimento de ingredientes orgânicos ou muitas vezes em função da inviabilidade econômica da aquisição destes, houve uma protelação deste período, ainda sem data definida para se encerrar.

Dentre as diretrizes para a produção orgânica certificada de cogumelos citam-se a proibição da utilização de formol na camada de cobertura e a adição de suplementados nitrogenados solúveis ao composto e, qualquer produto não certificado a ser adicionado deve possuir documentação de rastreabilidade.

4.7. Elementos metálicos e semi metálicos no cultivo de basidiomas

Alguns elementos químicos como o C, N, S, P K e Mg são considerados “essenciais” para os fungos e são absorvidos em maior quantidade. Outros elementos, necessários em pequenas quantidades, são considerados “traços”. Para alguns outros elementos químicos ainda, detectados na constituição dos fungos, não existe uma indicação de uma função definida e/ou necessária (MILLES; CHANG, 1997).

A Tabela 1 apresenta alguns elementos, considerados “traços”, e as suas funções no metabolismo dos fungos.

Tabela 1. Elementos traços e suas funções no metabolismo dos fungos (Adaptado de Milles e Chang, 1997):

Elemento	Função
Ferro	É constituinte de metaloproteína citocromo e da catalase. Requerido em concentrações de 0,1 a 0,3 mg kg ⁻¹ .
Zinco	É ativador de muitas enzimas. Requerido em concentrações de 0,0001 a 0,5 mg kg ⁻¹ .
Manganês	É ativador de enzimas do ciclo do ácido tricarboxílico. Necessário em concentrações de 0,0005 a 0,01 mg kg ⁻¹ .
Cobre	Faz parte da composição da tirosina. Necessário em concentrações de 0,01 a 0,1 mg kg ⁻¹ . Concentrações mais elevadas são consideradas tóxicas aos fungos.
Molibidênio	Constituinte da enzima Nitrato Flavoproteína Redutase. Requerido em concentrações de 0,0001 a 0,01 mg kg ⁻¹ , podendo ser requerido em quantidade maior quando o nitrato é utilizado como fonte de nitrogênio.

Com referência aos teores de elementos metálicos, os cogumelos têm sido alvo de pesquisas constantes, porém, controversas, devido à capacidade destes de acumular diversos elementos químicos em sua composição, em concentrações que são consideradas potencialmente tóxicas para os seres humanos. Neste sentido, teores elevados de Cd, Pb e Hg são comumente encontrados nos basidiomas em comparação a outros alimentos (DEMIRBAS, 2004).

Segundo Sardella e Mateus (1996), os elementos metálicos perfazem cerca de 76% da tabela periódica. São bons condutores de calor e de eletricidade, dúcteis (capacidade de suportarem deformação física), maleáveis e sólidos em condições ambientais, com exceção do gálio e do mercúrio, que são líquidos.

O termo “metal pesado” tem sido alvo de diversas controvérsias. O parâmetro mais utilizado para esta definição é a densidade. Segundo alguns autores, metal pesado é qualquer elemento químico que possua elevada densidade, isto é, acima de 4,0 g cm⁻³ e, para outros, acima de 7 g cm⁻³.

DUFFUS (2002), após um estudo sobre a definição do termo “metal pesado” em função da densidade, peso atômico, número atômico, propriedades químicas e toxicidade de um elemento, concluiu não haver um embasamento científico para os termos “metal pesado” ou “metal tóxico”. Deste modo, o autor sugere que estes termos sejam evitados e substituídos por outros, definidos em função de propriedades e efeitos químicos, biológicos e toxicológicos de cada elemento.

A quantificação dos teores de elementos metálicos em solos é importante para indicar a potencialidade de toxidez destes, bem como para orientar manejos, principalmente com aplicações constantes de resíduos urbanos e industriais, em áreas para fins agrícolas. Nos Estados Unidos e na comunidade européia, a aplicação de resíduos em solos agrícolas é regulamentada também pelo teor de elementos metálicos presente no solo (RAIJ et al., 2001). A Tabela 2 apresenta a classificação de qualidade de compostos agrícolas e limites máximos para os teores de alguns elementos químicos.

Tabela 2. Classificação de qualidade de compostos agrícolas e limites máximos para os teores de alguns elementos químicos (GENEVIVI et al., 1997, citado por KIHIL, 1998).

Classes de qualidade de composto	Cd	Cr	Ni	Pb	Cu	Zn
	-----mg kg ⁻¹ -----					
Muito alta	<1	< 70	<30	<100	<100	<200
Alta	1-2,5	70-150	30-6	100-150	100-200	200-500
Baixa	>4	>200	>100	>500	>400	>1000
Limites máximos permitidos	2,6-4	151-200	61-100	151-500	201-400	401-1000

Nas diretrizes de produção orgânica de cogumelos, não há definição dos teores máximos permitidos para elementos metálicos e semi-metálicos no composto, na camada de cobertura ou nos basidiomas. Deste modo, utilizam-se como referência os teores máximos de elementos metálicos permitidos nas diretrizes para substratos e solos para o cultivo de plantas (Tabela 3).

Segundo FAO/WHO (2001), o teor máximo permitido de chumbo (Pb) nos basidiomas é de 0,1 mg kg⁻¹ de massa seca de basidioma. Para os teores de Cd e Hg nos

basidiomas, o Ministério da Saúde da Hungria permite teores maiores, ou seja, 10 e 5 mg kg⁻¹, respectivamente (RACZ; OLDAL, 2000).

Tabela 3. Teores máximos de elementos metálicos no composto e solo para cultivo de plantas (IBD, 2001).

Elemento	Composto	Solo
	-----mg kg ⁻¹ -----	
Cádmio	0,70	1,5
Cobre	70	60
Níquel	25	25
Chumbo	45	100
Zinco	200	200
Mercúrio	0,40	1,0
Cromo	100	100

Basidiomas coletados no campo geralmente apresentam teores mais elevados de diversos elementos metálicos com potencial tóxico em relação à mesma espécie em condições de sistema de cultivo intensivo (KALAC; SVOBODA, 2000; DEMIRBAS, 2001).

Os basidiomicotas, mesmo quando cultivados em substratos ou coletados em áreas consideradas de baixo risco de contaminação pelo Cd, Pb, Zn, Hg, Cu, podem apresentar teores elevados de alguns destes elementos. De outro modo, áreas e substratos considerados altamente contaminados, podem apresentar teores reduzidos destes elementos nos basidiomas. Neste sentido, os basidiomicotas são considerados bio-indicadores em áreas com a presença de elementos químicos com potencial tóxico, pois permitem a indicação de área contaminada, porém, não permitem avaliar os teores destes elementos presentes (DEMIRBAS, 2004).

O grau de absorção de elementos químicos é considerado específico da espécie e de pouca importância a correlação da absorção de elementos químicos por indivíduos de mesmo gênero ou família. Deste modo, o fato mais consistente em relação à absorção destes elementos é observado em função da idade do micélio e do intervalo de fluxo

de colheita (DEMIRBAS, 2004). Ademais, os elementos bem como os seus teores, variam em função da fração analisada do basidioma (píleo ou estípite), da época da colheita, do tipo de substrato e do local de crescimento.

Alguns elementos metálicos e semi-metálicos (arsênio) são utilizados em quantidade mínima pelos microrganismos, plantas, animais e o homem (ALONSO MOLNAR, 2002). Mas, pelo fato destes metais permanecerem no solo por um tempo indefinido, podem vir a causar danos à saúde humana e animal ao entrarem na cadeia alimentar (BERTON, 2001).

Segundo Raij et al. (2001), elementos metálicos podem ser absorvidos pelas plantas quando cultivadas em solos contaminados. Outrossim, os cogumelos cultivados, principalmente os agaricáceos, desenvolvendo-se em substratos agrícolas e/ou resíduos da agroindústria, possuindo assim um potencial de absorção destes elementos tóxicos à partir do próprio substrato de crescimento ou via camada de cobertura.

Em geral, alguns elementos encontrados nos fertilizantes e corretivos são: Cd, Cr, Cu, Ni, Pb, Fe, Co, Mn, Mo e Zn. Destes, o Cu, Fe, Mn, Mo, Ni e Zn são essenciais às plantas, o Co às bactérias fixadoras de nitrogênio e o Co, Cr, Cu, Fe, Mn e Zn para os animais (BERTON, 2001) .

Segundo Berton (2001), a absorção de elementos metálicos pelas plantas apresenta grande dependência elevada da especiação do elemento, isto é, correlacionam-se melhor os teores potenciais de absorção em função do estado químico, físico e de oxidação.

Processos de limpeza em água e cozimento dos basidiomas promovem redução nos teores de metais pesados (KALAC; SVOBODA, 2000; KALAC et al., 2004). Segundo Lattif et al. (1996), o píleo tem acúmulo maior de sódio, manganês, zinco, ferro, cobalto e arsênio em relação ao estípite, porém, na maioria dos estudos sobre teores de elementos metálicos em cogumelos, utilizam-se os basidiomas inteiros para as análises (KALAC; SVOBODA, 2000; DEMIRBAS, 2001).

Alonso Molnar (2002) estudou os efeitos de diferentes camadas de cobertura (solo, cacos de cerâmica e turfa) sobre a produtividade de *A. blazei* e sobre os teores de metais pesados nos basidiomas, camada de cobertura e composto. Constatou que o teor de cádmio nos basidiomas não teve correlação com os teores de cádmio das camadas de cobertura

utilizadas. Contudo, para os teores de cromo e de chumbo nos basidiomas, houve correlação com os seus teores nas camadas de cobertura do tipo [solo + cacos de cerâmica] e [turfa + cacos de cerâmica], respectivamente. O autor inferiu ainda que, embora as camadas de cobertura possuam teores elevados de metais pesados, estes podem estar em formas não disponíveis à absorção pelo *A. blazei*. O mesmo autor concluiu ainda que o consumo diário per capita de 40 g de basidiomas desidratados extrapolariam os limites padrão de ingestão diária de metais pesados.

A capacidade de um solo em remover alguns elementos potencialmente tóxicos da solução do solo é diretamente proporcional à sua CTC (Capacidade de Troca de Cátions) (KIHIL, 1998). Deste modo, teores de elementos metálicos tornar-se-ão menos disponíveis na solução do solo à medida que a CTC deste aumenta.

Berton (2001) afirma que à medida que o pH do solo aumenta, a solubilidade de Cd, Cu, Hg, Pb, Zn e Ni diminui, enquanto o As, Mo e Se tornam-se mais solúveis.

A Tabela 4 apresenta a dose máxima de Cd em fertilizantes agrícolas em função da Capacidade de Troca de Cátions (CTC) do solo.

Tabela 4. Dose máxima permitida de Cd em fertilizantes agrícolas em função da CTC do solo (KIHIL, 1998).

CTC meq (100 g solo) ⁻¹	Dose máxima permitida de Cd em fertilizantes, kg ha ⁻¹
< 5	5
5 – 15	10,5
> 15	20

5. MATERIAL E MÉTODOS

Foram conduzidos três experimentos nas instalações do Módulo de Cogumelos da FCA/UNESP-Botucatu, Departamento de Produção Vegetal, Defesa Fitossanitária, utilizando-se três tipos de compostos (orgânico certificado, semi-sintético e sintético), três linhagens de *A. blazei* (ABL 99/30, ABL 03/44, ABL 04/49), dois tipos de suplementos nitrogenados (farelo de soja e Champ Food®) e dois ambientes de cultivo (parcialmente controlado e controlado).

A seguir, serão descritos os experimentos 1, 2 e 3.

5.1. Experimento 1: Produção de *Agaricus blazei* em três tipos de compostos e seus efeitos na produtividade e nos teores de elementos metálicos nos compostos e nos basidiomas.

O experimento foi instalado para se avaliar a produtividade de *A. blazei* em três compostos diferentes, formulados a partir de ingredientes com procedências diferentes, bem como os teores de elementos metálicos nos compostos e nos basidiomas.

5.1.1. Produção de matrizes

Utilizou-se a linhagem ABL 99/30, procedência desconhecida, e a linhagem ABL 04/49 de *A. blazei*, procedente de Mogi das Cruzes (SP), reisolada de material coletado em área de cultivo em São José do Rio Preto (SP), ambas conservadas no banco de matrizes do Módulo de Cogumelos, Departamento de Produção Vegetal, Defesa Fitossanitária – FCA/UNESP.

5.1.1.1. Isolamento

5.1.1.1.1. Coleta de basidiomas

As duas matrizes das linhagens de *Agaricus blazei* ABL 99/30 (Figura 1) e ABL 04/49 (Figura 2) foram reisoladas de um experimento conduzido previamente ao Experimento 1.

Foram coletados diversos basidiomas de cada linhagem, com bom aspecto sanitário (sem a presença de pragas e contaminantes) e com o píleo fechado (sem o rompimento do véu).



Figura 1. Basidiomas da linhagem ABL 99/30 de *Agaricus blazei*.



Figura 2. Basidiomas da linhagem ABL 04/49 de *Agaricus blazei*.

De cada basidioma, retirou-se parte do estípite com uma faca (aproximadamente a 1 cm da parte inferior da borda do píleo) para se evitar possíveis contaminações, principalmente devido a resíduos da camada de cobertura. Após, cada linhagem foi acondicionada em embalagens de papel, devidamente identificadas e enviadas imediatamente ao laboratório de produção de matrizes (com pressão positiva e filtro HEPA), para se iniciar o processo de isolamento (matriz primária).

5.1.1.1.2. Preparo do meio de cultura

O meio de cultura para o isolamento e matriz primária foi à base de composto-ágar (meio CA). Para o preparo deste meio, inicialmente, coletou-se uma amostra mista de composto ao final da Fase II, com relação C/N de aproximadamente 30/1, sendo em seguida desidratada em estufa a 60-62°C por 72 horas.

Após, 60 g do composto foram fervidas em 700 mL de água destilada por 15 minutos. Filtrou-se em peneira comum de uso doméstico, de malha fina, e a suspensão filtrada foi disposta em frascos de Duran (capacidade de 1000 mL). Adicionou-se mais água para completar o volume para 1000 mL em cada frasco e efetuou-se a esterilização. Para tanto, autoclavou-se a 121°C por 30 minutos e, após 24 horas, adicionou-se 15 g de ágar, autoclavou-se novamente a 121°C por mais 30 minutos, seguido de resfriamento do meio de cultura a aproximadamente 45-50°C. Assim preparado e em temperatura adequada, o meio foi vertido em placas de Petri (90 x 15 mm) (20 mL por placa, aproximadamente) (Adaptado de KOPYTOWSKI FILHO, 2002).

5.1.1.1.3. Processo de isolamento

Todos os procedimentos de isolamento foram conduzidos em câmara de fluxo laminar e próximos à chama de bico de Bunsen. Antes de se iniciar o processo, umedeceu-se um chumaço de algodão com álcool 70% e aplicou-se em toda a superfície interna da câmara de fluxo laminar. Ligou-se a luz ultravioleta por 15 minutos com todos os

utensílios de isolamento (pinça, estilete, caneta marcadora, algodão, becker, filme esticável de PVC e placas) dentro da câmara.

Para assepsia das mãos, efetuou-se a lavagem com detergente e água, secou-se com papel toalha e, em seguida, aspergiu-se álcool 70% em abundância.

O píleo de cada basidioma foi aberto longitudinalmente com as mãos, com o devido cuidado para não ter contato com a parte interna. Com o auxílio de uma pinça e estilete desinfestados, foram retirados fragmentos de aproximadamente 0,2 cm de largura e 0,5 cm de comprimento do contexto e, em seguida, depositou-se um fragmento no centro de cada placa. Após, vedou-se a placa com filme de PVC para se evitar a desidratação precoce do meio de cultura e do micélio, bem como a entrada de insetos, ácaros ou contaminantes. Foram utilizadas 10 placas para o isolamento de cada linhagem e mais duas placas testemunha para verificação da eficiência do processo de esterilização.

Em seguida, as placas foram acondicionadas em embalagens plásticas de Polietileno de Alta Densidade (PEAD), transferidas para uma câmara de incubação tipo BOD e mantidas a 28°C, na ausência de luz, por 12 dias para colonização de $\frac{3}{4}$ da placa (MINHONI et al., 2005). As inspeções foram diárias, eliminando-se as placas que apresentassem crescimento lento em comparação às outras placas inoculadas com a mesma linhagem e/ou com características atípicas do micélio de *A. blazei* (excessivamente cotonoso ou rizomórfico) ou com a presença de contaminantes (colônias de fungos ou bactérias).

5.1.1.2. Matriz primária

Os procedimentos para o preparo do meio de cultura para a matriz primária e as condições de assepsia do processo foram os mesmos utilizados para o isolamento (item 5.1.1.1). Inicialmente, foram retirados discos de 0,5 cm de diâmetro da matriz primária e foram transferidos para o centro de outra placa contendo o mesmo meio CA. Após, as placas foram vedadas com filme de PVC e transferidas para uma BOD e mantidas a 28°C, em ausência de luz, por 10 dias para colonização de $\frac{3}{4}$ da placa. Para cada placa do isolamento, preparou-se 5 placas de matriz primária.

5.1.1.3. Matriz secundária

O substrato utilizado para a produção da matriz secundária foi à base de grãos de tritcale – *Triticum secale* (cruzamento do trigo - *Triticum aestivum* x Centeio - *Secale cereale*), provenientes da Fazenda Experimental Lageado - FCA/UNESP-Botucatu.

Os grãos secos, acondicionados em sacos de aniagem, foram imersos em tanque com água de abastecimento público, sob fervura, através da injeção de vapor de caldeira (na base do recipiente), para o cozimento por 40 minutos.

Após, retirou-se os sacos do tanque e suspendeu-se através de um sistema hidráulico, para o escoamento de excesso de água por aproximadamente 40 minutos. Em seguida, adicionaram-se 20 g kg⁻¹ de calcário calcítico e 160 g kg⁻¹ de gesso de construção (secagem lenta), em relação ao peso úmido dos grãos cozidos, e misturou-se em betoneira de construção (capacidade 420 L) (Figura 3).

Após a homogeneização, 250 g do material foram acondicionados em frasco de vidro transparente (tipo conserva, 800 mL), ocupando cerca de 2/3 do volume do mesmo. Fixou-se um de papel de filtro^{5,6} sob a tampa metálica para se permitir aeração e impedir contaminações após autoclavagem.

Cada placa de matriz primária contendo micélio e meio CA foi dividida em oito partes, em forma de “pizza”. Cada parte deste fragmento foi inoculado em frascos contendo os grãos preparados. Acondicionaram-se os frascos verticalmente, com a tampa voltada para cima, em câmara tipo BOD a 28°C, por 12 dias, em ausência de luz, para a colonização de todo o substrato (Figura 4). Vistorias diárias foram feitas para identificação visual de possíveis contaminantes no substrato e/ou crescimento lento de micélio.

A Tabela 5 apresenta a seqüência de procedimentos durante o processamento de grãos e o rendimento destes.

⁵ Especificações técnicas: diâmetro: 7 cm, gramatura: 80 gm⁻², espessura: 205 µm e permeabilidade ao ar: 14 Ls⁻¹ m⁻².

⁶ Tecnologia de aplicação de papel de filtro desenvolvida no Módulo de Cogumelos da FCA-UNESP.



Figura 3. Betoneira com grãos de triticales adicionados de calcário e gesso.



Figura 4. Frascos de matriz terciária de *Agaricus blazei* à base de grãos de triticales, com 12 dias de incubação.

Tabela 5. Processamento de preparo de grãos para a produção de inóculo de *Agaricus blazei* e rendimento destes.

Procedimentos	Tipo de substrato	Massa kg	Ganho kg	Perda kg	Ganho/ Perda, %
1. Pesagem de grãos secos	grãos secos de triticales	13,29	-----	-----	-----
2. Cozimento	grãos úmidos cozidos	25,5	12,21	-----	+ 91,87
3. Adição de gesso e calcário	grãos adicionados de gesso e calcário	30,09	4,59	-----	+ 18,00
4. Autoclavagem	grãos autoclavados	29,49	-----	0,58	- 1,97
5. Inoculação	grãos inoculados	29,93	-----	0,44	+1,5
6. Colonização	grãos colonizados	29,73	-----	0,19	-0,64
Rendimento final		29,73	16,2	-----	+ 121,95

(1) +: ganho.

(2) -: perda

Observa-se pela Tabela 5 um rendimento de 121,95 % na produção de grãos para a produção de inóculo de *A. blazei*, isto é, a partir 13,29 kg iniciais de grãos de triticle seco, produziu-se 29,73 kg de inóculo.

5.1.1.4. Inóculo

Nesta fase, o substrato preparado foi acondicionado em sacos plásticos de PEAD semi-transparente contendo de 1000 a 1100 g da mistura de grãos mais gesso (aproximadamente 50% do volume do saco). Soldou-se à quente a parte superior, adicionada de filme de Tyvek^{®7} para se permitir o processo de esterilização sem ruptura da embalagem e também, aeração para o desenvolvimento do micélio (Figura 5).

Para o processo de esterilização, em autoclave, manteve-se a temperatura em 121°C por 3 horas. Após, os sacos permaneceram por 24 horas em repouso para a redução da temperatura para aproximadamente 25°C. A seguir, inoculou-se cada saco plástico com aproximadamente 10-12 g de matriz secundária kg⁻¹ de massa fresca de grãos.

Os sacos inoculados foram incubados à temperatura de 28±1°C, na ausência de luz, por 15 dias, para completa colonização do substrato (Figura 6).

Tanto no processo de autoclavagem quanto na incubação, os sacos foram dispostos com o filme Tyvek[®] voltado para cima.

Durante o período de colonização, vistorias diárias foram feitas para a eliminação de sacos contaminados, com aspecto “cotonoso” ou com desenvolvimento lento do micélio. Também se verificou alterações no odor dos grãos para se verificar possíveis contaminações por bactérias e/ou leveduras. Para tanto, as embalagens foram pressionadas levemente com as mãos e, neste momento, inspirou-se o aroma liberado.

Todos os procedimentos de inoculação acima citados foram efetuados em ambiente estéril, ou seja, em sala asséptica e em câmara de fluxo laminar.

⁷ Marca DuPont. Especificações técnicas: não tecido com filamentos contínuos de PEAD, gramatura: 55 g m⁻², espessura 163μ.



Figura 5. Sacos plásticos com grãos preparados para autoclavagem.



Figura 6. Inóculo de *Agaricus blazei* à base de tritcale com 10 dias de incubação.

5.1.2. Composto

5.1.2.1. Procedência dos ingredientes utilizados na formulação dos compostos

O bagaço de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) orgânico certificado, proveniente da empresa GAPI - Grupo Agaricus de Pilar, da cidade de Pilar do Sul/SP (Projeto IBD - SP 205), foi adquirido de Usina de produção de açúcar. O bagaço de cana-de-açúcar convencional foi proveniente da Destilaria Colosso, produtora de aguardente em Lençóis Paulista/SP.

O capim coast-cross (*Cynodon dactylon*) convencional foi proveniente do Sítio Irmãos Tonin de Bariri/SP, adquirido em fardos de alimentação de equinos. A palha de braquiária (*Braquiaria* sp) orgânica foi proveniente da Fazenda Demétria, Botucatu/SP e certificada pelo IBD como biodinâmico (Projeto IBD - SP 003 D), para a alimentação de animais em geral.

O farelo de soja orgânico certificado foi proveniente da empresa Tozan de Ponta Grossa/PR (projeto IBD nº PR 137, transação nº 002993).

O calcário calcítico (marca Horical), o gesso (marca AMS) e o farelo de soja convencional (marca Cargill), foram fornecidos por empresas da região.

5.1.2.2. Determinação de carbono, nitrogênio e pH dos ingredientes

As determinações de carbono, nitrogênio e pH das palhas e do bagaço de cana-de-açúcar foram realizadas no Laboratório de Análise de Solo, do Departamento de Produção Vegetal, Ciência do Solo, da Faculdade de Ciências Agrônômicas da UNESP-Botucatu, de acordo com metodologia de Secretaria...(1988). O pH foi determinado em solução de cloreto de cálcio (0,001M), relação 1/5.

Para tanto, coletou-se 3 amostras de cada ingrediente com antecedência de 20 dias do início do pré umedecimento das palhas (1000 g de bagaço de cana-de-açúcar e 300 g de massa fresca das palhas) e submeteu-se à desidratação em estufa a 60-62°C até peso constante.

Em seguida, cada amostra foi triturada em moinho de facas, peneira 30 mesh e acondicionada em frasco de vidro com tampa de metal. Homogeneizou-se e, em seguida, retirou-se aproximadamente 50 gramas e acondicionou-se em embalagens de PEAD, devidamente identificadas para posterior análise em laboratório.

A Tabela 6 apresenta os teores médios de carbono e nitrogênio e a relação C/N dos ingredientes utilizados nas formulações dos compostos.

Tabela 6. Teores médios de carbono (C), nitrogênio (N) e relação C/N de ingredientes utilizados na formulação dos compostos (Média de três repetições).

Ingredientes	C	N	C/N
	-----mg kg ⁻¹ -----		
Bagaço de cana-de-açúcar orgânico	496,20	2,800	177/1
Bagaço de cana-de-açúcar convencional	533,33	3,260	163/1
Palha de coast-cross	509,30	15,56	33/1
Palha de capim braquiária	509,33	7,53	67/1
Farelo de soja orgânico ⁽¹⁾	450,00	70,00	6,42/1
Farelo de soja convencional ⁽¹⁾	450,00	70,00	6,42/1
Uréia ⁽¹⁾	270,00	450	0,6/1

(1) Para os teores de carbono e nitrogênio dos farelos de soja e da uréia, adotou-se as especificações técnicas dos fornecedores destes ingredientes.

5.1.2.3. Teores de elementos metálicos dos ingredientes e água de abastecimento público utilizados no preparo dos compostos.

A amostragem e preparo das amostras foram semelhantes aos descritos no item 5.1.2.2.

Para todos os ingredientes, três amostras de 20 g cada foram identificadas por números e acondicionadas em sacos de PEAD.

Para a determinação dos teores de elementos metálicos dos ingredientes dos compostos, utilizou-se solução Nitroperclórica como extrator, de acordo com metodologia descrita em Malavolta et al. (1997).

A leitura dos teores foi feita através da técnica de Espectrometria de Emissão Atômica de Plasma. Para tanto, utilizou-se um Spectrômetro de Plasma (ICP-Induction Coupled Plasma), modelo Thermo Jarrell Ash, Trace Scan, do Laboratório de Química, do Departamento de Produção Vegetal, Agricultura, da FCA/UNESP-Botucatu. Os comprimentos de onda e o limite mínimo de detecção dos teores dos elementos químicos analisados no espectrômetro são apresentados na Tabela 7.

Tabela 7. Comprimentos de onda e limite mínimo de detecção de alguns elementos químicos no Spectrômetro de Plasma (ICP).

Elemento	Comprimento de onda nm	Limite mínimo de detecção mg kg ⁻¹
Arsênio, As	197,2	0,006
Cádmio, Cd	228,8	0,002
Chumbo, Pb	220,3	0,025
Cromo, Cr	267,7	0,004
Mercúrio, Hg	184,9	0,010
Cálcio, Ca	317,9	0,010
Cobre, Cu	324,7	0,002
Magnésio, Mg	205,2	0,001
Manganês, Mn	257,6	0,001
Níquel, Ni	221,6	0,005
Sódio, Na	587,9	0,001
Zinco, Zn	213,8	0,002

A Tabela 8 apresenta os teores de Cd, Cr, Hg, Pb e Ni dos ingredientes e da água de abastecimento público utilizados nas formulações dos compostos.

Tabela 8. Teores de Cd, Cr, Hg, Pb e Ni dos ingredientes e da água de abastecimento público utilizados no preparo dos compostos T1, T2 e T3 (média de três repetições).

Ingredientes	Cd	Cr	Hg	Pb	Ni
-----mg kg ⁻¹ -----					
Bagação de cana-de-açúcar convencional	0,270	nd ⁽¹⁾	nd	nd	nd
Bagação de cana-de-açúcar orgânico	0,110	nd	nd	1,15	nd
Palha de capim Coast-Cross	0,040	nd	0,036	2,35	nd
Palha de capim Braquiária	0,014	nd	nd	nd	nd
Farelo de soja convencional	0,040	nd	0,033	nd	nd
Farelo de soja orgânico	0,026	nd	0,016	0,16	nd
Gesso	0,068	4,050	nd	nd	2,170
Calcário calcítico	0,096	0,346	nd	nd	nd
Uréia	0,220	nd	nd	nd	nd
Água de abastecimento público	nd	nd	nd	nd	nd

(1) nd: teor não detectável

5.1.2.4. Formulação dos compostos

Para o cálculo da quantidade de cada ingrediente a ser utilizado em cada formulação dos tratamentos, utilizou-se a massa na base seca.

Na Tabela 9 estão apresentadas as formulações dos compostos de cada tratamento, com as quantidades (massa seca), as porcentagens dos ingredientes adicionados na montagem da leira e a umidade dos mesmos.

Tabela 9. Formulação dos compostos T1, T2 e T3.

Ingredientes ⁽¹⁾	Umidade, %	Compostos ⁽³⁾					
		T1		T2		T3	
		kg	%	kg	%	kg	%
Bagaço de cana-de-açúcar convencional	56,33	---	---	611,3	59,06	611,3	61,34
				8		8	
Bagaço de cana-de-açúcar orgânico	76,36	615,6	57,49	---	---	---	---
Palha de coast-cross, kg	10,00	---	---	254,8	24,61	254,8	25,56
Palha de braquiária, kg	9,00	285	23,95	----	---	---	---
Farelo de soja, kg	9,00	138	12,88	110,4	10,66	71,76	7,20
Uréia, kg	---	---	---	---	---	5	0,50
Gesso, kg ⁽²⁾	---	20,20	1,88	19,53	1,86	18,80	1,99
Calcário calcítico, kg ⁽²⁾	---	40,41	3,77	39,06	3,86	37,61	3,98
Massa seca total, kg	---	1070	100	10351	100	996	100
C inicial no composto, g kg ⁻¹	---	465,3		488,3		489,7	
N inicial no composto, g kg ⁻¹	---	12,4		13,2		13,2	
C/N inicial no composto	---	37/1		37/1		37/1	

(1) Ingredientes desidratados a 62°C.

(2) O gesso e o calcário calcítico foram adicionados na formulação em 2% e 4%, respectivamente, a partir da soma da massa seca dos ingredientes lignocelulósicos e suplementos nitrogenados.

(3) Compostos T1, T2 e T3, orgânico certificado, semi-sintético e sintético.

5.1.3. Processo de compostagem

Para se evitar grandes variações no processo de compostagem Fase I e aproximar-se das características de produção comercial de composto, definiu-se a dimensão das leiras em 1,8 m de altura x 4 m de largura, no início da Fase I, o que corresponde à aproximadamente 4500 kg de massa fresca de composto, com 75% de umidade. Deste modo, ao final da Fase II, obter-se-ia aproximadamente 2000 kg de composto fresco em cada leira ou tratamento.

5.1.3.1. Pré-umedecimento

O pré-umedecimento das palhas foi conduzido em ambiente coberto, ventilação natural e com piso de cimento. Inicialmente, espalhou-se as palhas de cada tratamento, no piso de cimento, isto é, 285 kg de palha de braquiária para o tratamento 1 e 280 kg de coast-cross para cada um dos tratamentos 2 e 3. Umedeceu-se abundantemente com água por 7 dias previamente à montagem da leira de compostagem. Durante este período, os três montes de palhas foram revirados a cada dois dias.

5.1.3.2. Fase I (Fase de pátio)

No mesmo local do pré-umedecimento das palhas procedeu-se à montagem das leiras de compostagem, adicionando-se às palhas pré-umedecidas, o bagaço de cana-de-açúcar, os suplementos nitrogenados e o calcário calcítico, conforme cada tratamento (Figura 7). A Tabela 10 apresenta a quantidade de cada ingrediente adicionado na montagem das leiras dos três tratamentos.

Tabela 10. Quantidade de ingredientes adicionados aos tratamentos na montagem da leira.

Composto ⁽²⁾	Ingredientes ⁽¹⁾
T1	2600 kg de bagaço de cana-de-açúcar + 150 kg farelo de soja + 40,41 kg de calcário calcítico.
T2	1400 kg de bagaço de cana-de-açúcar + 120 kg farelo de soja + 39,06 kg de calcário calcítico.
T3	1400 kg de bagaço de cana-de-açúcar + 78 kg farelo de soja + 37,61 kg de calcário calcítico + 5 kg de uréia.

(1) Massa fresca.

(2) Compostos T1, T2 e T3, orgânico certificado, semi-sintético e sintético.

Aos 3, 5, 7 e 9 dias da compostagem Fase I, procedeu-se às reviradas dos compostos (Figura 8), adicionando-se água para se manter a umidade em 65%-75%, porém, evitando-se o escorrimento de “chorume” das leiras entre as reviradas.



Figura 7. Montagem de leira de compostagem. Figura 8. Primeira revirada de composto.

Quando se verificava o ressecamento superficial das leiras, adicionava-se água. No 7º dia, isto é, na terceira revirada, adicionou-se às leiras 20,20, 19,53 e 18,80 kg de gesso aos compostos T1, T2 e T3, respectivamente. Aos 10 dias de compostagem Fase I, ou seja, imediatamente após a última revirada, os compostos foram dispostos em caixas de polipropileno treliçadas, com dimensões de 56,5 cm de comprimento x 46,5 cm de largura x 28,5 cm de altura ($0,0354 \text{ m}^3$), com massa fresca de 13,15 a 24,54 kg (Figura 9).



Figura 9. Acondicionamento de composto para Pasteurização e Condicionamento.

A Figura 10 apresenta um esquema dos procedimentos durante o pré umedecimento das palhas e a compostagem Fase I.

5.1.3.3. Fase II (Pasteurização e Condicionamento)

A seguir, as caixas foram dispostas ao acaso no interior de câmara climatizada Dalsem Mushroom (container tipo “Reefer” com dimensões de 12 m e de comprimento x 2,25 de altura e 2 m de largura) (Figura 11) automatizada, para Pasteurização e Condicionamento, em Processo Compartimentado.

A Figura 12 apresenta foto da disposição de caixas treliçadas com composto em câmara Dalsem. Programou-se a o processo de pasteurização a $60\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 8 horas e o condicionamento a $48\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 8 dias.

Para tanto, os fatores de programação da Fase II foram inseridos no sistema através do software Dalsem Mushrooms Projects versão 20000301.001 e pelo sistema de controle e automatização VEC 31.

Considerou-se as temperaturas do processo de Pasteurização e de Condicionamento como a média das temperaturas dos três tratamentos, coletadas através de 3 sensores inseridos no centro de caixas contendo os compostos, sendo um sensor em uma caixa de cada tratamento, posicionados na mesma altura das pilhas de caixas de composto à aproximadamente à 1,5 m do piso.

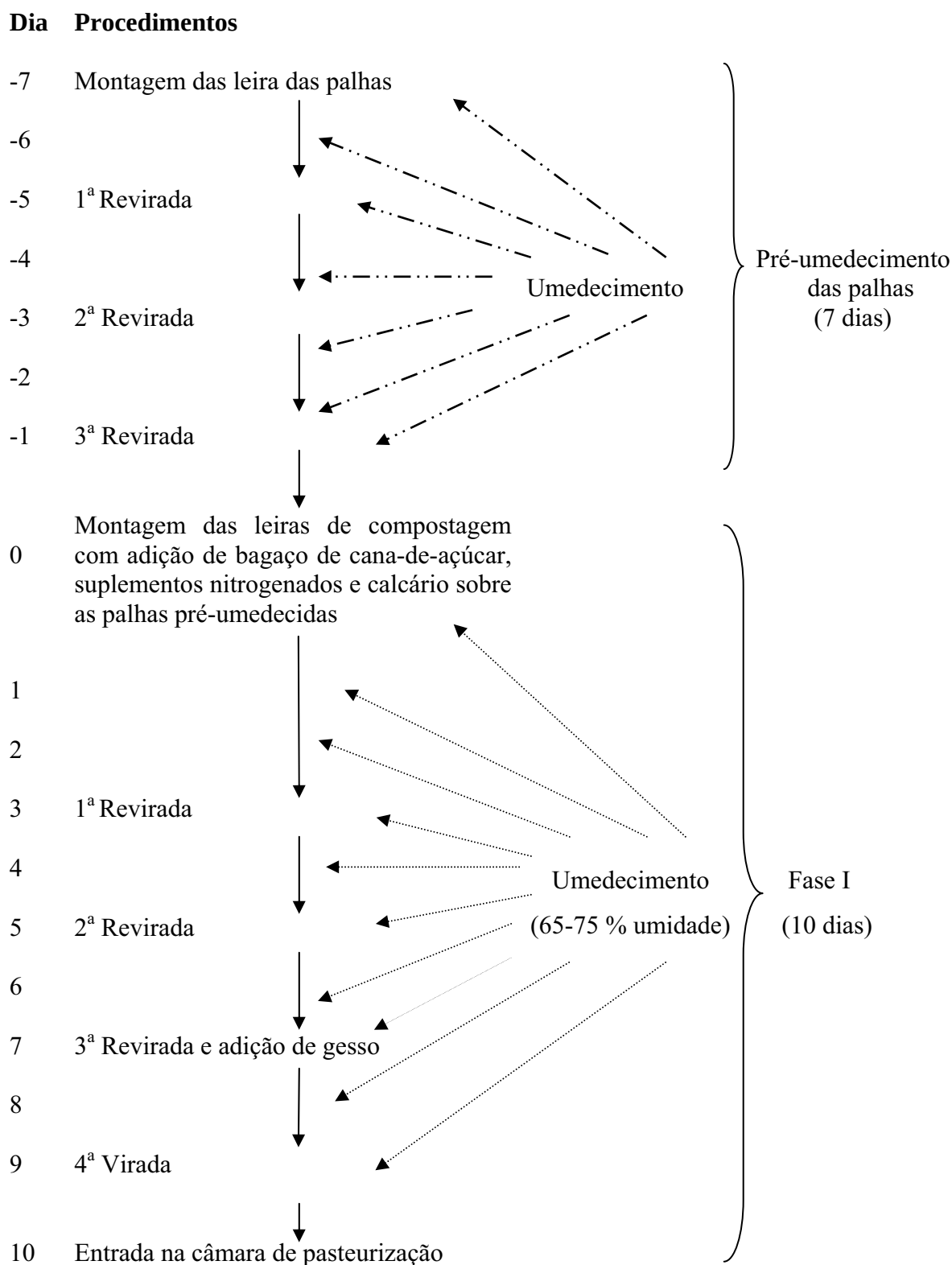


Figura 10. Esquema do processo de Pré-umedecimento das palhas e compostagem Fase I.



Figura 11. Vista interna de câmara climatizada Dalsem Mushrooms.



Figura 12. Disposição de caixas treliçadas com compostos em câmara climatizada Dalsem Mushrooms (final da Fase II).

A Figura 13 apresenta foto do painel de controle de inserção de dados de Condicionamento. A Figura 14 apresenta foto de disposição do sensor de temperatura em composto durante a Fase II.

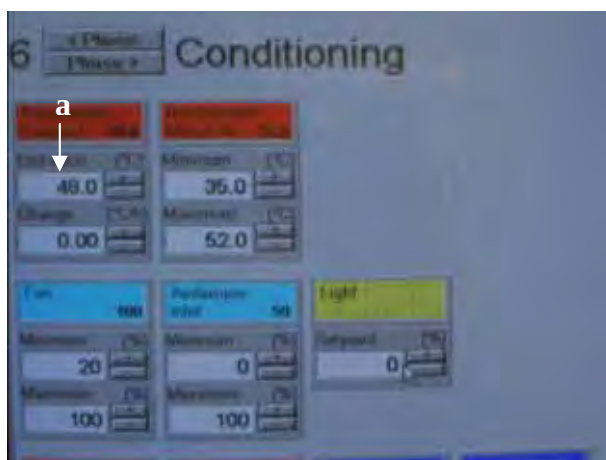


Figura 13. Painel de controle de dados durante o Condicionamento (a. temperatura média dos compostos).



Figura 14. Disposição de sensor de temperatura em composto durante a Fase II.

No 7º dia de compostagem Fase II, quando os compostos apresentavam-se sem odor de amônia e com a tendência de redução natural de temperatura dos compostos, iniciou-se um resfriamento ao final do período de condicionamento, atingindo 25 °C a 28 °C no 9º dia. As condições de temperatura durante a Fase II foram programadas, porém, variações durante o processo ocorreram em função das diferenças de composição e ingredientes de cada composto, tendo como consequência, um maior tempo para a equalização das temperaturas dos compostos.

Durante a Fase II, a umidade relativa do ar atingiu valor de até 95% do 1º ao 7º dia de compostagem, reduzindo-se para aproximadamente 60% no 8º dia, isto é, no momento de redução de temperatura dos compostos para o processo de inoculação onde foi reduzido a injeção de vapor na câmara e o sistema de refrigeração foi acionado.

A dinâmica da temperatura dos compostos dos tratamentos durante o processo de pasteurização é apresentada na Figura 15.

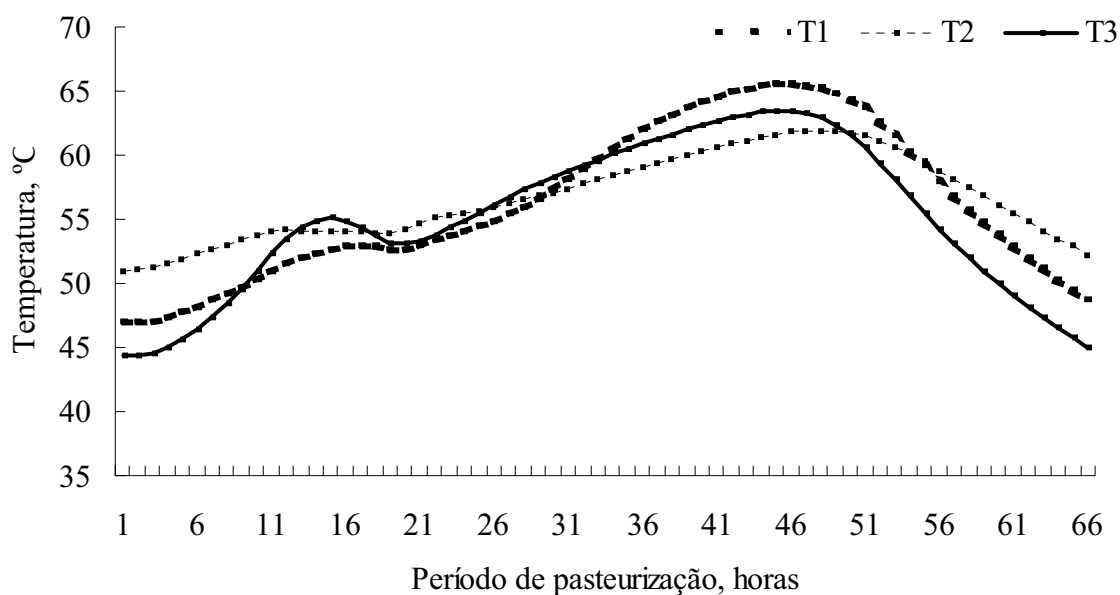


Figura 15. Gráfico de temperatura dos compostos durante a Pasteurização, tratamentos T1 (orgânico), T2 (semi-sintético) e T3 (sintético).

A Figura 16 apresenta um esquema dos procedimentos durante a compostagem Fase II (Pasteurização e Condicionamento).

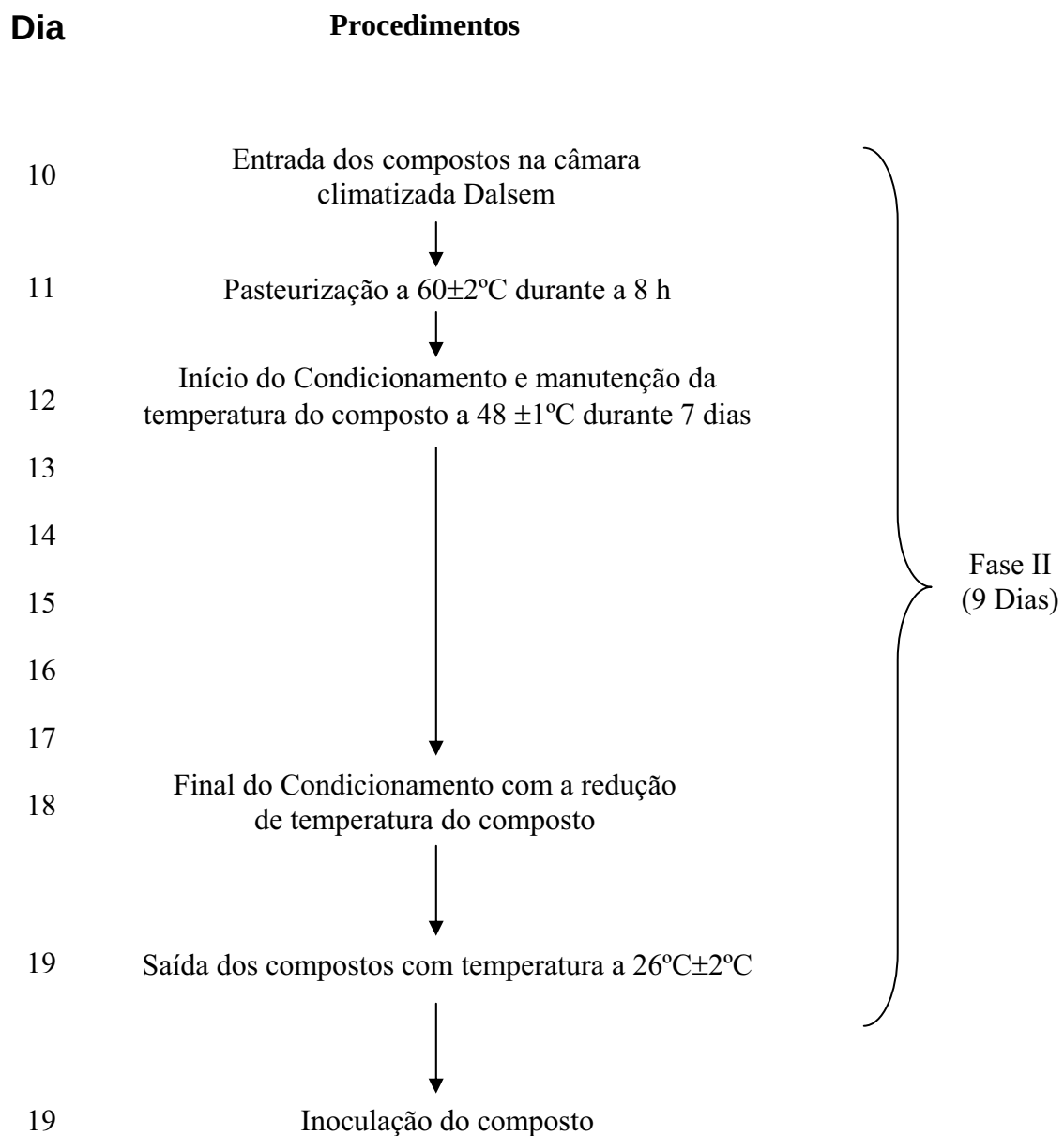


Figura 16. Esquema da compostagem Fase II (Pasteurização e Condicionamento).

5.1.4. Fase III (Colonização do composto)

5.1.4.1. Inoculação

Primeiramente, borrifou-se com álcool 70% os utensílios utilizados durante a inoculação (tesoura, estilete, bandejas), bem como se fez a lavagem das mãos com detergente, secou-se e borrifou-se com álcool 70%.

Cortou-se, com uma tesoura as embalagens com inóculo (Figura 17), transferindo-se os grãos colonizados para uma bandeja de plástico. Fragmentou-se o bloco de inóculo com as mãos para uma melhor distribuição do mesmo no composto (Figura 18).



Figura 17. Inóculo de *Agaricus blazei*.



Figura 18. Bandeja plástica com inóculo de *Agaricus blazei* (linhagem ABL 04/49), preparada para a inoculação do composto.

Durante a inoculação, o composto retirado de cada caixa foi transferido parceladamente e manualmente para outras de mesmo modelo do item 5.1.3.3. Cada caixa foi previamente revestida com filme plástico de polipropileno (PP), de 90 micra de espessura (Figura 19) e, a seguir, determinou-se o seu peso. O filme plástico tem a função de manter o composto úmido, evitar-se a entrada de contaminantes, pragas, bem como de manter o teor de gás carbônico elevado com conseqüente melhoria no desenvolvimento do micélio.

Na parte inferior do filme plástico efetuou-se 8 perfurações circulares (2 cm de diâmetro), para se permitir o escoamento do eventual excesso de umidade do composto, oriundo da produção de água pelo *A. blazei* durante a Fase III e também, o escoamento durante as adições de água na camada de cobertura durante os processos de indução de primórdios.

Para a inoculação, adicionou-se manualmente 1,2 g de inóculo de *A. blazei* por kg^{-1} de massa fresca de composto. A Figura 20 apresenta foto de composto inoculado. Dobrou-se a parte superior do filme plástico, fechando-se parcialmente a massa de composto de cada caixa. Em seguida, as caixas foram pesadas para determinação da massa fresca do composto, o qual situou-se entre 13,0 e 13,5 kg por caixa.



Figura 19. Deposição de filme plástico para acondicionamento de composto para a colonização.



Figura 20. Composto inoculado com *Agaricus blazei*.

A Figura 21 apresenta foto do processo de dobramento do filme plástico sobre o composto e a Figura 22 apresenta foto de caixa treliçada com composto, pronta para incubação.



Figura 21. Dobramento de filme plástico com composto inoculado.



Figura 22. Caixa com composto inoculado, preparada para a incubação.

5.1.4.2. Incubação

Após, as caixas foram dispostas novamente, ao acaso e em pilhas de 5 unidades, no interior da mesma câmara climatizada Dalsem.

Foram onze dias de incubação, sob 200 a 300 Lux de iluminação e temperatura de $28 \pm 1^\circ\text{C}$. Durante todo o período de colonização não se controlou a umidade relativa do ar, porém, esta manteve-se abaixo de 60% dentro da câmara.

Utilizou-se as linhagens ABL 99/30 e ABL 04/49 para cada um dos três tipos de composto, isto é, T1, T2 e T3. Foram inoculadas 15 caixas de composto por tratamento, totalizando 90 unidades experimentais.

A Figura 23 apresenta um esquema dos procedimentos adotados durante a Fase III (Colonização do composto).

5.1.5. Camada de cobertura

5.1.5.1. Materiais utilizados na composição da camada de cobertura

Como camada de cobertura utilizou-se uma mistura de solo + carvão + calcário calcítico. O solo foi coletado a 1,5-2 m de profundidade em área da Fazenda Lageado,

com classificação Nitossolo Vermelho distrófico, latossólico A moderado, textura média/argilosa (CARVALHO et al., 2000).

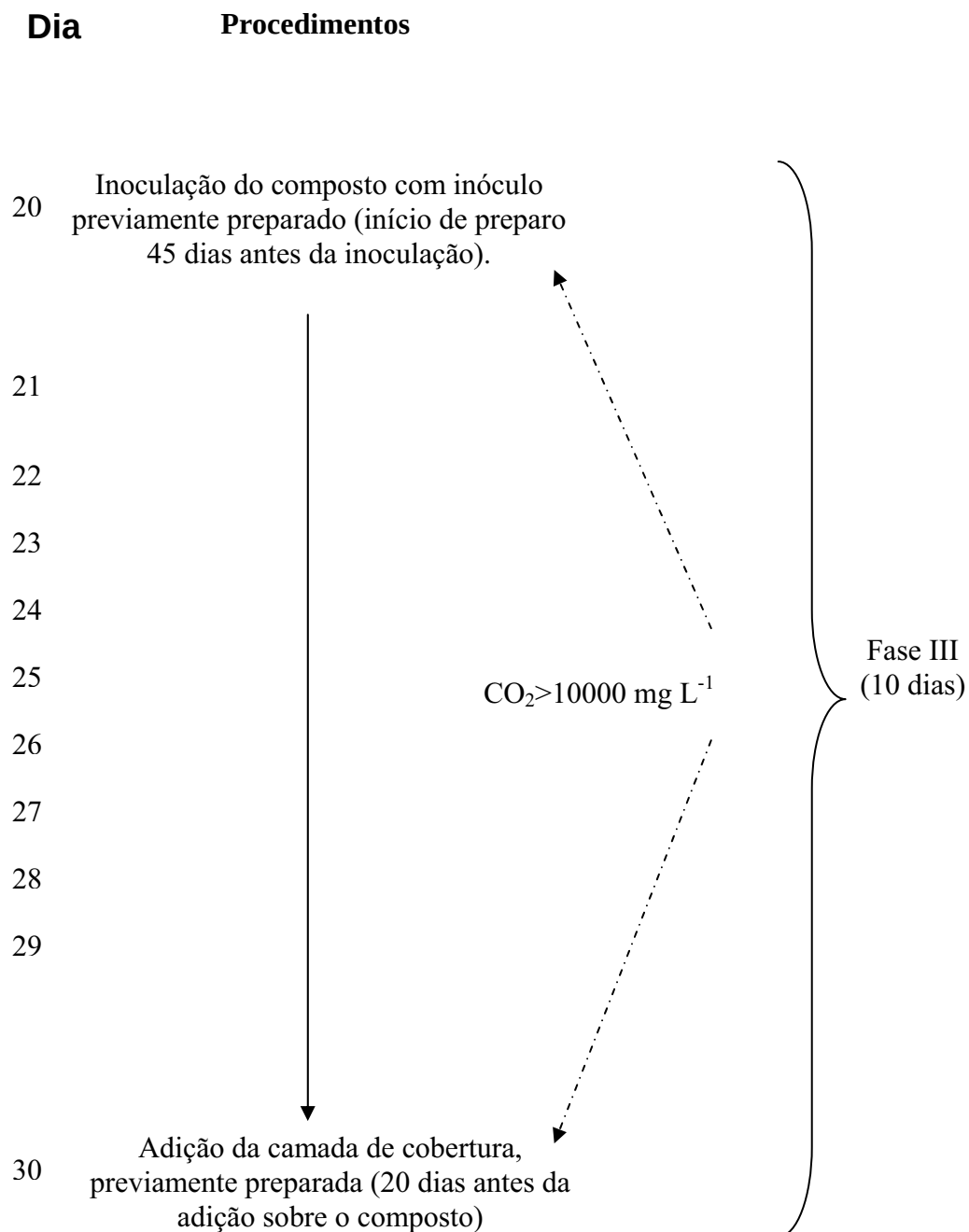


Figura 23. Esquema dos procedimentos da Fase III (Colonização do composto).

O carvão vegetal foi de eucalipto, adquirido de carvoaria da região de Botucatu, em fragmentos menores de 3 cm e conhecido como “restolho”, “fino” ou “moinha”. Peneirou-se em peneira tipo de “arroz”, para a retirada do pó e de fragmentos menores que 1 cm.

O calcário calcítico utilizado foi o mesmo das formulações dos compostos (item 5.1.2.1).

As análises de solo e calcário foram realizadas no Laboratório de Análise de Solo, do Departamento de Recursos Naturais, Ciência do Solo da FCA/UNESP-Botucatu, de acordo com metodologia de Raij et al. (2001).

A Tabela 11 apresenta os resultados da análise química do solo utilizado na camada de cobertura e a Tabela 12 apresenta os resultados de análise do calcário.

Tabela 11. Resultados de análise do solo utilizado na camada de cobertura (Média de duas repetições).

pH	M.O	P	H+Al	K	Ca	Mg	SB	CTC	V
CaCl ₂	g dm ⁻³	mg dm ⁻³	-----	mmol _c dm ⁻³	-----	-----	-----	-----	-----
4,35	5	3,5	17	0,8	2,5	2	5,5	22,5	19

Tabela 12. Resultados de análise do calcário utilizado na camada de cobertura.

CaO	MgO	P10 ⁽¹⁾	P 20 ⁽¹⁾	P50 ⁽¹⁾	F ⁽²⁾	RE ⁽³⁾	PN ⁽⁴⁾	PRNT ⁽⁵⁾
-----g kg ⁻¹ -----	-----	-----	-----	-----	% -----	-----	-----	-----
560	15	0,07	36,24	35,15	28,54	56,88	101,00	57,45

(1) P10, 20 e 50: peneira de 10, 20 e 50 mesh, respectivamente.

(2) F: fundo (partículas menores que 50 mesh).

(3) RE: reatividade.

(4) PN: poder de neutralização.

(5) PRNT: poder relativo de neutralização.

5.1.5.2. Teores de Cd, Cr, Hg, Pb e Ni nos materiais utilizados na camada de cobertura.

Para a determinação dos teores dos elementos metálicos, utilizou-se como extrator o DTPA, em pH 7,3, segundo metodologia de Andrade et al. (2001).

A amostragem, o preparo dos materiais, a leitura dos teores e os níveis de detecção seguem como descrito no item. 5.1.2.3.

A Tabela 13 apresenta os teores de Cd, Cr, Hg, Pb e Ni nos materiais utilizados na camada de cobertura.

Tabela 13. Teores de Cd, Cr, Hg, Pb e Ni nos materiais utilizados na camada de cobertura (Média de três repetições).

Materiais	Cd	Cr	Hg	Pb	Ni
	-----mg kg ⁻¹ -----				
Solo	nd ⁽¹⁾	nd	nd	0,406	0,148
Carvão	nd	nd	nd	nd	nd

(1) nd: não detectável.

5.1.5.3. Preparo da camada de cobertura

5.1.5.3.1. Adição de calcário

Inicialmente, determinou-se a necessidade de calcário para se elevar o pH para 6,5-7,0.

Para tanto, foram coletadas três amostras de aproximadamente 500 g cada, deixou-se secar ao ar por 5 dias em bandejas de plástico e, em seguida, embalou-se em sacos de PEAD, devidamente identificadas. A quantidade de calcário foi determinada pelo método da Saturação de Bases (OSAKI, 1990), segundo a equação:

$$NC = \frac{CTC (V2 - V1)}{10 PRNT}$$

onde:

NC: Necessidade de calcário, ton ha⁻¹;

CTC: Capacidade de troca de cátions;

V2: Saturação de bases desejada, %;

V1: Saturação de bases determinada pela análise, %;

PRNT: Poder relativo de neutralização total do calcário utilizado.

Com a equação acima, determinou-se necessidade de 1,21 toneladas de calcário por hectare, em 20 cm de profundidade, isto é, para 2000 m³ de solo. Deste modo, as quantidades de calcário a serem adicionados em cada m³ do solo foram de 0,726 kg.

Em área coberta e em piso cimentado, adicionou-se 0,726 kg de calcário calcítico por m³ de terra. Homogeneizou-se e umedeceu-se com água por meio de mangueira plástica com regador tipo “chuveirinho” de crivo fino, para 55-65%. A mistura permaneceu no local por 20 dias, fazendo-se 4 reviradas manuais neste período. Na última revirada, adicionou-se 40% de fragmentos de carvão à mistura (v/v).

A Figura 24 apresenta foto da camada de cobertura adicionada de calcário e carvão.

5.1.5.3.2. Desinfestação

Após, a mistura foi acondicionada em caixas plásticas de PP (27 cm de largura x 41 cm de comprimento e 32 cm de altura) e transferiu-se para uma câmara climatizada Dalsem, posicionando-se em pilhas de 7 unidades cada.

Procedeu-se à pasteurização a 60-62°C por 8 horas, controlando-se a temperatura pela média de três sensores inseridos no centro das caixas com camada de cobertura. Após a pasteurização, reduziu-se a temperatura da camada de cobertura para 25-28°C.

5.1.5.4. Cobertura dos compostos

Procedeu-se à cobertura dos compostos em área coberta e piso cimentado. Para se atingir um espessura de 4-4,5 cm, o volume de camada de cobertura calculado foi de 11,79 L. Porém, como é comum a perda de pequenas porções de camada entre o composto e o filme plástico de forração, utilizou-se um volume de 15 L da mistura para cada caixa como procedimento corretivo. Efetuou-se a cobertura manualmente, utilizando-se de recipientes plásticos.

A Figura 25 apresenta a camada de cobertura a ser adicionada sobre o composto.



Figura 24. Camada de cobertura.



Figura 25. Camada de cobertura a ser adicionada sobre o composto.

5.1.5.5. Colonização da camada de cobertura

Após a cobertura do composto, as caixas foram dispostas em prateleiras de ferro com níveis de altura do piso de 0,15 m, 0,85 m e 1,60 m. A distribuição foi inteiramente ao acaso. As prateleiras foram transferidas novamente para a câmara climatizada Dalsem (Figura 26), permanecendo a 28°C, até a colonização de aproximadamente 70% da superfície da camada de cobertura, isto é, por 11 dias. A coleta de dados e controle de temperatura foi da mesma maneira como citado no item 5.1.3.3.

A Figura 27 apresenta foto de camada de cobertura ao final da fase de colonização do *A. blazei*.



Figura 26. Entrada das estruturas de ferro com caixas de composto na câmara de incubação.



Figura 27. Camada de cobertura ao final da fase de colonização.

A Figura 28 apresenta o esquema da colonização da camada de cobertura pelo micélio de *A. blazei*.

5.1.6. Indução de primórdios e colheita de basidiomas

5.1.6.1. Indução de primórdios

Inicialmente, removeu-se, com o uso de uma tesoura, o filme plástico da parte superior das caixas, deixando-se uma borda de 1 cm acima do nível da camada de cobertura. Em seguida, regou-se com aproximadamente 300 mL de água por caixa, fazendo-se o uso de uma mangueira com “chuveirinho” de crivo fino. Após, os compostos permaneceram a 28 °C por mais 4 dias e a umidade relativa do ar em 90%. O início da redução de temperatura do composto deu-se quando se constatou a presença de primórdios próximo à superfície da camada de cobertura e, desta forma, a redução foi de 2°C a cada 24 horas, até se atingir 20°C e permanecendo assim por 2 dias (adaptado de KOPYTOWSKI FILHO, 2002). Neste período, manteve-se programado o teor de CO₂ na câmara entre 800 a 1100 mg kg⁻¹ de ar e umidade relativa do ar entre 85 e 92%.

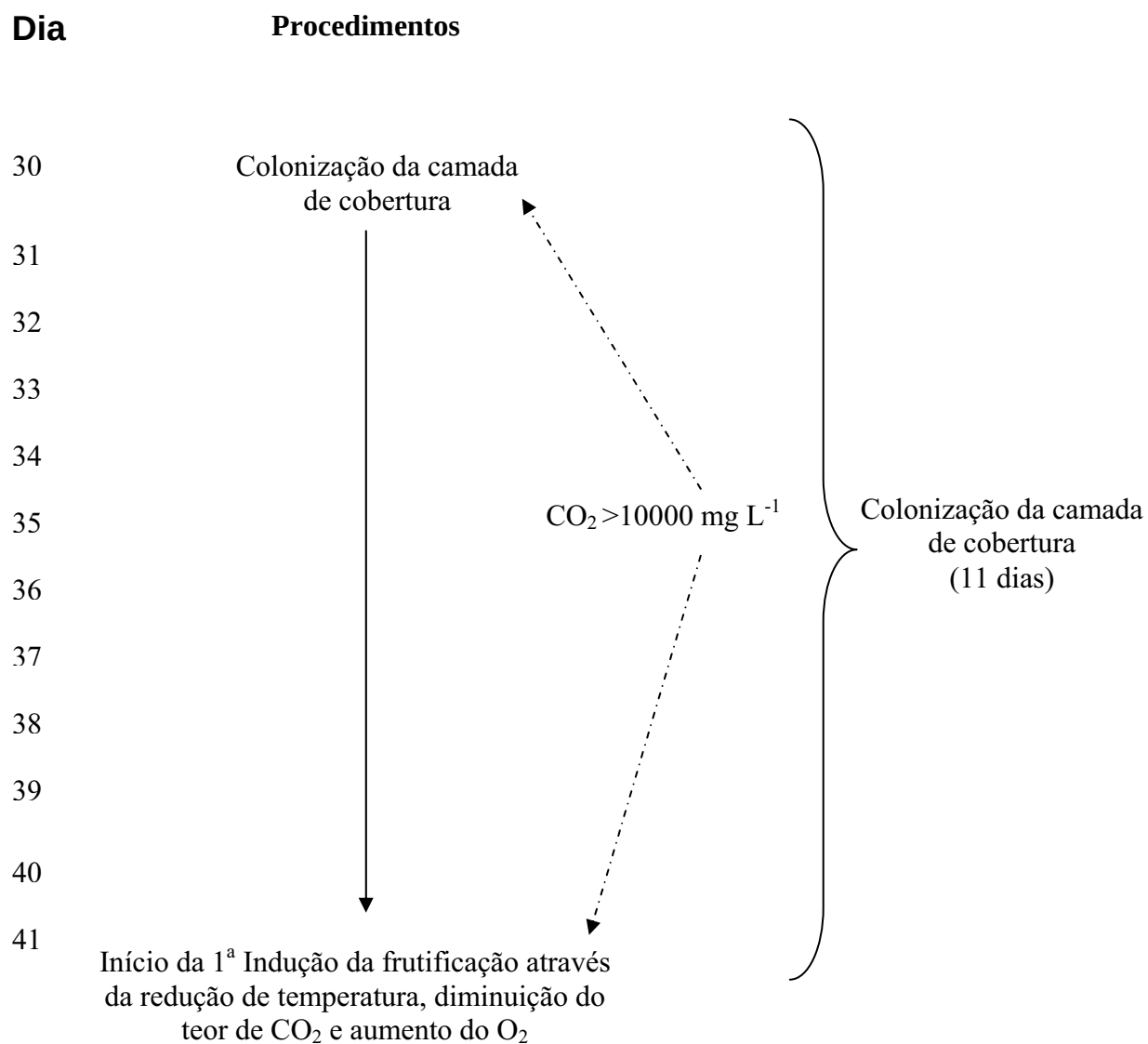


Figura 28. Esquema de colonização da camada de cobertura pelo micélio do *Agaricus blazei*.

A seguir, iniciou-se a elevação da temperatura do composto, 2 °C a cada 24 horas, atingindo-se 28 °C em 4 dias e permanecendo assim por 24 horas. A temperatura do composto foi novamente reduzida a 26 °C para se evitar o desenvolvimento rápido do basidioma, o que resultaria em massa menor e abertura precoce do píleo.

Para todas as induções e fluxos de colheita estabeleceu-se os mesmos padrões de temperatura dos compostos e teores de CO₂. Do início de uma indução a outra, estabeleceu-se intervalos de 18 a 20 dias. Os períodos de colheita foram de 3 e 6 dias. Programou-se 4 fluxos de colheita e um ciclo total de 90 dias, à partir da cobertura do composto.

A Figura 29 apresenta o esquema dos procedimentos da 1ª indução e fluxo de colheita correspondente.

5.1.6.2. Colheita

Previamente à colheita, identificou-se embalagens de PEAD referentes à cada caixa de composto (repetição) na qual depositou-se os basidiomas colhidos de cada uma.

Realizou-se a colheita manualmente, com uma leve torção na base do estípete, ainda com o píleo fechado, isto é, sem o rompimento do véu (Figuras 30 e 31).

5.1.7. Processamento dos basidiomas

Após a colheita, fez-se uma pré-limpeza dos basidiomas através de raspagem com uma faca para a retirada de resíduos da base do estípete. Em seguida, os basidiomas foram agrupados de acordo com os tratamentos, em recipientes plásticos, efetuando-se a lavagem dos mesmos por meio de jatos d'água de alta pressão com auxílio de esponja plástica de lavagem, do tipo “doméstica”.

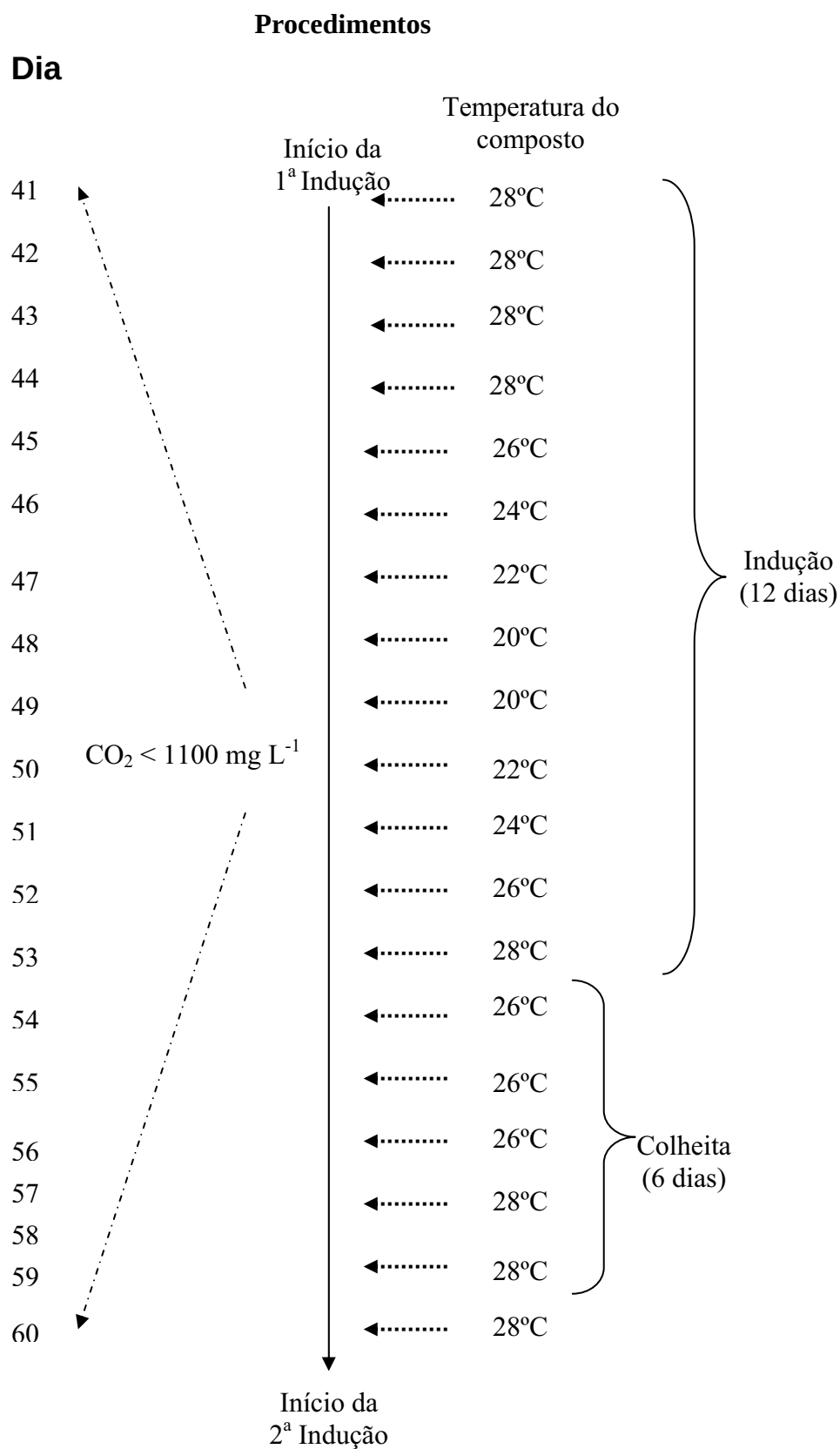


Figura 29. Esquema dos procedimentos da primeira indução e colheita.



Figura 30. Basidiomas de *Agaricus blazei* em desenvolvimento.



Figura 31. Basidiomas de *Agaricus blazei* colhidos.

5.1.7.1. Desidratação dos basidiomas

Os basidiomas foram seccionados ao meio, no sentido longitudinal, dispostos em bandejas de estrutura de madeira e tela de plástico, e secos em desidratadores com fonte elétrica de aquecimento e ventilação forçada. O processo de desidratação ocorreu à temperaturas de 50-60 °C por aproximadamente 48 horas. Os basidiomas foram seccionados no sentido transversal (aproximadamente a 0,2 cm abaixo da borda do píleo), para a secagem do píleo e do estípite separadamente.

Após a secagem, acondicionaram-se as partes dos basidiomas em embalagens plásticas de PP transparentes, devidamente identificadas em função do tratamento e fluxo de colheita.

5.1.7.2. Moagem de basidiomas

Procedeu-se à moagem das partes dos basidioma em moinho de facas, peneira 30 mesh. Após a moagem, acondicionou-se as amostras em frascos de vidro, fechados com tampa de metal.

5.1.8. PARÂMETROS AVALIADOS

5.1.8.1. Umidade do composto

A umidade do composto foi determinada ao final das Fases I, II e III. Para cada tratamento, foram coletadas 3 amostras compostas (5 sub-amostras cada uma) de aproximadamente 1 kg cada.

Homogeneizou-se cada amostra composta, retirou-se porções das mesmas e depositou-se em placas de Petri (15 cm) devidamente taradas e identificadas (Figura 35), determinando-se assim a massa fresca dos compostos.

Após, as placas foram transferidas para estufa a 62°C, com ventilação forçada, até peso constante. Em seguida, as placas foram pesadas para determinação das massas secas.

Determinou-se a umidade através da equação:

$$U = \left(\frac{M_{fc} - M_{sc}}{M_{fc}} \right) 100$$

onde:

U : Umidade do composto, %;

M_{fc} : Massa fresca do composto, g

M_{sc} : Massa seca do composto, g

5.1.8.2. Massa fresca total de composto

5.1.8.2.1. No início da Fase I

O massa fresca total de cada leira de composto no início da Fase I foi estimado com base na umidade dos ingredientes. Determinou-se a quantidade de água a ser

adicionada para cada ingrediente para se atingir umidade de 75% e calculou-se massa fresca total de cada leira de compostagem no início da Fase I.

5.1.8.2.2. Ao final das Fases I, II e III

Determinou-se a massa fresca total dos três compostos T1, T2 e T3 ao final das Fases I e II, pesando-se toda a massa fresca de composto de cada leira.

Ao final da Fase III, pesou-se 63 caixas treliçadas de cada tratamento e calculou-se a perda média de massa fresca de composto em relação ao final da Fase II. Deste modo, estimou-se o massa seca total de cada tratamento em função da massa seca inicial do composto ao final da Fase II.

Determinou-se a massa fresca de composto ao final da Fase III através das seguintes equações:

(1)

$$M_{fcFIII} = P_{fcFII} \left(\frac{100 - P_{mFIII}}{100} \right)$$

onde:

M_{fcFIII} : Massa fresca total do composto ao final da Fase III, kg;

M_{fcFII} : Massa fresca total do composto ao final da Fase II, kg;

P_{mFIII} : Perda média de massa fresca do composto ao final da Fase III, %.

(2)

$$P_{mcFIII} = \left(\frac{M_{fcnFII} - M_{fcnFIII}}{M_{fcnFII}} \right) 100$$

onde:

P_{mcFIII} : Perda média de massa fresca de composto de 63 caixas ao final da Fase III, %;

$M_{fcnFIII}$: Massa fresca de composto de 63 caixas ao final da Fase III, kg;

M_{fcnFII} : Massa média de composto de 63 caixas ao final da Fase II, kg.

5.1.8.3. Densidade aparente do composto ao final da Fase I

Determinou-se a densidade aparente do composto através da seguinte equação:

$$D_{cFI} = \frac{M_{fcFI}}{V}$$

onde:

D_{cFI} : Densidade do composto ao final da Fase I, kg m⁻³;

M_{fcFI} : Massa fresca do composto ao final da Fase I, kg;

V: Volume da caixa, m³.

5.1.8.4. Teores de Cd, Cr, Hg, Pb e Ni,

Determinou-se teores de Cd, Cr, Hg, Pb e Ni, nos compostos ao final da Fase II, e, nos basidiomas, foram determinados no 1º e 2º fluxo de colheita.

Os ingredientes de formulação dos tratamentos T1, T2 e T3 foram amostrados no início da montagem das leiras de compostagem e os compostos propriamente ditos, ao final da compostagem Fase II. Com relação ao preparo dos ingredientes dos compostos e dos compostos propriamente ditos, os procedimentos foram semelhantes aos do item 5.1.2.2.

Com relação aos materiais da camada de cobertura e à camada de cobertura propriamente dita, as amostragens foram feitas no momento da cobertura dos compostos e seguiram os procedimentos e métodos descritos no item 5.1.5.2.

Para a análise de basidiomas, separou-se amostras do píleo e do estípite das linhagens ABL 99/30 e ABL 04/49 produzidos em cada composto (T1, T2 e T3), no primeiro e segundo fluxos de colheita. As amostras foram preparadas de acordo com o item 5.1.7.1 e 5.1.7.2.

5.1.8.5. Fator de acumulação

Determinou-se o fator de acumulação do Cd, Cr, Hg, Pb e Zn, nos basidiomas (KALAC et al., 2004), em função da parte do basidioma (estípite ou píleo), tipo de composto (T1, T2 e T3) e fluxo de colheita, através da seguinte equação:

$$FA = \frac{Teb}{Tec}$$

onde:

FA: Fator de acumulação;

Teb: Teor do elemento químico no basidioma, mg kg⁻¹;

Tec: Teor do elemento químico no composto, mg kg⁻¹.

5.1.8.6. Massa média dos basidiomas

Determinou-se diariamente o massa fresca e o número de basidiomas de cada repetição em balança eletrônica (0,01g de precisão).

A massa média dos basidiomas foi determinado pela relação da massa fresca e o número de basidiomas colhidos, conforme a seguinte equação:

$$Mfmb = \frac{Mfb}{N}$$

onde:

Mfmb: Massa fresca média dos basidiomas, g;

Mfb: Massa fresca dos basidiomas colhidos, g;

N: Número de basidiomas colhidos.

5.1.8.7. Produtividade

Determinou-se a Produtividade (P , %) ao final do ciclo cultivo, através da seguinte equação.

$$P = \left(\frac{Mfb}{Mfc} \right) 100$$

onde:

P : Produtividade, %;

Mfb : Massa fresca dos basidiomas, g;

Mfc : Massa fresca do composto ao final da Fase II, g.

5.1.8.8. Eficiência Biológica

Determinou-se a Eficiência Biológica (EB , %) ao final do ciclo de colheita através das seguinte equação:

$$EB = \left(\frac{Pfb}{Psc} \right) 100$$

onde:

EB : Eficiência biológica, %;

Mfb : Massa fresca dos basidiomas, g;

Msc : Massa seca de composto ao final da Fase II, g.

5.1.8.9. Delineamento experimental

Os dados foram submetidos à análise de variância para experimentos com delineamento fatorial 3×2 e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey (5%) (SNEDECOR; COCHRAN, 1972).

Para tanto, utilizou-se o programa SISVAR 4.2 desenvolvido pelo Departamento de Ciências Exatas, da Universidade Federal de Lavras, MG (UFLA) e, o SAS versão 8.02, do SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA.

5.2 Experimento 2: Efeito da suplementação nitrogenada (farelo de soja e Champ Food®) no composto e época de adição (inoculação e pós-colonização) na produtividade de *Agaricus blazei*

Foi avaliado o efeito de dois tipos de suplementação nitrogenada adicionados na inoculação e na pós-colonização do composto, sobre a produtividade e peso médio de basidiomas de *A. blazei*.

O experimento foi desenvolvido com 6 tratamentos e 10 repetições, totalizando 60 unidades experimentais. Cada unidade experimental equivaleu a 12 kg de composto fresco.

A maior parte da metodologia foi semelhante à do Experimento 1. Deste modo, serão descritos a seguir, apenas os procedimentos diferentes adotadas neste Experimento 2.

5.2.1 *Agaricus blazei*

Utilizou-se a linhagem ABL 04/44 de *A. blazei*, procedente de Mogi das Cruzes (SP), reisolada de material coletado em área de cultivo em São José do Rio Preto (SP), conservada no banco de matrizes do Módulo de Cogumelos, Departamento de Produção Vegetal, Defesa Fitossanitária – FCA/UNESP.

5.2.2. Composto

Para a produção de composto, os métodos e ingredientes convencionais, foram os mesmos descritos no item 5.1.2, com algumas alterações na formulação e no processo de compostagem, que serão apresentados a seguir.

5.2.2.1. Formulação do composto

A Tabela 14 apresenta a formulação do composto.

Tabela 14. Formulação do composto.

Ingredientes	Massa, kg	
	Seca	Fresca
Bagaço de Cana-de-açúcar ⁽¹⁾	240	600
Palha de capim coast-cross ⁽¹⁾	230	250
Farelo de soja ⁽¹⁾	18	20
Uréia	3	3
Gesso ⁽²⁾	10	10
Calcário calcítico ⁽²⁾	10	10
Massa total	511	893
C inicial no composto, g kg ⁻¹	452,67	---
N inicial no composto, g kg ⁻¹	11,9	---
C/N inicial no composto	37/1	---

(1) Ingredientes desidratados a 62°C.

(2).O gesso e o calcário calcítico foram adicionados na formulação em 2% e 4% respectivamente, a partir da soma da massa seca dos ingredientes lignocelulósicos e suplementos nitrogenados.

5.2.2.2. Processo de Compostagem

5.2.2.2.1. Pré-umedecimento e compostagem Fase I

O pré-umedecimento da palha e a compostagem seguiram de acordo com os procedimentos descritos no item 5.1.3.1 e 5.1.3.2, respectivamente e, a Fase I teve duração de 9 dias.

A Figura 32 apresenta um esquema dos procedimentos da Fase I de compostagem.

5.2.2.2.2. Compostagem Fase II

A compostagem Fase II deu-se nas mesmas condições descritas no item 5.1.3.3, mas, com maior duração, isto é, um total de 12 dias.

5.2.3. Fase III

Os seis tratamentos foram definidos em função do tipo de suplementação e da época de adição deste, conforme Tabela 15.

Tabela 15. Descrição dos tratamentos.

Tratamento	Descrição
CI	Controle, sem suplementação, com desfragmentação do bloco de composto na inoculação do mesmo.
FSI	Suplementação ⁽¹⁾ do composto com farelo de soja na inoculação do mesmo.
CFI	Suplementação ⁽¹⁾ do composto com Champ food [®] na inoculação do mesmo.
CC	Controle, sem suplementação, com desfragmentação do bloco de composto após a colonização do mesmo.
FSC	Suplementação ⁽¹⁾ do composto com farelo de soja após a colonização do mesmo.
CFC	Suplementação ⁽¹⁾ do composto com Champ food [®] na após a colonização do mesmo

(1) Suplementação a 1% (base fresca).

Após a saída do composto da câmara de pasteurização e condicionamento, retirou-se o composto de cada uma das caixas e, em separado, misturou-se em betoneira (3 minutos) com a adição na concentração de 1% da massa fresca do composto com os suplementos, ou seja, 120 a 125 gramas de farelo de soja ou Champ food[®], para cada caixa com 12 a 12,5 kg de composto, formando-se assim os tratamentos FSI e CFI. respectivamente.

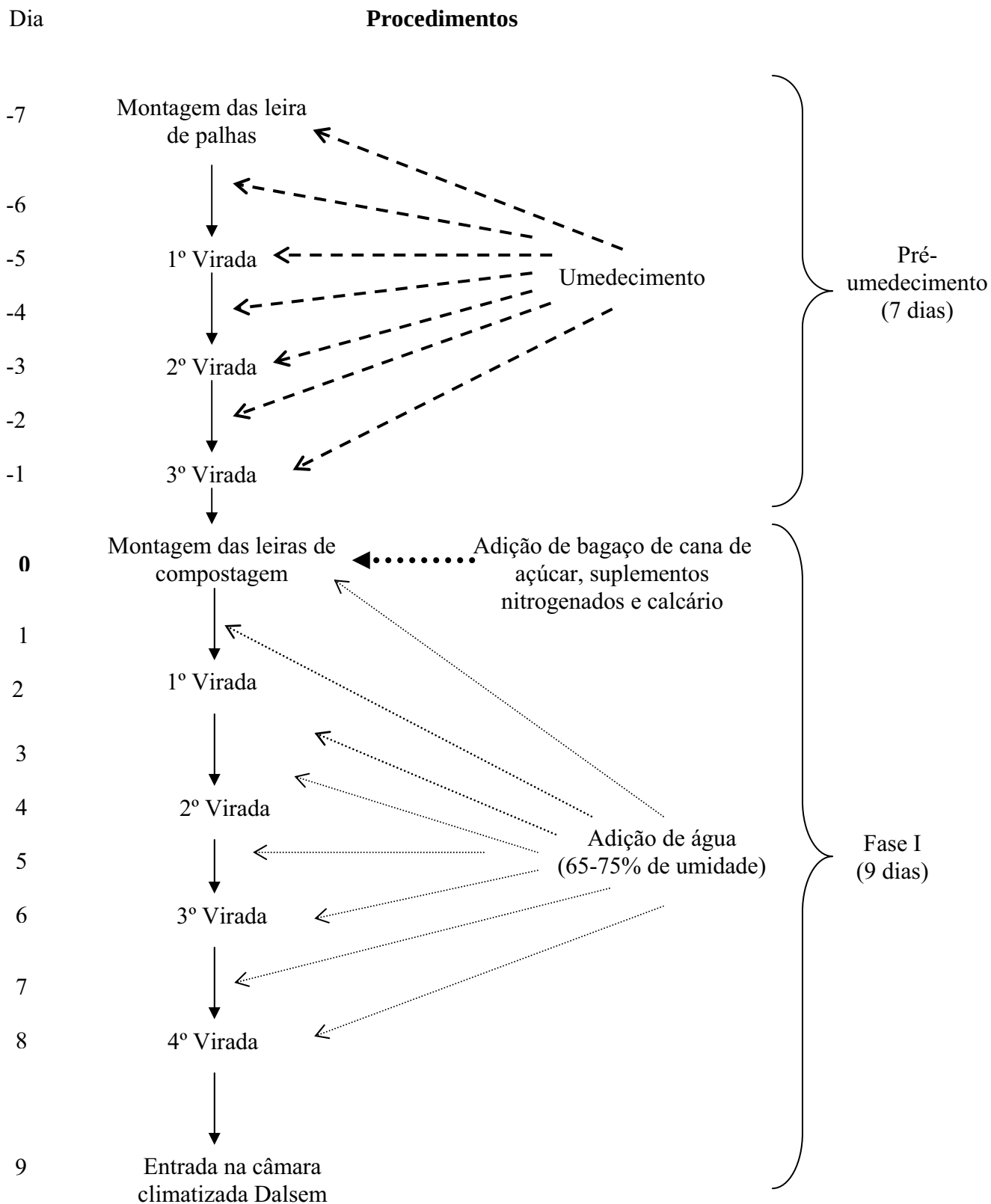


Figura 32. Esquema dos procedimentos da compostagem Fase I.

Para o tratamento CI, a massa de composto de cada repetição foi apenas misturada em betoneira, por 3 minutos. Após, retirou-se e acondicionou-se em caixas com proteção de filme plástico.

Para cada tratamento, inoculou-se 10 repetições. Caixas adicionais, sem suplementação, foram inoculadas e destinadas ao preparo dos demais tratamentos, ou seja, CC, FSC, CFC.

A colonização deu-se por 12 dias a 28 °C, em câmara climatizada.

Após, preparou-se os tratamentos CC, FSC, CFC, segundo os procedimentos adotados no preparo dos tratamentos CI, FSI e CFI, respectivamente.

5.2.4. Camada de cobertura

Foi utilizada a turfa marca Euromix (mistura de 80% de turfa negra – “black peat” e 20 % de turfa marrom – “brown peat”) como camada de cobertura, pH 7,2-7,5, produzido pela empresa BVBV (Holanda). A adição desta sobre os compostos seguiu os mesmos procedimentos descritos no item 5.1.5.4.

Após a cobertura dos compostos, estes foram transferidos para prateleiras de ferro, inteiramente casualizados, para a colonização da camada de cobertura a 28°C, em câmara climatizada Dalsem.

5.2.5. Indução de primórdios

Após 12 dias de colonização da camada de cobertura, iniciou-se o processo de indução de primórdios conforme descrito no item 5.1.6.1. Neste Experimento 2, a aeração e a umidade relativa do ar seguiram os mesmos padrões do Experimento 1. Porém, os períodos de redução e de elevação da temperatura dos compostos sofreram alterações, ou seja, adotou-se um processo denominado de “indução lenta”, no qual a temperatura é reduzida de 28°C a 20°C, 2°C ao dia. Ao se atingir 20°C, a temperatura permanece por 24 horas e iniciando-se a elevação de 2°C por dia, até atingir-se 28°C, o qual permanece por 24 horas e então é reduzido a 26°C, mantido assim até o final do fluxo de colheita.

A Figura 33 apresenta um esquema do processo de “Indução lenta”. adotado durante a indução e colheita de *A. blazei*, em câmara climatizada.

O primeiro fluxo de colheita deu-se aos 23 dias após a cobertura do composto. Os períodos de colheita de cada fluxo foram de 3 a 4 dias, com intervalos entre fluxos de 16 a 20 dias. Determinou-se 5 fluxos de colheita, totalizando 100 dias de ciclo total, após a cobertura do composto.

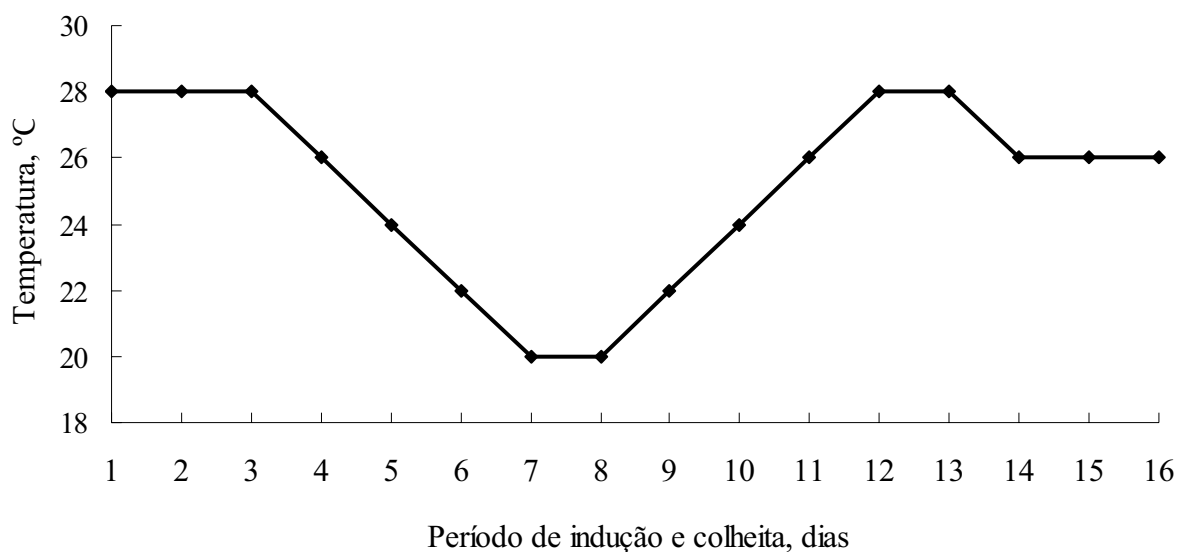


Figura 33. Esquema do processo de “Indução lenta” e colheita de *Agaricus blazei*, em câmara climatizada Dalsem.

5.2.6. Parâmetros avaliados

Determinou-se o peso médio dos basidiomas e a produtividade, conforme os itens 5.1.8.6 e 5.1.8.7.

5.3. Experimento 3: Produtividade e teores de elementos metálicos nos basidiomas de *Agaricus blazei* cultivados em três tipos de compostos e em dois ambientes diferentes

Foi avaliado a produtividade e os teores de elementos metálicos em basidiomas de *A. blazei*.

Conduziu-se o experimento entre os meses de junho a dezembro de 2005, em câmara climatizada Dalsem Mushroom (item 5.1.3.3) e câmara parcialmente controlada (estufa modelo comercial).

Considerou-se como estufa “modelo comercial”, uma estrutura com características (material de cobertura, área, altura e sistema de abertura de fechamento de cortinas) similares às de comumente utilizadas pelos produtores de *A. blazei* no Estado de São Paulo.

A estrutura desta estufa foi confeccionada em armação de ferro, dimensões de 10 m de largura x 20 m de comprimento x 3 m de altura, com cobertura de plástico leitoso (150 micra de espessura) (semelhante ao utilizado no item 5.3.5.2), cortinas laterais de filme plástico leitoso e sombrite 70% na parte interna.

As laterais da cumieira permaneceram protegidas apenas com sombrite 70%. Esta estufa possuía uma divisão central de filme plástico e cada ambiente com 100 m². Para este Experimento 3, utilizou-se apenas um dos ambientes.

Os compostos utilizados foram: orgânico certificado (T1), semi-sintético (T2) e sintético (T3), formulados de acordo com o item 5.1.2.4 do Experimento 1.

Na formulação do composto T1 (composto orgânico), utilizou-se palha de capim coast-cross convencional em substituição à palha de capim braquiária orgânica, porém, de acordo com as diretrizes de produção de cogumelos com certificação orgânica do IBD (2001).

Em cada ambiente de cultivo, foram destinadas 10 repetições de cada tratamento. Cada repetição equivaleu a 10-10,5 kg de composto fresco inoculado com *A. blazei*.

Os procedimentos foram, de um modo geral, semelhantes aos do Experimento 1, e, deste modo, serão expostos apenas as alterações efetuadas neste Experimento 3.

5.3.1. *Agaricus blazei*

Neste experimento 3, utilizou-se a linhagem ABL 99/30 de *A. blazei* e todos os procedimentos de produção de matrizes seguiram de acordo com o item 5.1.1.

5.3.2. Composto

A Tabela 16 apresenta as formulações dos compostos de cada tratamento, com as quantidades (base seca) e as porcentagens dos ingredientes adicionados às leiras.

5.3.2.1. Processo de compostagem

5.3.2.1.1. Fase I

O pré-umedecimento das palhas seguiu de acordo com o item 5.1.3.1.

A adição de ingredientes foi realizada durante a montagem das leiras. Procedeu-se 4 reviradas dos compostos aos 3, 6, 9, 12 dias de compostagem. Na última revirada, isto é, aos 12 dias de compostagem Fase I, adicionou-se o gesso às leiras.

No dia 13º dia, acondicionou-se os compostos em caixas treliçadas, de acordo com o item 5.1.3.2.

Tabela 16. Formulação dos compostos T1, T2 e T3.

Ingredientes	Compostos					
	T1	%	T2	%	T3	%
Bagacho de cana-de-açúcar convencional, kg ⁽¹⁾	---	---	660,00	55,96	660,00	59,59
Bagacho de cana-de-açúcar orgânico, kg ⁽¹⁾	572,00	53,96	---	---	---	---
Palha de capim coast-cross, kg ⁽¹⁾	315,00	29,71	315,00	26,70	315,00	28,44
Farelo de soja, kg ⁽¹⁾	----	----	117,00	9,92	40,50	3,65
Farelo de soja orgânico, kg ⁽¹⁾	94,50	8,91				
Uréia, kg	---	---	---	---	10,00	0,90
Gesso, kg ⁽²⁾	39,26	3,7	43,68	3,70	41,02	3,65
Calcário calcítico, kg ⁽²⁾	39,26	3,7	43,68	3,70	41,02	3,65
Massa seca total, kg	1060,02	100	1179,36	100	1107,54	100
N inicial no composto, g kg ⁻¹	13,10		13,1		13,2	
C/N inicial no composto	37/1		37/1		37/1	

(1) Ingredientes desidratados a 62°C.

(2) O gesso e o calcário calcítico foram adicionados a 4 % em relação ao massa seca dos materiais lignocelulósicos e suplementos nitrogenados.

5.3.2.1.2. Fase II (Pasteurização e Condicionamento)

Programou-se a Fase II de acordo com o item 5.1.3.3 do Experimento 1. Realizou-se o Condicionamento por 12 dias.

5.3.3 Fase III

Realizaram-se os mesmos procedimentos do item 5.1.4.1. Neste Experimento 3, utilizaram-se caixas de polietileno (PE) (43 cm de comprimento x 35 cm de largura x 33 cm de altura), forradas com filme plástico de polietileno de 110 micra de

espessura. O massa seca do composto por caixa variou de 10 a 10,5 kg. A fase de incubação deu-se por 15 dias, em câmara climatizada Dalsem, em conformidade com o item 5.1.4.2.

5.3.4. Camada de cobertura

Os procedimentos e procedência dos materiais no preparo da camada de cobertura foram idênticos ao item 5.1.5. Adicionou-se 10 L da camada de cobertura (solo + carvão) ao composto. A colonização da camada de cobertura deu-se por 17 dias.

5.3.5. Indução de primórdios

Após a colonização da camada de cobertura, transferiu-se dez caixas de cada tratamento T1, T2 e T3 para cada um dos ambientes de cultivo, isto é, para a câmara climatizada e para a estufa modelo comercial.

Inicialmente, removeu-se o filme plástico e procedeu-se à indução de primórdios de acordo com o item 5.1.6.1.

5.3.5.1. Câmara climatizada Dalsem Mushrooms

Após a remoção do filme plástico, umedeceu-se a camada de cobertura com aproximadamente 250 mL de água por caixa. Após, manteve-se a temperatura dos compostos a 28 °C por 3 dias. Em seguida, iniciou-se o processo de “Indução rápida”, isto é, reduziu-se a temperatura para 20 °C e manteve-se por 3 dias. A seguir, elevou-se a temperatura dos compostos para 28 °C por 2 dias, reduzindo-se em seguida a 26 °C, até o final do período de colheita.

A Figura 34 apresenta foto de vista externa da câmara climatizada Dalsem Mushrooms.



Figura 34. Foto de câmara climatizada Dalsem Mushrooms.

A Figura 35 apresenta o esquema de manejo da temperatura durante o processo de “indução rápida” e colheita de *Agaricus blazei*, em câmara climatizada Dalsem.

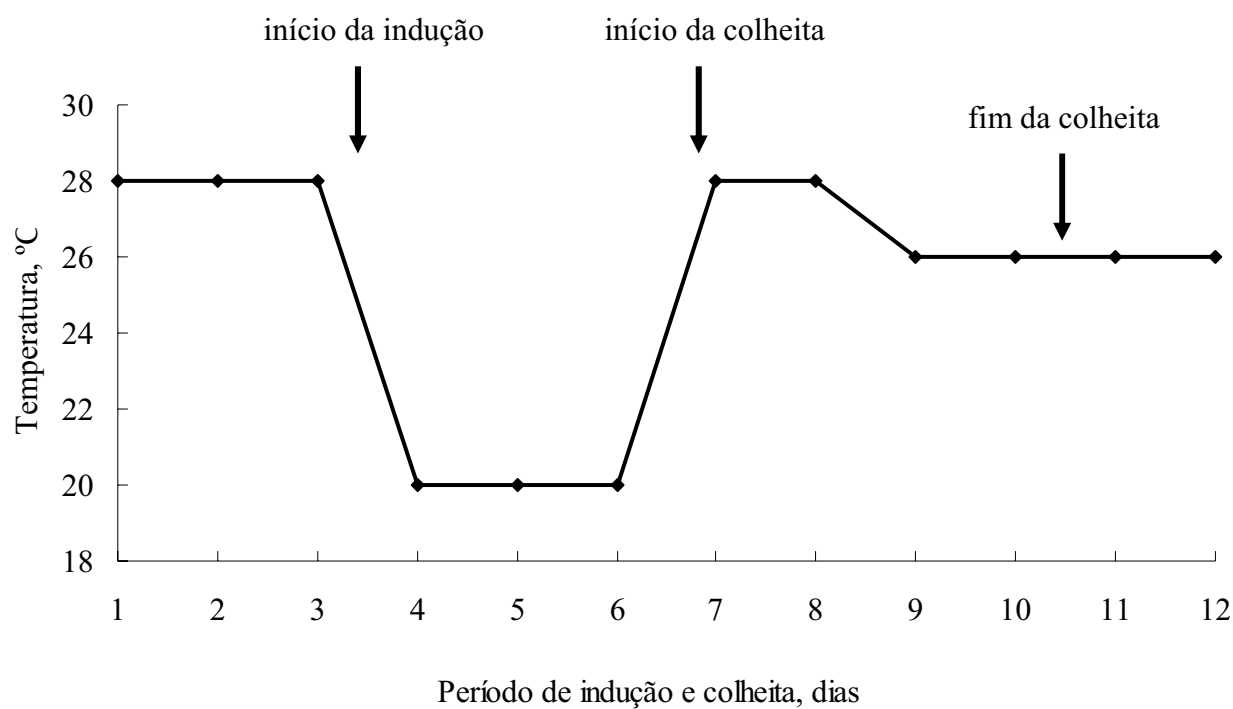


Figura 35. Esquema do manejo da temperatura durante o processo de “indução rápida” e colheita de *Agaricus blazei*, em câmara climatizada Dalsem Mushrooms.

O teor de CO₂ e a umidade relativa do ar foram manejados de acordo como descrito no item 5.1.6.1.

Procedeu-se à irrigação para umedecimento da camada de cobertura a cada 2-6 dias, adicionando-se aproximadamente 200 mL de água em cada caixa.

Para se evitar má formação dos basidiomas (estípete globoso e mais largo que o píleo no momento da colheita) e a fixação frágil destes na camada de cobertura, evitou-se a irrigação na camada de cobertura no início da formação de primórdios (aproximadamente até 1 cm de altura).

5.3.5.2. Ambiente parcialmente climatizado (Estufa modelo comercial)

A Figura 36 apresenta foto da estufa modelo comercial utilizada no experimento.



Figura 36. Foto de estufa de cultivo modelo comercial.

O sistema de irrigação por aspersão foi acionado manualmente quando a umidade relativa do ar reduzia-se a menos de 70%.

Para o processo de indução, inicialmente abriram-se as cortinas e adicionou-se 200 mL de água em cada caixa, por meio de mangueira de crivo fino. A seguir, para manutenção da umidade da camada de cobertura (55-65%) procedeu-se irrigações com a mangueira a cada 2 ou 4 dias.

A temperatura desta estufa manteve-se em aproximadamente 2°C abaixo da temperatura da temperatura ambiental externa, durante aproximadamente 8 horas diárias, mantendo-se de 2 a 6°C mais elevada no restante do período.

5.3.6. Colheita e processamento dos basidiomas

O método de colheita foi semelhante ao utilizado no Experimento 1 (5.1.6.2). Após a pré-limpeza e lavagem, seccionou-se os basidiomas ao meio e longitudinalmente (sem separação de píleo e estípete). A seguir, estes foram desidratados, embalados em sacos de PP e devidamente identificados para posterior análise química.

5.3.7. Teores de elementos metálicos dos ingredientes dos compostos e da camada de cobertura

O teores de Cd, Cr, Hg, Pb e Ni nos ingredientes dos compostos, na água de abastecimento público e nos materiais da camada de cobertura estão apresentados nas Tabelas 8 e 13, dos itens 5.1.2.3 e 5.1.5.2, respectivamente.

A Tabela 17, a seguir, apresenta os teores de Zn, Cu, Ca, Na, Mg e Mn nos ingredientes dos compostos T1, T2 e T3, na água de abastecimento público e nos materiais da camada de cobertura.

Tabela 17. Teores de Zn, Cu e As nos ingredientes dos compostos T1, T2 e T3, água de abastecimento público e nos materiais da camada de cobertura (Média de três repetições).

Ingredientes	Zn	Cu	As
	-----mg kg ⁻¹ -----		
Bagaço de cana-de-açúcar convencional	0,042	13,980	nd
Bagaço de cana-de-açúcar orgânico	24,580	12,850	nd
Palha de capim Coast-Cross	70,223	22,263	nd
Farelo de soja convencional	196,666	34,776	nd
Farelo de soja orgânico	143,900	36,576	nd
Gesso	32,663	14,500	162,78
Calcário calcítico	179,707	86,344	nd
Uréia	0,020	0	nd
Solo	2,043	0,326	nd
Carvão	nd ⁽¹⁾	439,53	554,58
Água	nd	nd	0,01

(1) nd: não detectável.

5.3.8. Parâmetros avaliados

Avaliou-se os teores de elementos metálicos (Cd, Cr, Cu, Hg, Pb, Zn e Ni) e de Arsênio (As) nos basidiomas inteiros, a produtividade e a eficiência biológica dos compostos T1, T2 e T3.

Para a determinação dos elementos citados, utilizou-se amostra composta de basidiomas produzidos nos vários fluxos de colheita, por cada tratamento

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Experimento 1

6.1.1. Umidade e densidade do composto

A Tabela 18 apresenta a umidade dos compostos ao final das Fases I e II de compostagem.

Tabela 18. Umidade dos compostos ao final das Fases I e II de compostagem (Média de três repetições).

Compostos ⁽¹⁾	Fase I	Fase II
	Umidade, %	
T1	73,66A ⁽²⁾	67,29B
T2	72,44A	77,01A
T3	75,55A	74,67A
CV (%)	3,22	1,83

(1) Compostos: T1 (orgânico), T2 (semi-sintético) e T3 (sintético).

(2) Para cada coluna, médias seguidas por letras iguais não diferem entre si (Tukey, 5%).

Pela Tabela 18, verifica-se, neste Experimento 1, que a utilização de ingredientes diversos, ou seja, as palhas e o bagaço de cana-de-açúcar com tamanho de partículas e texturas diferentes, bem como o tempo de duração da Fase I, de 10 dias, não afetaram a umidade dos compostos ao final desta fase. Possivelmente, o processo de Pré-umedecimento das palhas, bem como a homogeneização adequada dos compostos nas reviradas, tenham contribuído para a similaridade da umidade dos compostos. Ademais, estes valores de umidade dos compostos estão de acordo com diversos autores, os quais citam a umidade dos compostos para agaricáceos, ao final da Fase I, na faixa de 70 a 75% (GRIENSVEN; 1988; FLEGG, 1985).

Em países como a Bélgica e a Holanda, o pré-umedecimento das palhas seguido de uma homogeneização adequada do composto na Fase I são considerados os procedimentos determinantes para a obtenção de compostos com padrão de qualidade elevado (MASS, 2005)⁸. Neste mesmo sentido, Loon et al. (2004) citam, durante a adição de substratos na formação das leiras, um sistema de mistura apropriado para cada formulação de composto, para se prevenir variações excessivas na composição final do mesmo.

Ao final da Fase II, contudo, houve diferença significativa entre a umidade dos compostos. O compostos 2 e 3 apresentaram umidades estatisticamente iguais, de 77,01% e 74,67%, respectivamente, superiores à umidade do composto T1, de 67,29%.

Um dos motivos prováveis para a maior umidade dos compostos T2 e T3 ao final da Fase II, pode ser devido aos ingredientes utilizados nas formulações. A presença de um bagaço de cana-de-açúcar mais fragmentado e da palha de capim coast-cross, de caule mais fino e textura mais rígida, em comparação ao bagaço de cana-de-açúcar orgânico e à palha de capim braquiária utilizados no composto T1, favoreceu o acúmulo maior de água nos compostos T2 e T3.

Utilizou-se para esta Fase II de compostagem um sistema denominado “Compartimentado”, onde os compostos são acondicionados em caixas plásticas treliçadas. Neste sistema, pelo fato do composto possuir massa reduzida, sem a capacidade de uma termogênese suficiente para se atingir temperaturas adequadas de pasteurização e condicionamento natural, injeta-se vapor dentro da câmara, fazendo-se uso de um sistema

⁸ MASS, M. (C-Point Consultancy, WALKRO Mushrooms – Bélgica) Comunicação pessoal.

auxiliar de aquecimento. O ar não é inserido diretamente através do composto como ocorre num sistema de túneis em escala comercial e, deste modo, observa-se que os compostos mais densos tendem a acumular mais água devido à dificuldade de passagem de ar através destes e devido também, à umidade elevada do ambiente.

Outra hipótese a ser considerada para as diferenças de umidade nos compostos ao final da Fase II, é relativa à degradação microbiana da matéria orgânica, com formação de água e a remoção desta por evaporação. Segundo Straatsma (2004), pode ocorrer excesso de umidade no composto, quando a degradação microbiana e a taxa de evaporação encontram-se em diferentes estágios durante as Fases I e II de compostagem.

Oei (2003) e Griensven (1988) consideram a umidade de 72% para composto ao final da Fase II como sendo ideal para a obtenção das melhores produtividades. Porém, Loon et al. (2004) obtiveram produtividades adequadas no cultivo de *A. bisporus* em condições mais amplas de umidade nos compostos ao final da fase II, ou seja, variando de 64,7 a 77,3%. Dhar (2004), por sua vez, obteve produtividades de *A. bisporus* consideradas adequadas em compostos orgânicos certificados, com teores médios de umidade de 64% a 67% ao final da Fase II.

Segundo Griensven (1998), para compostos produzidos à base de cama de animais, um acréscimo de 10% na proporção de palha de trigo na formulação tende a resultar em aumentos 0,3% na umidade ao final da Fase II. Neste mesmo sentido, Gerrits e Amsing (1991) reportaram que a decomposição da matéria orgânica, o teor de cinzas e a proporção de palhas na formulação do composto relacionam-se com os teores de umidade destes compostos ao final da Fase II.

Neste Experimento 1 não foi possível observar o efeito da concentração de palhas sobre a umidade dos compostos pois, todos os compostos possuíam proporções de palhas, em massa seca, muito próximas entre si.

As Figuras 37 e 38 apresentam as umidades dos compostos T1, T2 e T3 ao final das Fases I e II de compostagem e ao final da Fase III, inoculados com as linhagens ABL 99/30 e 04/49 de *Agaricus blazei*, respectivamente.

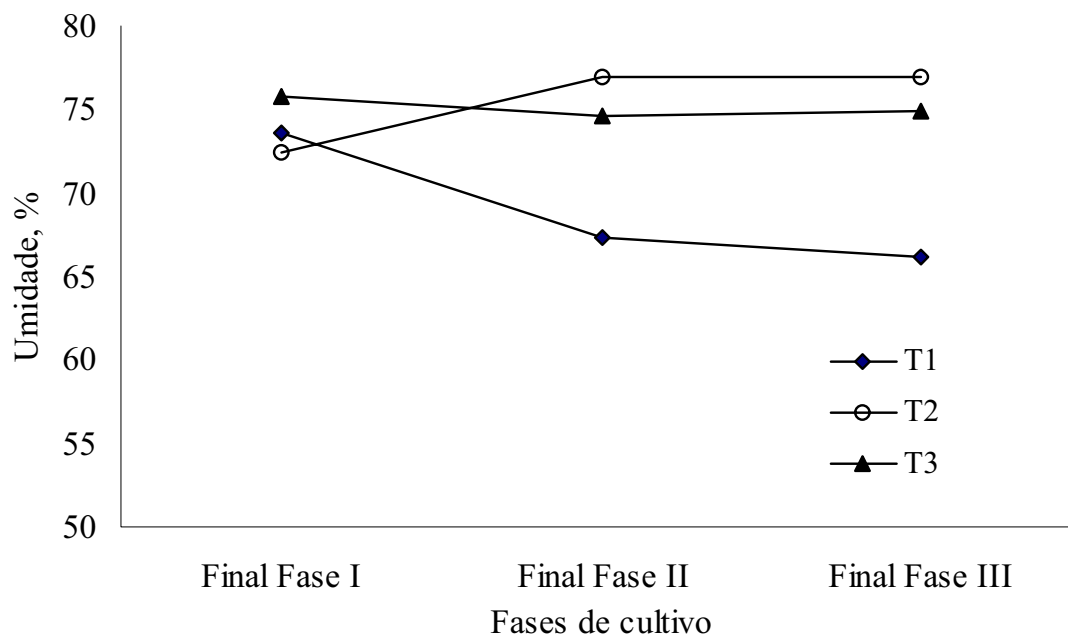


Figura 37. Umidade dos compostos ao final das Fases I e II da compostagem e ao final da Fase III, inoculado com a linhagem de ABL 99/30 de *Agaricus blazei*.

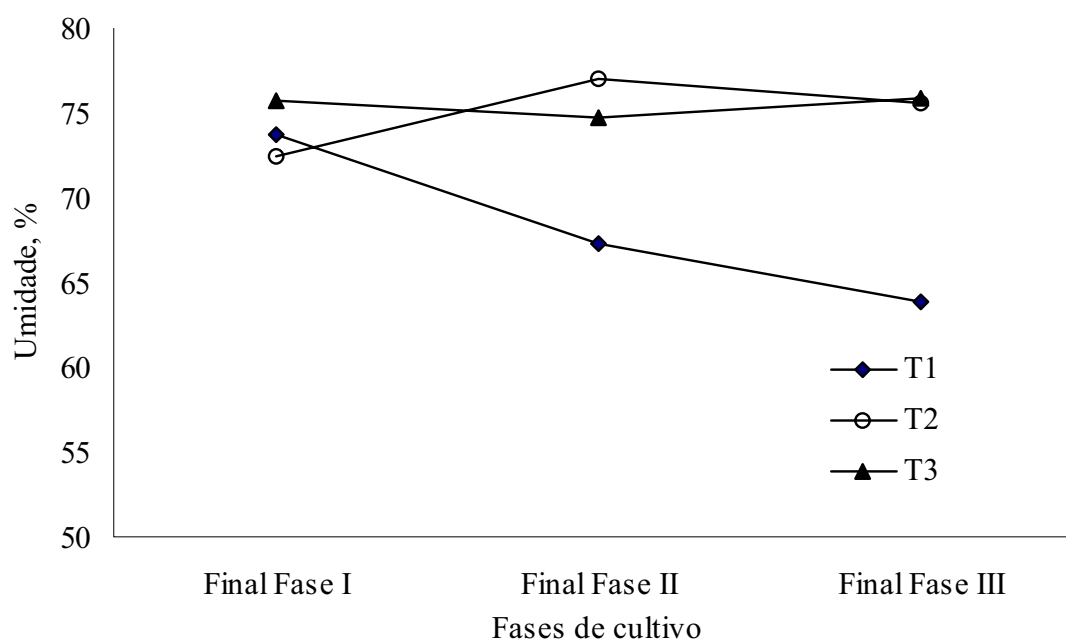


Figura 38. Umidade dos compostos ao final das Fases I e II da compostagem e ao final da Fase III, inoculado com a linhagem ABL 04/49 de *Agaricus blazei*.

Pelas Figuras 37 e 38, verifica-se de um modo geral uma pequena alteração na umidade dos compostos T1, T2 e T3, ao final da Fase III, em relação ao final da Fase II. O esperado era uma queda na umidade de todos os compostos mas, o filme plástico restringiu a perda de água, ainda que o mesmo apresentasse perfurações na base.

Neste sentido, nota-se que mesmo sem adição de água aos compostos durante esta Fase III, o composto T3 inoculado com uma das linhagens de *A. blazei* (ABL 99/30 e ABL 04/49) apresentou umidade ligeiramente maior em relação ao final da Fase II, devido provavelmente à formação de água pelo micélio de *A. blazei*.

Outrossim, a tendência de perda maior de umidade do composto durante as Fases II e III é mais evidenciado quando a compostagem é conduzida em sistemas de túneis, compartimentados sem cobertura ou cobertura parcial do composto (GRIENSVEN, 1988; SHARMA et al., 2004; KOPYTOWSKI FILHO; MINHONI, 2004).

O composto T1, por sua vez, com umidade menor à dos compostos T2 e T3 no final da Fase II, tendeu a reduzir ainda mais a umidade independentemente da linhagem de *A. blazei* inoculada. Infere-se que o composto T1 encontrava-se num estágio de degradação mais avançado que os demais, ou seja, com uma atividade microbiana menor, o que resulta em menor produção de água. O estágio de degradação mais avançado para o composto T1 foi evidenciado pelo seu aspecto mais escurecido e a palha com textura menos rígida e, pelo resultado de análise química do mesmo ao final da Fase II, caracterizada por um teor de carbono e relação C/N um pouco menor em relação aos outros compostos (Tabela 20).

A Tabela 19 apresenta a densidade dos compostos T1, T2 e T3 ao final da Fase I de compostagem. Os compostos T2 e T3 apresentaram densidades estatisticamente iguais, de 30,47 e 25,41%, respectivamente, superiores à do composto T1, de 480 kg m⁻³.

Segundo Gerrits e Amsing (1991), a umidade do composto é um dos fatores de influência na sua densidade e, de acordo com Straatsma (2004), quando a densidade do composto se torna elevada, o volume de poros são reduzidos, o que, durante a Fase II, pode tornar o sistema de injeção de ar através do composto insuficiente.

Tabela 19. Densidade dos compostos ao final da Fase I de compostagem (média de 63 repetições).

Compostos	Densidade, kg m ⁻³
T1	480,00A
T2	626,27B
T3	601,97B
CV, %	4,33

(1) Compostos: T1 (orgânico), T2 (semi-sintético) e T3 (sintético).

(2) Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si (Tukey, 5%).

A densidade de um composto comumente é diretamente proporcional à sua umidade, porém, a umidade não é o único fator. No presente experimento, esta proporcionalidade entre as umidades dos três compostos (Tabela 18) e a densidade, foi significativamente maior para os compostos T2 e T3.

Deste modo, outro fator de influência na densidade dos compostos ao final da Fase I, possa ser relativo à granulometria dos constituintes da formulação dos mesmos. Assim, a densidade menor observada para o composto T1, pode ser devido à presença um bagaço de cana-de-açúcar orgânico, com fragmentos grandes (até 3 cm), e a palha de capim braquiária com hastes de maior espessura. Nos tratamentos T2 e T3, por sua vez, a fragmentação menor, comum no bagaço de cana-de-açúcar convencional, procedente de usinas de açúcar e álcool, bem como a presença de palha de capim coast-cross, de hastes mais finas e rígidas, favoreceram à uma maior compactação e, conseqüentemente, à uma maior densidade para estes compostos, T2 e T3, ao final da Fase I.

Randle e Smith (1986) encontraram valores de 308,64 a 339,00 kg m⁻³ para a densidade de compostos ao final da Fase I. Estes valores, menores em comparação aos compostos do presente experimento, estão provavelmente relacionados ao manejo adotado por estes autores. Um manejo de compostagem curta (2 e 3 dias de Fase I), associado com uma proporção elevada de palha de trigo nas formulações (acima de 70%), o que resulta em compostos de densidade baixa. Contudo, à medida que se aumentava o período da Fase I, os autores observaram densidades crescentes ao final da Fase II. Ou seja, densidades de 313, 353,

425 kg m⁻³ de composto ao final da Fase II submetidos à 3, 13 e 23 dias de Fase I, respectivamente.

A Figura 39 e 40, apresentam a massa fresca e seca, respectivamente, dos compostos na montagem das leiras, no início da Fase I e ao final das Fases I, II e III.

Observa-se, pela Figura 39, que o composto T1 apresentou, na montagem das leiras, massa fresca maior que os compostos T2 e T3. Este fato deveu-se, principalmente, à adição do bagaço de cana-de-açúcar orgânico neste composto, o qual possuía 76% de umidade (Tabela 9). Por sua vez, o bagaço de cana-de-açúcar utilizado nos compostos T2 e T3 possuía umidade de 56,33%.

No início da Fase I, estimou-se a massa fresca dos compostos fixando-se a umidade dos mesmos em 75%. Deste modo, compostos com maior massa seca, em especial com maior quantidade de ingredientes lignocelulósicos, absorveram mais água, portanto, apresentaram maior massa fresca. Neste sentido, o composto T1 com 1070 kg de massa seca, absorveu mais água que o composto T2 e T3, com 1035,17 e 996,55 kg, respectivamente (Tabela 9).

Entre o final das Fases I e III, a massa fresca dos três compostos foram semelhantes e com quedas gradativas. Ao final da Fase III a massa fresca dos três tratamentos estabilizou-se. Nesta Fase III, a presença de um filme plástico envolvendo o composto, com orifícios na base inferior, permitia a saída do excesso de água. Perdas de água por evaporação, ainda que em menor quantidade, pode ter ocorrido na parte superior dos compostos, local em que havia o fechamento, por dobramento, do filme plástico.

Pela Figura 40, observa-se que os três compostos possuem massa seca muito similares entre si e constantes desde o momento da montagem da leira até o início da Fase I. Na fase de compostagem propriamente dita, os compostos T1, T2 e T3 perderam em média, 31,00, 20,46 e 30,75% de massa seca durante a Fase I e, 4,95, 37,29 e 22,66% durante a Fase II, respectivamente. Segundo Griensven (1988), podem ocorrer perdas equivalentes a 30% e 16% na matéria seca do composto durante as Fases I e II de compostagem, respectivamente.

Durante a Fase III, observa-se um pequeno aumento de matéria seca no composto T2 e, um aumento mais pronunciado no composto T1, ressaltando-se que nesta Fase III, não se adicionou ingredientes aos compostos.

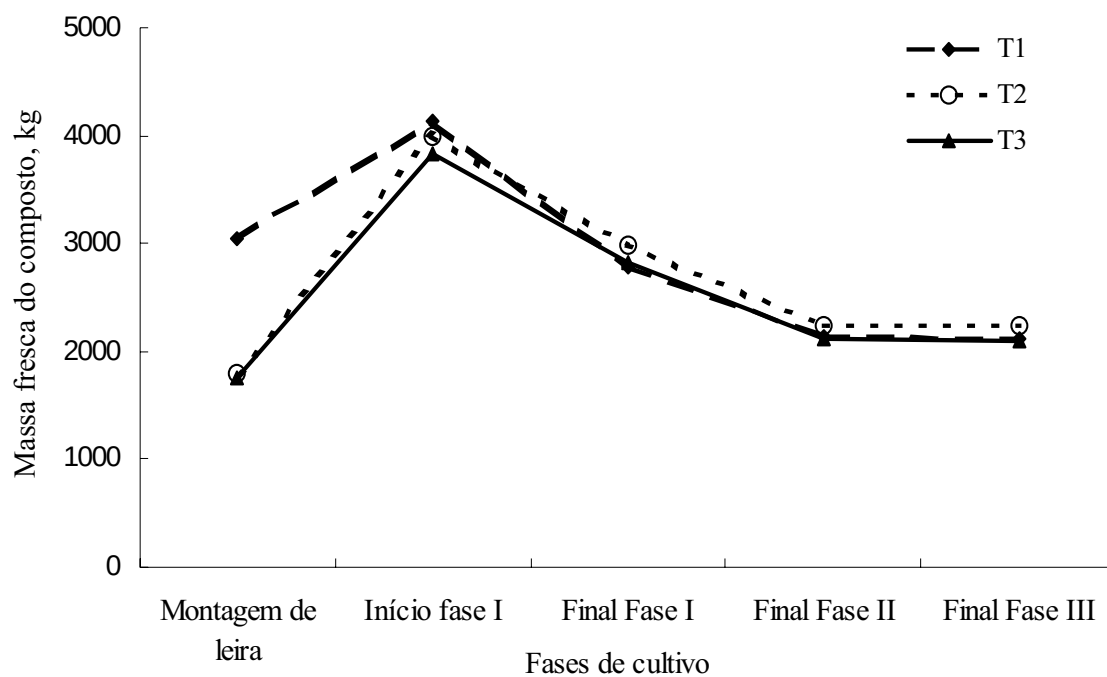


Figura 39. Massa fresca dos compostos T1, T2 e T3, na montagem da leira, início e final da Fase I e, ao final das Fases II e III.

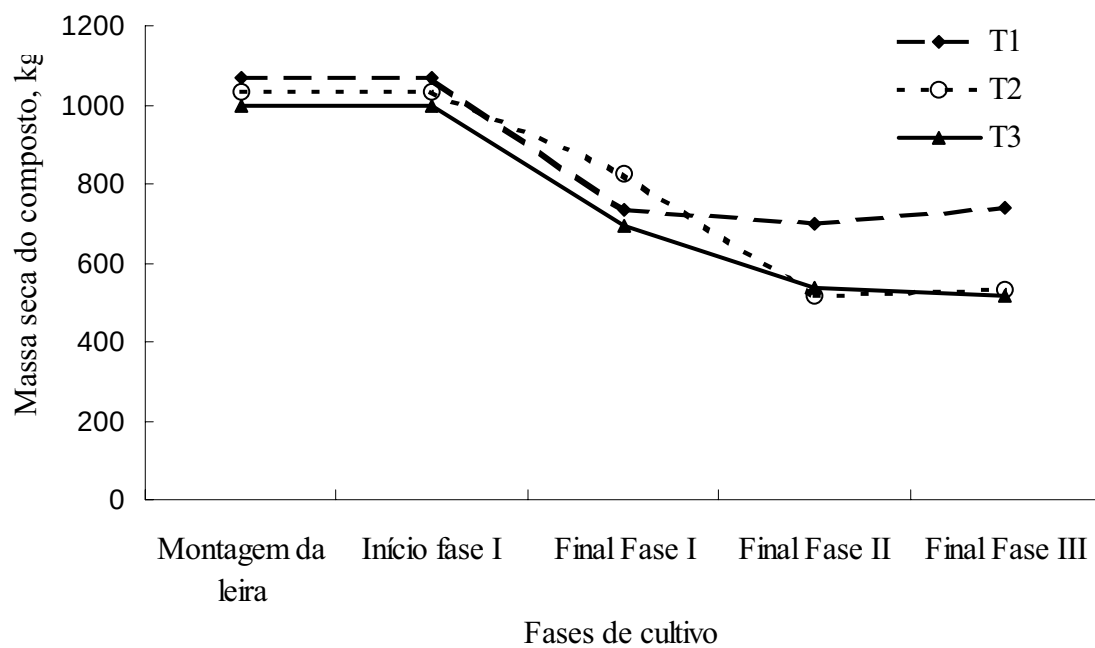


Figura 40. Massa seca dos compostos T1, T2 e T3, na montagem da leira, no início da Fase I e, ao final das Fases I, II e III.

Desta forma, era de se esperar redução na massa seca dos compostos, especialmente devido às perdas em função do metabolismo microbiano. Portanto, o pequeno aumento da massa seca dos compostos T1 e T2 pode ser resultante de erros advindos do método de amostragem.

Neste mesmo sentido, Gerrits e Amsing (1991) analisaram as relações da água em compostos, em sistema com e sem cobertura dos compostos com filme plástico. Os autores encontraram valores de umidade similares aos deste Experimento 1 e, a massa seca calculada dos compostos, acusaram ao final da Fase III um aumento de 0,31 a 1,27%, em relação à Fase II. Os autores concluíram que os valores encontrados podem ser facilmente explicados pelo gradiente de umidade existente na massa dos compostos, o que acarreta erros na amostragem dos mesmos, devido à estas variações de umidade entre as partes superior, mediana e inferior da massa de composto.

6.1.2. Teores de Carbono, Nitrogênio, relação C/N e pH

Tabela 20. Teores de carbono, nitrogênio e pH dos compostos ao final das Fases I e II de compostagem (Média de três repetições).

Tratamento	-----final da Fase I-----				-----final da Fase II-----			
	g kg ⁻¹ composto				g kg ⁻¹ composto			
	seco				seco			
	C	N	C/N	pH	C	N	C/N	pH
T1	416,08B	13,06A	32,33A	6,31B	401,86A	16,13A	24,66A	6,43B
T2	444,63AB	13,10A	34,33A	6,75A	414,83A	15,10A	27,66A	6,82A
T3	466,70A	11,16A	41,66A	6,51AB	420,43A	15,46A	27,66A	6,72A
CV%	10,11	10,11	11,19	2,25	5,87	6,60	10,38	0,60

(1) Compostos T1 (orgânico), T2 (semi-sintético) e T3 (sintético).

(2) Para cada coluna, médias seguidas por letras iguais não diferem significativamente entre si (Tukey, 5%).

Pela Tabela 20, observa-se na Fase I, teor de carbono maior no composto T3 (466,70 g kg⁻¹), em relação ao composto T1 (416,08 g kg⁻¹).

Os compostos T1, T2 e T3 apresentaram redução de 3,41, 6,70 e 9,91% no teor de carbono, respectivamente, entre o final das Fases I e II de compostagem.

A Tabela 21 apresenta as perdas de carbono, dos compostos T1, T2 e T3, ao final da Fase II.

Tabela 21. Perda de massa (kg) e porcentagem (%) de carbono, nos compostos T1, T2 e T3, no período entre o final da Fase I e o final da Fase II.

Composto ⁽¹⁾	-----Perda de carbono-----	
	Massa, kg	Porcentagem, %
T1	25,57	8,38
T2	151,81	41,53
T3	30,26	30,26

(1) Compostos: T1 (orgânico), T2 (semi-sintético) e T3 (sintético).

As perdas totais de carbono dos compostos ao final da Fase II em relação ao final da Fase I, foram de 25,57, 151,81 e 30,26 kg e deste modo, ocorreu uma redução de 8,38, 41,53 e 30,26% na massa seca dos compostos T1, T2 e T3, respectivamente. Estes dados, estão de acordo com os da Figura 40, para os quais se inferiu que parte da perda de massa seca ocorrida nos compostos possa ser devido à perda de carbono. Deste modo, tanto a redução na massa seca quanto a perda de carbono nos compostos entre o final das Fases I e II de compostagem obedeceu à ordem T2>T3>T1.

Para os teores de N e relação C/N ao final da Fase I, não houve diferença entre os compostos, porém, o composto T3 apresentou tendência de valores menores para o teor de N e relação C/N maior em relação aos compostos T1 e T2. Este fato pode ser explicado pelo maior teor de carbono no composto T3, reduzindo-se assim a sua porcentagem de N e aumentando proporcionalmente a sua relação C/N. Outro fator de influência nos teores de N e relação C/N de um composto, é a possibilidade de volatilização da amônia durante a secagem do substrato para posterior análise química (GRIENSVEN, 1988).

Para a Fase II, os teores de N nos três compostos também não apresentaram diferença, porém, observa-se uma tendência de maior valor para o composto T1, de $16,13 \text{ g kg}^{-1}$, em relação aos compostos T2 e T3, $15,10$ e $15,56 \text{ g kg}^{-1}$ de composto seco, respectivamente. Os teores de N mais elevados ao final da Fase II em relação ao final da Fase I, são proporcionais ao massa seca do composto, isto é, à medida que outros elementos são perdidos durante a compostagem, o N, em condições adequadas de umidade, oxigênio e índice pH, é incorporado ao composto, aumentando proporcionalmente o seu teor em relação à massa seca total do composto e, portanto ao carbono.

Observa-se o pH ao final da Fase I, sem diferença significativa entre os compostos T2 (6,75) e T3 (6,51), porém, o T2 diferenciando-se do T1 (6,31). Na Fase II, novamente observa-se o composto T1 com o menor pH (6,43), agora diferenciando-se do T2 e T3, com 6,82 e 6,72, respectivamente. A tendência muito comum de redução do pH de compostos, entre as Fases I a II, não foi observado neste Experimento 1.

O pH dos compostos nas Fases I e II é bastante relacionado com a composição dos ingredientes. Desta forma, Sharma (1991) obteve pH acima de 8,5 no início da Fase I (homogeneização de camas de animais e palhas), chegando a valores próximos a 7,5 ao final da Fase II. Esta redução no pH é um fato comum em compostos clássicos, os quais são comumente preparados com “camas” de animais em grandes proporções nas suas formulações e, portanto, com o pH inicial dos compostos elevado.

Observa-se nestes compostos uma tendência de valores inferiores no pH. Para os compostos produzidos no Brasil. Estes índices devem-se, em grande parte, à adição de grandes quantidades de bagaço de cana de açúcar ($> 60\%$ na base seca) e gesso nas formulações dos compostos, os quais, na maioria das vezes, ao final da Fase II, apresentam pH inferior a 7,0.

6.1.3. Teores de elementos metálicos

6.1.3.1. Composto

A Tabela 22 apresenta os teores de Cádmio (Cd), Cromo (Cr), Mercúrio (Hg), Chumbo (Pb) e Níquel (Ni) nos compostos T1, T2 e T3, ao final da Fase II de compostagem.

Tabela 22. Teores de Cd, Cr, Hg, Pb e Ni nos compostos T1, T2 e T3, ao final da Fase II (Média de três repetições).

Composto ⁽¹⁾	Cd	Cr	Hg Teor, mg kg ⁻¹	Pb	Ni
T1	0,029 A ⁽²⁾	nd ⁽³⁾	nd	nd	nd
T2	0,034 A	nd	nd	12,44	nd
T3	0,018 A	nd	nd	nd	nd
CV, %	153,92	---	---	---	---

(1) Compostos: T1 (orgânico), T2 (semi-sintético) e T3 (sintético).

(2) Para cada coluna, médias seguidas por letras iguais na coluna, não diferem significativamente entre si (Tukey, 5%).

(3) nd=teor não detectado.

Para os teores de Cd, não houve diferença entre os três compostos T1, T2 e T3, e, os valores apresentados são, na maioria vezes, menores que os dos ingredientes utilizados na composição dos compostos (Tabela 7).

Em relação ao Pb, detectou-se somente no composto T2, apresentando teor médio de 12,449 mg kg⁻¹ de massa seca de composto. Em função de nenhum dos ingredientes possuir teores médios maiores que 2,35 mg kg⁻¹, é possível que o valor encontrado foi em função de algum material contaminante durante a análise.

Não se detectou teores de Cr, Hg e Ni em nenhum dos três compostos, isto é, não foram determinados valores maiores que 0,004, 0,01 e 0,005 mg kg⁻¹, respectivamente.

Alonso Molnar (2002), avaliando tipos de camadas de cobertura e sua influência na produtividade e teores de elementos metálicos em basídomas de *A. blazei*, obteve valores maiores de Cd, Cr, Pb e Ni nos compostos, em relação aos do presente

experimento, ou seja, de 1,5, 5,5, 32,5 e 6,0 mg kg⁻¹, referente aos teores de Cd, Cr, Pb e Ni, respectivamente.

Comparando-se as faixas dos teores de elementos metálicos em compostos agrícolas (Tabela 7), os compostos T1, T2 e T3 seriam classificados como sendo de qualidade muito alta, em relação aos teores de Cd, Cr, Pb e Ni, isto é, abaixo de 1, 70, 100 e 30 mg kg⁻¹, respectivamente. Com relação ao teor máximo de Cd de 0,7 mg kg⁻¹ em compostos orgânicos permitidos pelo IBD (Tabela 3), os três compostos encontraram-se abaixo deste valor.

6.1.3.2. Basidiomas

A seguir, as Tabelas 23 a 29 apresentam os teores de Cd, Pb, e Hg nas duas partes de basidiomas (píleo e estípite) de *A. blazei*, linhagens ABL 99/30 e ABL 04/49 de *A. blazei*, três compostos diferentes (T1, T2 e T3) e dois primeiros fluxos de colheita.

As Tabelas 30, 31, 32 e 33, apresentam os Fatores de Acumulação (FA) do Cd, Cr, Hg e Pb, em basidiomas das linhagem ABL 99/30 e ABL 04/49 de *A. blazei*, em três compostos diferentes (T1, T2 e T3) e dois fluxos de colheita (primeiro e segundo).

A análise estatística dos teores de Ni nos basidiomas e o cálculo do fator de acumulação (FA) não foram processados por apresentarem, num universo de 72 repetições analisadas, apenas três repetições com teores detectáveis (>0,005 mg kg⁻¹), uma no estípite da linhagem de ABL 04/49 (2º fluxo) e, duas, no píleo da linhagem ABL 99/30 de *A. blazei*, com teor de 0,138, 0,042 e 0,174 mg kg⁻¹, respectivamente.

Para os outros elementos, aplicou-se a análise estatística quando o elemento foi detectado em pelo menos um mínimo de 30% das repetições.

6.1.3.2.1. Teores de elementos metálicos no estípete no primeiro fluxo de colheita

A Tabela 23 apresenta os teores de Cd no estípete de duas linhagens de *A. blazei* produzidos em três tipos de composto.

Na interação entre linhagem e composto sobre o teor de Cd no estípete de basidiomas, durante o 1º fluxo de colheita, não houve efeito significativo.

Os teores médios de Cd determinados no estípete da linhagem ABL 04/49 foram 1,90, 5,61 e 7,49 vezes maior em relação aos teores deste elemento determinados no estípete da linhagem ABL 99/30, quando cultivados nos compostos T1, T2 e T3, respectivamente.

Tabela 23. Teores de Cd no estípete de basidiomas de *Agaricus blazei* no 1º fluxo de colheita, em função de duas linhagens (ABL99/30 e ABL 04/49) e três tipos de composto (T1, T2 e T3) (Média de três repetições).

Composto ⁽¹⁾	Linhagens		Médias ⁽³⁾
	ABL99/30	ABL 04/49 Teor, mg kg ⁻¹	
T1	0,154 Aa ⁽²⁾	1,154 Aa	0,654 A
T2	0,198 Aa	0,378 Aa	0,288 A
T3	0,140 Aa	0,786 Aa	0,463 A
Médias ⁽³⁾	0,164B	0,786A	

Media geral do ensaio=0,468, CV=77,93%, F (linhagens)=12,51, F (tipo de composto)=não significativo, F interação (linhagens x tipo de composto)=não significativo

(1) Compostos: T1 (orgânico), T2 (semi-sintético) e T3 (sintético).

(2) As médias da interação linhagens x tipo de composto, com letras maiúsculas iguais na coluna e minúsculas na linha, não diferem significativamente entre si (Tukey, 5%).

(3) As médias de cada fator (linhagem ou composto) seguidas por letras maiúsculas iguais na coluna ou linha, não diferem significativamente entre si (Tukey, 5%).

Neste mesmo sentido, independentemente do tipo de composto em que se produziu o *A. blazei*, o teor de Cd foi maior no estípete de basidiomas da linhagem ABL 04/49.

Em relação às médias relativas ao tipo de composto, independentemente da linhagem inoculada, não houve diferença entre estas, porém, o teor de Cd tendeu a diminuir nos basidiomas produzidos nos compostos, segundo a ordem $T1 > T3 > T2$

Detectou-se Hg no estípite de basidiomas em apenas duas repetições do composto T3, com a linhagem ABL 99/30. O teor apresentado foi de $0,012 \text{ mg kg}^{-1}$, para ambas as repetições, o qual foi menor que os teores detectados em qualquer um dos ingredientes utilizados nos compostos ou materiais da camada de cobertura (Tabelas 8 e 13, respectivamente).

Detectou-se Pb em três amostras de estípite de basidiomas da ABL 99/30. Duas, produzidas no composto T1, apresentando teores de $10,395$ e $6,63 \text{ mg kg}^{-1}$; e uma amostra produzida no composto T2, com teor de $38,23 \text{ mg kg}^{-1}$. Para a linhagem ABL 04/49, detectou-se teor de $5,733 \text{ mg kg}^{-1}$ em uma amostra, quando produzido no composto T2.

Neste sentido, estes valores de Pb encontrados em ambas as linhagens, extrapolam a recomendação da FAO/WHO, que estipula o teor máximo de $0,1 \text{ mg Pb kg}^{-1}$ de massa seca de basidioma.

6.1.3.2.2. Teores de elementos metálicos no píleo no primeiro fluxo de colheita

Pela Tabela 24 observa-se diferença na interação entre linhagens e compostos. Os teores de Cd no píleo da linhagem ABL 04/49 cultivada no composto T1 apresentam valores médios 338% e $1414,28\%$ maiores em comparação aos compostos T2 e T3, respectivamente. Para os teores de Cd da linhagem ABL 99/30 não se observa diferença significativa nos basidiomas produzidos no mesmo tipo de composto.

O teor médio de Cd encontrado no píleo da linhagem ABL 04/49 tendeu a se apresentar $205,4\%$ maior que os teores médios de Cd da linhagem ABL 99/30.

Em relação aos teores médios de Cd no píleo, independentemente da linhagem cultivada (ABL 99/30 ou 04/49) no composto T1, apresentou teores 286% e $685,71\%$ maior que os compostos T2 e T3. De outro modo, para os outros compostos T2 e T3, não se observou diferença entre si, porém houve uma tendência de teor médio de Cd quando produzido no composto T2.

Tabela 24. Teores de Cd no píleo de basidiomas de *Agaricus blazei* no 1º fluxo de colheita, em função de duas linhagens (ABL99/30 e ABL 04/49) e três tipos de composto (T1, T2 e T3) (Média de três repetições).

Composto ⁽¹⁾	Linhagens		Médias ⁽³⁾
	ABL 99/30	ABL 04/49	
	Teor, mg kg ⁻¹		
T1	1,740Aa ⁽²⁾	4,980Ba	3,360A
T2	0,920Aa	1,470Aa	1,190BC
T3	0,646Aa	0,350Aa	0,490C
Médias ⁽³⁾	1,104B	2,266A	
Media geral do ensaio=1,685, CV geral=32,84%, F geral=28,08, F (linhagens)=19,83, F(tipo de composto)= 43,37, F interação (linhagens x tipo de composto)=16,71			

(1) Compostos: T1 (orgânico), T2 (semi-sintético) e T3 (sintético);

(2) As médias da interação (linhagens x tipo de composto), com letras maiúsculas iguais na coluna, não diferem significativamente entre si (Tukey, 5%).

(3) As médias de cada fator (linhagem ou composto) seguidas por letras maiúsculas iguais na coluna ou linha, não diferem significativamente entre si (Tukey, 5%).

Detectou-se Hg somente na linhagem ABL 99/30. Deste modo, os dados foram submetidos à análise de variância com delineamento inteiramente casualizado (Tukey , 5%). Pela Tabela 25, observa-se uma tendência de menor teor médio de Hg quando cultivado no composto T3, porém, não houve diferença significativa.

Tabela 25. Teores de Hg no píleo de basidiomas de *Agaricus blazei* (ABL99/30), em três tipos de compostos (T1, T2 e T3) (Média de três repetições).

Tipo de composto	ABL 99/30
	Teor, mg kg ⁻¹
T1 ⁽¹⁾	0,016A ⁽²⁾
T2	0,016A
T3	0,006A
CV, %	86,20

(1) Compostos: T1 (orgânico), T2 (semi-sintético) e T3 (sintético).

(2) Letras iguais na coluna, não diferem entre si (Tukey, 5%).

O Pb foi detectado somente pílculo somente na linhagem ABL 04/49. Os valores foram de 18,381 e 19,497 mg kg⁻¹ quando produzido no composto T1, e de 32,349 no e 4,023 mg kg⁻¹, quando produzidas nos compostos nos composto T2 e T3, respectivamente.

6.1.3.2.3. Teores de elementos metálicos no estípite no segundo fluxo de colheita

A Tabela 26 apresenta os teores de Cd no estípite de duas linhagens de *A. blazei* produzidos em três tipos de compostos, no 2º fluxo de colheita.

Tabela 26. Teores de Cd no estípite de *Agaricus blazei* no 2º fluxo de colheita, em função de duas linhagens (ABL99/30 e ABL 04/49) e três tipos de composto (T1, T2 e T3) (Média de três repetições).

Tipo de composto ⁽¹⁾	Linhagens		Médias ⁽³⁾
	ABL99/30	ABL 04/49 Teor, mg kg ⁻¹	
T1	0,658Aa ⁽²⁾	0,658a	0,658A
T2	0,238Aa	nd ⁽⁴⁾	0,119B
T3	0,261Aa	nd	0,132B
Médias	0,386A	0,219A	

Media geral do ensaio=0,303, CV geral=35,65%, F geral=22,69, F (linhagens)=10,80, F(tipo de composto)=48,62, F interação (linhagens x tipo de composto)=não significativo

(1) Compostos: T1 (orgânico), T2 (semi-sintético) e T3 (sintético).

(2) As médias da interação (linhagens x tipo de composto), com letras maiúsculas iguais na coluna e minúsculas na linha, não diferem significativamente entre si (Tukey, 5%).

(3) As médias de cada fator (linhagem ou composto) seguidas por letras maiúsculas iguais na coluna ou linha, não diferem significativamente entre si (Tukey, 5%).

(4) nd: não detectado.

Não houve diferença significativa na interação entre compostos e linhagens, porém para a linhagem ABL 99/30, houve uma tendência de maior valor de Cd no estípite de basidiomas produzidos no composto T1 em relação aos compostos T2 e T3.

A ABL 04/49 apresentou teores detectáveis de Cd somente no estípite dos basidiomas cultivados no composto T1.

Verifica-se, pelas médias de Cd nos estípete, relativos ao tipo de composto, que houve diferença significativa, independentemente da linhagem inoculada nos três compostos. O T1, apresentou a maior média, com $0,658 \text{ mg kg}^{-1}$, seguido do T3 e T2, com teores de $0,261$ e $0,238 \text{ mg kg}^{-1}$, respectivamente.

Em relação às médias das linhagens, não houve diferença significativa. Comparando-se os teores de Cd apresentados neste primeiro e segundo fluxo de colheita, houve uma tendência de teores maiores de Cd no estípete de basidiomas quando a ABL 04/49, foi produzido no composto T1.

Foi detectado Hg (teores $>0,01 \text{ mg kg}^{-1}$), em duas amostras de estípete da ABL 99/30 produzidas no composto T3, apresentando teores de $0,014$ e $0,024 \text{ mg kg}^{-1}$, e em duas amostras da ABL 04/49 no composto T2, ambas com teores de $0,012 \text{ mg kg}^{-1}$.

O Pb foi detectado em três amostras de estípete da linhagem ABL 99/30 de *A. blazei*, com teores de $89,66 \text{ mg kg}^{-1}$, $58,22$ e $10,983 \text{ mg kg}^{-1}$ nos compostos T1, T2 e T3, respectivamente.

Para a ABL 04/49, o Pb foi detectado em apenas uma amostra do estípete de basidioma produzida no composto T1, apresentando teor de $32,487 \text{ mg kg}^{-1}$.

6.1.3.2.4. Teores de elementos metálicos no píleo no segundo fluxo de colheita

A Tabela 27 apresenta os teores de Cd no píleo de basidioma de duas linhagens de *A. blazei* produzidos em três tipos de compostos.

Na Tabela 27, os teores de Cd no píleo não apresentaram diferença na interação entre linhagens e compostos. Para a ABL 99/30, houve uma tendência de maior teor de Cd no píleo de basidiomas cultivados no composto T1, isto é, $2,134 \text{ mg kg}^{-1}$, em comparação aos teores de $0,642$ e $0,770 \text{ mg kg}^{-1}$, quando cultivado nos compostos T3 e T2, respectivamente.

Da mesma forma, para a linhagem ABL 04/49, observou-se uma tendência de apresentar maior teor de Cd no píleo de basidiomas quando produzidos no composto T1 em relação ao T3. Para os basidiomas produzidos no composto T2 não foi observado níveis de detecção, isto é, acima de $0,002 \text{ mg kg}^{-1}$.

Tabela 27. Teores de Cd no píleo de *Agaricus blazei* no 2º fluxo de colheita, em função de duas linhagens (ABL 99/30 e ABL 04/49) e três tipos de composto (T1, T2 e T3) (Média de três repetições).

Tipo de composto ⁽¹⁾	Linhagens		Médias ⁽³⁾
	ABL99/30	ABL 04/49	
		Teor, mg kg ⁻¹	
T1	2,134Aa ⁽²⁾	2,342Aa	2,238A
T2	0,640Aa	nd ⁽⁴⁾	0,321B
T3	0,700Aa	0,370Aa	0,570B
Médias	1,182A	0,904A	

Media geral do ensaio=1,043, CV geral=30,69%, F geral=27,24, F (linhagens)=não significativo, F(tipo de composto)=63,60, F interação (linhagens x tipo de composto)=não significativo.

(1) Compostos: T1 (orgânico), T2 (semi-sintético) e T3 (sintético).

(2) As médias da interação (linhagens x tipo de composto), com letras maiúsculas iguais na coluna e minúsculas na linha, não diferem significativamente entre si (Tukey, 5%).

(3) As médias de cada fator (linhagem ou composto) seguidas por letras maiúsculas iguais na coluna ou linha, não diferem significativamente entre si (Tukey, 5%).

(4) nd: não detectado.

As médias das linhagens, independentemente do tipo de composto, não apresentaram diferença no teor de Cd no píleo, porém, observou-se tendência de maior valor no píleo da ABL 99/30 em relação à média encontrada no píleo da ABL 04/49.

Para as médias dos compostos, houve diferença significativa entre composto o T1, em relação aos compostos T3 e T2, os quais não apresentaram diferença entre si.

A Tabela 28 apresenta os teores de Hg no píleo das duas linhagens de *A. blazei*, em três tipos de compostos.

Para os teores de Hg, também não houve efeito significativo na interação entre linhagens e compostos. O maior valor foi determinado em amostras do píleo dos basidiomas da linhagem ABL 99/30 cultivados no composto T3, seguido do composto T2 porém, no composto T1 não foi detectado Hg (teor<0,01 mg kg⁻¹)

Tabela 28. Teores de Hg no píleo de *Agaricus blazei* no 2º fluxo de colheita, em função de duas linhagens ABL99/30 e ABL 04/49) e três tipos de compostos (T1, T2 e T3). (Média de três repetições).

Composto ⁽¹⁾	Linhagens		Médias ⁽³⁾
	ABL99/30	ABL 04/49	
	Teor, mg kg ⁻¹		
T1	nd ⁽⁴⁾	0,046Aa ⁽²⁾	0,023A
T2	0,062Aa	0,018Aa	0,040A
T3	0,072Aa	0,012Aa	0,042A
Médias	0,044A	0,025A	

Media geral do ensaio=0,035, CV geral=81,81%, F geral=3,12, F (linhagens)=não significativo, F(tipo de composto)=não significativo, F interação (linhagens x tipo de composto)=não significativo.

(1) Compostos: T1 (orgânico), T2 (semi-sintético) e T3 (sintético).

(2) As médias da interação linhagens x tipo de composto, com letras maiúsculas iguais na coluna e minúsculas na linha, não diferem significativamente entre si (Tukey, 5%).

(3) As médias de cada fator (linhagem ou composto) seguidas por letras maiúsculas iguais na coluna ou linha, não diferem significativamente entre si (Tukey, 5%).

(4) nd: não detectado.

Para a ABL 04/49, por sua vez, os teores de Hg tenderam a ser menores que os encontrados na ABL 99/30.

As médias de Hg no píleo de basidiomas em função do tipo de composto utilizado, independentemente da linhagem de *A. blazei* cultivada, também não apresentaram diferenças entre si, com os compostos T2 e T3. Para as médias das linhagens, igualmente não ocorreu diferença significativa entre as mesmas e a linhagem ABL 99/30 tendeu a apresentar valor maior em relação à ABL 04/49.

Os dados de Hg em basidiomas observados para a linhagem ABL 99/30 são apresentados na Tabela 29.

Neste 2º fluxo detectou-se Pb no píleo de basidiomas da linhagem ABL 04/49 fluxo, apenas no composto T3, com média de 1,203 mg kg⁻¹.

Os teores de Pb no píleo, neste segundo fluxo, tenderam a ser menores em relação aos teores encontrados nas amostras do píleo do primeiro fluxo.

Tabela 29. Teores de Pb no píleo de basidiomas de *Agaricus blazei* (ABL99/30) no 2º fluxo, em três tipos de compostos (T1, T2 e T3). (Média de três repetições).

Tipo de composto	ABL 99/30 Teor, mg kg ⁻¹
T1 ⁽¹⁾	1,46A ⁽²⁾
T2	9,61A
T3	16,15A
CV	136

(1) Compostos: T1 (orgânico), T2 (semi-sintético) e T3 (sintético).

(2) Médias seguidas por letras iguais na coluna, não diferem não diferem significativamente entre si (Tukey, 5%).

Não houve diferença entre as médias dos teores de Pb no píleo de basidiomas da linhagem ABL 99/30, porém, observou-se uma tendência de maior teor de Pb quando o *A. blazei* foi cultivado no composto T3. Os teores dos compostos T1, T2 e T3, apresentaram-se 14,6, 96,1 e 161,5 vezes maior que o teor máximo recomendado em basidiomas (FAO/WHO, 2001).

6.1.4. Fator de acumulação (FA)

As Tabelas 30, 31, 32 e 33, apresentam os Fatores de Acumulação (FA) do Cd, Cr, Hg e Pb, em basidiomas das linhagem ABL 99/30 e ABL 04/49 de *A. blazei*, em três compostos diferentes (T1, T2 e T3) e nos dois primeiros fluxos de colheita.

Pela Tabela 30, com excessão do composto T3 inoculado com a linhagem ABL 99/30 de *A. blazei*, observa-se no 1º fluxo de colheita, o maior fator de acumulação de Cd no estípite ou no píleo da linhagem ABL 04/49 em relação à ABL 99/30.

No 2º fluxo, os fatores de acumulação de ambas as linhagens tenderam novamente ser maiores no estípite em relação ao 1º fluxo

Tabela 30. Fator de acumulação (FA) de Cd em basidiomas de *Agaricus blazei*, em função de duas linhagens (ABL99/30 e ABL 04/49), três tipos de composto (T1, T2 e T3), parte do basidioma (píleo e estípite), nos dois primeiros fluxos de colheita.

Tratamento ⁽¹⁾	-----Fluxo de colheita-----							
	1º fluxo				2º fluxo			
	Estípite		Píleo		Estípite		Píleo	
	ABL 99/30	ABL 04/49	ABL 99/30	ABL 04/49	ABL 99/30	ABL 04/49	ABL 99/30	ABL 04/49
T1	5,31	39,73	60,00	171,72	22,69	22,69	73,58	80,75
T2	4,64	13,03	27,29	50,69	7,00	nd ⁽²⁾	18,88	nd
T3	7,77	43,66	35,88	19,44	14,66	nd	42,77	20,55

(1) Compostos: T1 (orgânico), T2 (semi-sintético) e T3 (sintético).

(2) nd: não detectado, isto é, quando a média dos teores das amostras foi menor que 0,002 mg kg⁻¹.

Tabela 31. Fator de acumulação (FA) de Cr em basidiomas de *Agaricus blazei*, em função de duas linhagens (ABL99/30 e ABL 04/49), três tipos de composto (T1, T2 e T3) e parte do basidioma (píleo e estípite), nos dois primeiros fluxos de colheita.

Composto ⁽¹⁾	-----Fluxo de colheita-----							
	1º fluxo				2º fluxo			
	Estípite		Píleo		Estípite		Píleo	
	ABL 99/30	ABL 04/49	ABL 99/30	ABL 04/49	ABL 99/30	ABL 04/49	ABL 99/30	ABL 04/49
T1	nd ⁽²⁾	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
T2	+ ⁽³⁾	nd	+	nd	nd	+	nd	nd
T3	nd	nd	nd	nd	nd	nd	+	nd

(1) Compostos: T1 (orgânico), T2 (semi-sintético) e T3 (sintético).

(2) nd: não detectado, isto é, quando a média dos teores das amostras foi menor que 0,004 mg kg⁻¹.

(3) “+”: quando o FA não foi definido devido os teores nos compostos não terem sido detectados.

Pela Tabela 22, observa-se que o Cr não foi detectado em nenhuma dos compostos. Da mesma forma pela Tabela 31, somente duas amostras em cada fluxo apresentaram teores detectáveis de Cr.

Tabela 32. Fator de acumulação (FA) de Pb em basidiomas de *Agaricus blazei*, em função de duas linhagens (ABL99/30 e ABL 04/49), três tipos de composto (T1, T2 e T3) e parte do basidioma (píleo e estípite), nos dois primeiros fluxos de colheita.

Tratamento ⁽¹⁾	-----Fluxo de colheita-----							
	1º fluxo				2º fluxo			
	Estípite		Píleo		Estípite		Píleo	
	ABL 99/30	ABL 04/49	ABL 99/30	ABL 04/49	ABL 99/30	ABL 04/49	ABL 99/30	ABL 04/49
T1	+(3)	nd	nd	+	+	+	+	+
T2	nd	+	nd	+	1,85	nd	0,198	nd
T3	nd	nd	+	+	+	nd	+	+

(1) Compostos: T1 (orgânico), T2 (semi-sintético) e T3 (sintético);

(2) nd: quando a média dos teores das amostras foi menor que 0,025 mg kg⁻¹.

(3) “+”: quando o FA não foi definido devido aos teores nos compostos não terem sido detectados.

Tabela 33. Fator de acumulação (FA) de Hg em basidiomas de *Agaricus blazei*, em função de duas linhagens (ABL99/30 e ABL 04/49), três tipos de composto (T1, T2 e T3) e parte do basidioma (píleo e estípite).

Composto ⁽¹⁾	-----Fluxo de colheita-----							
	1º fluxo				2º fluxo			
	Estípite		Píleo		Estípite		Píleo	
	ABL 99/30	ABL 04/49	ABL 99/30	ABL 04/49	ABL 99/30	ABL 04/49	ABL 99/30	ABL 04/49
T1	nd ⁽²⁾	+	+	+	nd	nd	nd	+
T2	+(3)	+	nd	+	nd	nd	+	+
T3	nd	nd	+	+	+	nd	+	+

(1) Compostos: T1 (orgânico), T2 (semi-sintético) e T3 (sintético).

(2) nd: quando a média dos teores das amostras foi menor que 0,01 mg kg⁻¹.

(3) “+”: quando o FA não foi definido devido aos teores nos compostos não terem sido detectados.

Observa-se pelas Tabelas 31, 32 e 33, que mesmo com teores de Cr, Pb e Hg não terem sido detectados nos compostos, diversas amostras apresentaram-se detectáveis

nos basidiomas, corroborando com Demirbas (2004) que observou que os basidiomicotas são indicadores da presença de elementos metálicos em um determinado substrato ou solo, porém, não quantificam necessariamente os teores presentes.

6.1.5. Produtividade

A Tabela 34 apresenta a produtividade em função do tipo de composto e linhagem de *A. blazei*, aos 100 dias de cultivo.

Tabela 34. Produtividade de basidiomas em função dos tipos de compostos e linhagens de *Agaricus blazei*, aos 100 dias de cultivo.

Tipo de composto	Linhagens		Médias
	ABL99/30	ABL 04/49	
Produtividade, %			
T1	7,24Aa	7,09Aa	7,17A
T2	4,65Aa	3,97Aa	4,31C
T3	6,24Aa	4,68Aa	5,46 B
Médias	6,04A	5,25B	
Media geral do ensaio=5,64, CV geral=29,10, F (linhagens)=5,27, F(tipo de composto)=22,93, F interação (linhagens x tipo de composto)= não significativo			

(1) Compostos: T1 (orgânico), T2 (semi-sintético) e T3 (sintético).

(2) As médias da interação linhagens x tipo de composto, com letras maiúsculas iguais na coluna e minúsculas na linha, não diferem significativamente entre si (Tukey, 5%).

(3) As médias de cada fator (linhagem ou composto) seguidas por letras maiúsculas iguais na coluna ou linha, não diferem significativamente entre si (Tukey, 5%).

Para a produtividade, não houve diferença significativa na interação entre as linhagens e compostos, porém, verifica-se uma tendência de superioridade na produtividade dos compostos segundo a ordem T1>T3>T2, para ambas as linhagens.

As médias de produtividade do composto T1 para ambas linhagens (7,24 e 7,09% de produtividade) e do composto T3 inoculado com a linhagem ABL 99/30 (6,24% de produtividade), estão de dentro de uma faixa encontrada por Kopytowski Filho (2002) que, aos 112 dias de cultivo em três compostos com diferentes relações C/N e proporções de farelo de soja/uréia, obteve produtividades entre 5,68 a 10,01%. Cavalcante

(2003), ao testar três diferentes camadas de cobertura em 90 dias de cultivo à campo, em região montanhosa no estado do Ceará, obteve produtividades entre 6,51 e 9,62%.

As médias de produtividade do composto T2, produzidos com a ABL 99/30 e ABL 04/49 e, o T3 produzido com a ABL 04/49, estão abaixo de 5% de produtividade, consideradas baixas para os padrões comerciais de cultivo brasileiro e considerado inviável economicamente.

Com relação às médias das linhagens, observou-se uma superioridade de 13% da linhagem ABL 99/30 em relação à ABL 04/49, independentemente do composto utilizado. Do mesmo modo, o composto T1, foi 23,84 e 39,88% superior aos compostos T3 e T2.

As médias de produtividade deste Experimento 1 são consideradas moderadas a normais para o *A. blazei* para o período de cultivo de 100 dias. Em produções comerciais e com ambiente parcialmente controlado, é comum as produtividades atingirem de 12 a 18% em períodos de 120 a 160 dias de cultivo.

As Figuras 41 e 42, apresentam a produção diária de basidiomas frescos das linhagens ABL 99/30 e ABL 04/49 de *A. blazei* nos compostos T1, T2 e T3, no período de 100 dias de cultivo.

Para este Experimento 1, determinou-se 4 fluxos de colheita e pelas Figuras 41 e 42, observa-se o primeiro fluxo aos 28 dias após a cobertura do composto. A linhagem ABL 99/30 apresenta no 1º fluxo de colheita, picos maiores nos três compostos quando comparado com a ABL 04/49. Neste primeiro fluxo, observa-se colheitas mais longas (6 dias de duração). Este comportamento, foi devido à paralização dos equipamentos de controle de resfriamento e aquecimento durante o início de redução de temperatura do composto. Deste modo, a temperatura dos compostos eleva-se naturalmente, permanecendo por mais de 30 horas a 26-27°C. Após a manutenção, deu-se novamente continuidade ao processo de indução.

À partir do 2º fluxo, com os equipamentos de resfriamento e aquecimento paralizaram novamente e os controles de indução foram feitos manualmente por meio do sistema de aeração e umedecimento do piso e paredes internas da câmara de cultivo e, ainda assim, a ABL 99/30 tendeu a obter maiores picos de produção de basidiomas.

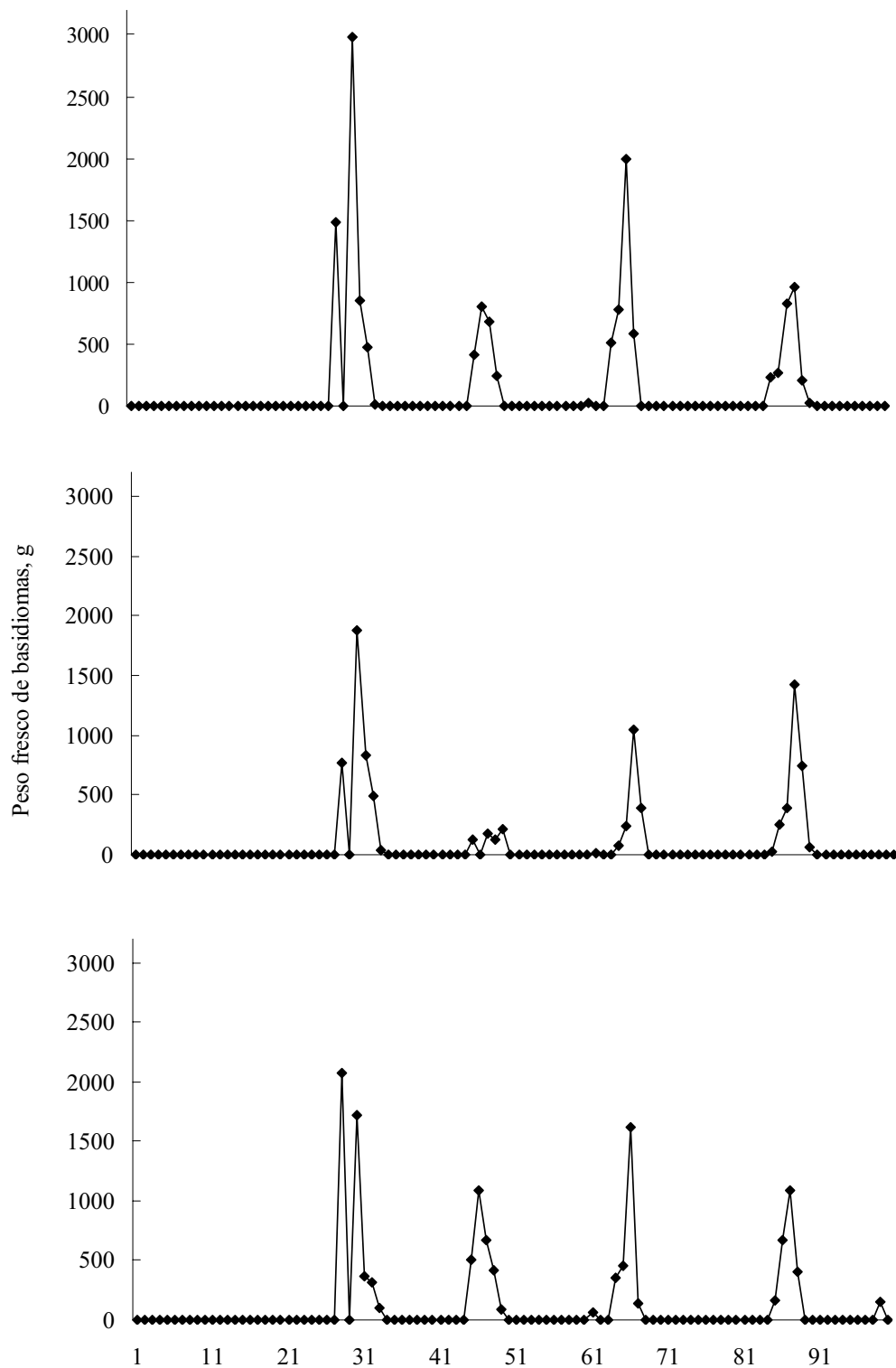


Figura 41. Produção diária de massa fresca de basidiomas da linhagem 99/30 de *Agaricus blazei* em três compostos (T1, T2 e T3), no período de 100 dias, em câmara climatizada.

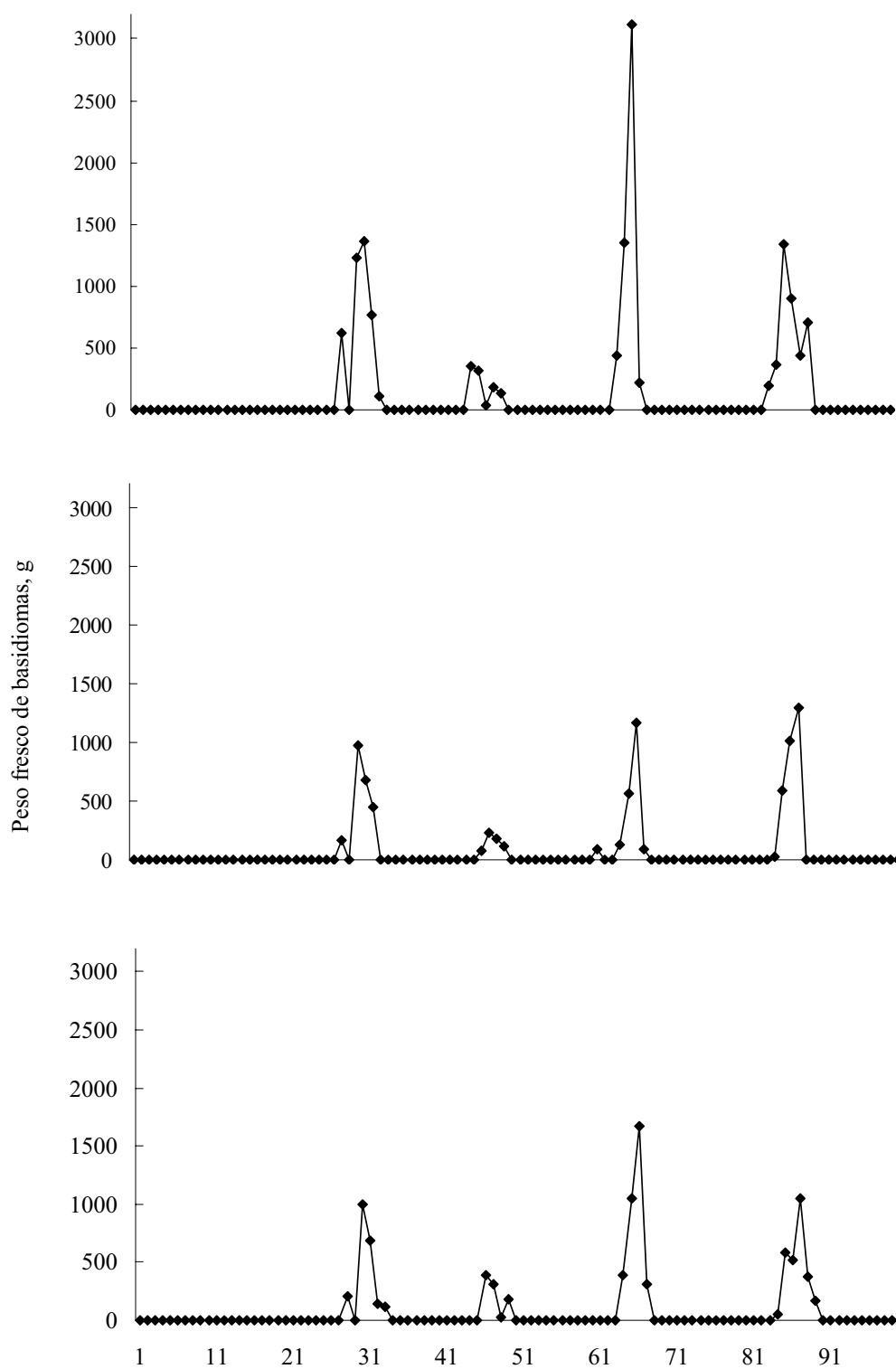


Figura 42. Produção diária massa fresca de basidiomas da linhagem 04/49 de *Agaricus blazei* em três compostos (T1, T2 e T3), no período de 100 dias, em câmara climatizada.

No 3º fluxo, o composto T1 inoculado com a ABL 04/49 obteve o pico de produção maior, produzindo em média, mais de 200 g de basidiomas frescos em cada caixa de composto num mesmo dia de colheita.

Nestes 3º e 4º fluxo de colheita, em geral, os picos de produção dos diferentes compostos foram mais semelhantes entre si, provavelmente em função do efeito da menor temperatura externa, o que facilitou o controle das variáveis de indução.

6.1.6. Eficiência biológica

A Tabela 35 apresenta a eficiência biológica de basidiomas em função do tipo de composto e linhagem de *A. blazei*, aos 100 dias de cultivo.

Tabela 35. Eficiência biológica de basidiomas em função dos tipos de compostos e linhagens de *Agaricus blazei*, aos 100 dias de cultivo.

Tipo de composto	Linhagens		Médias
	ABL99/30	ABL 04/49	
	Eficiência biológica, %		
T1 ⁽¹⁾	21,96Aa	21,56Aa	21,76AB
T2	20,24Aa	16,92Aa	18,58B
T3	26,81Aa	19,80Aa	23,30A
Médias	23,00A	19,43B	

Media geral do ensaio=21,21, CV geral=30,78, F (linhagens)=6,75, F(tipo de composto)=4,07, F interação (linhagens x tipo de composto)=não significativo

(1) Compostos: T1 (orgânico), T2 (semi-sintético) e T3 (sintético).

(2) As médias da interação linhagens x tipo de composto, com letras maiúsculas iguais na coluna e minúsculas na linha, não diferem significativamente entre si (Tukey, 5%).

(3) As médias de cada fator (linhagem ou composto) seguidas por letras maiúsculas iguais na coluna ou linha, não diferem significativamente entre si (Tukey, 5%).

O valores de Eficiência biológica não apresentam diferença na interação linhagens e composto. Entretanto, o composto T3 inoculado com a linhagem de *Agaricus blazei* ABL 99/30, apresentou maior média de eficiência biológica entre todos os tratamentos.

Pelas médias das linhagens, obteve-se diferença significativa, com valores superior da linhagem ABL 99/30 apresentou maior Eficiência biológica que a ABL 04/49. Isto significa que, em qualquer dos compostos cultivados, em média, a ABL 99/30 possibilita maior EB.

Pelas médias dos compostos, o composto T3 e T1 não apresentaram diferença entre si, porém, o composto T3 diferenciou-se do composto do T2.

6.1.7. Massa média de basidiomas

A Figura 43 apresenta a massa média de basidiomas (g) em função da linhagem de *A. blazei* e tipo de composto, em cinco fluxos de colheita.

Pela Figura 43, constata-se um maior massa média dos basidiomas da linhagem ABL 99/30 do 1º ao 4º fluxo, independentemente do composto cultivado. No 1º fluxo de colheita, o massa média dos basidiomas da ABL 99/30 nos compostos T1, T2 e 30, atingiram 25,54, 30,68 e 36,68 g, respectivamente, enquanto que a ABL 04/49 nos compostos T1, T2 e T3 obtiveram massas médias menores, apresentando valores de 24,72, 24,12 e 16,25 g, respectivamente. Para o 2º fluxo, os compostos inoculados com a linhagem ABL 99/30 continuaram com massas médias maiores, entre 26,39 a 27,71 g, e, os compostos inoculados com a linhagem ABL 04/49 apresentaram-se entre 17,34 a 20,31g.

Esta tendência de redução do massa média de basidiomas ocorreu novamente no 3º fluxo, para todos os compostos produzidos com a ABL 99/30,

No 4º fluxo, houve redução de massa média e uma tendência de massas médias mais próximas entre os tratamentos, entre 11,48 e 14,21 g.

A redução de massa média de basidiomas no decorrer dos fluxos de colheitas, pode ter ocorrido em função da redução de nutrientes e energia do composto, consumido em parte para a formação dos basidiomas, manutenção do metabolismo do próprio micélio e a população microbiana presente.

Com relação às linhagens testadas, em geral, os dados não estão coerentes com observações feitas à campo, onde comumente a ABL 04/49 apresenta massa média maior em relação à ABL 99/30, além de se desenvolver bem em ambientes com temperaturas elevadas em grande do ciclo de cultivo, isto é, acima de 30°C na maior parte das horas. Deste modo, uma das causas deste menor massa média de basidiomas da ABL 04/49 pode estar relacionado à ausência do sistema de aquecimento durante os fluxos de colheita.

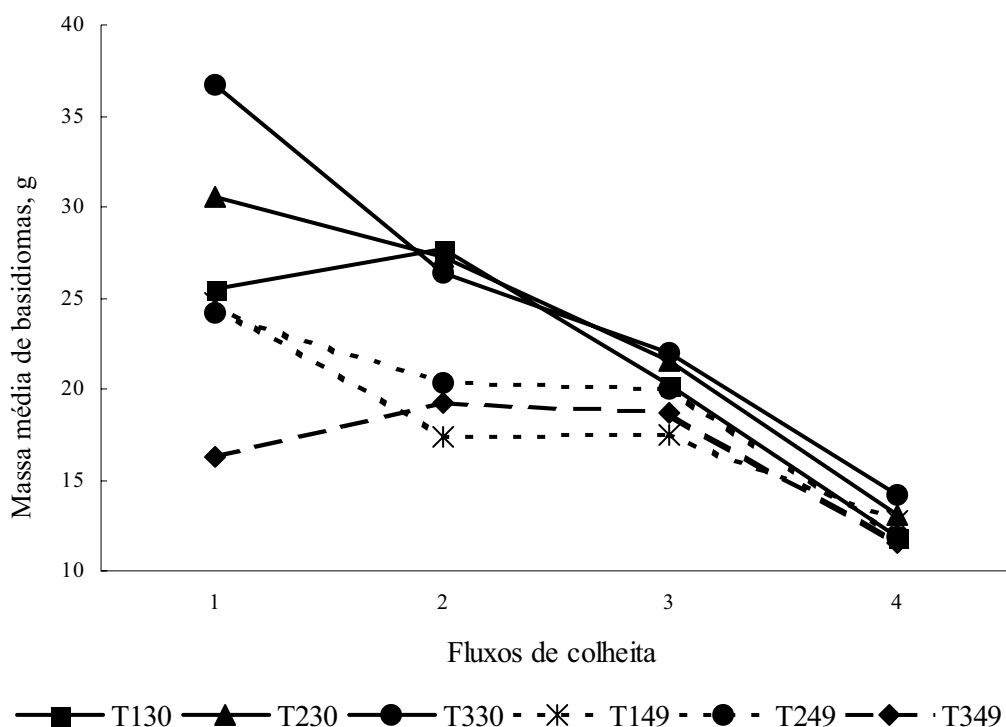


Figura 43. Massa média de basidiomas (g), em função da linhagem, composto e fluxo de colheita.

As médias alcançadas neste experimento se apresentaram um pouco abaixo das médias de 30 a 40 g, encontradas por Kopytowski Filho (2002). Em cultivo de campo, Cavalcante (2003) obteve massas médias de basidiomas superiores, variando entre 57,01 a 72,4 g.

Para um cultivo comercial, a massa dos basidiomas são proporcionalmente relacionados à basidiomas maiores. Deste modo, o valor de mercado determinante para os basidiomas desidratados de *A. blazei*, é, em grande parte, determinado pelo tamanho dos basidiomas (comprimento e largura). Outrossim, outra vantagem da linhagem ABL 99/30, além de apresentar produtividade mais elevada, tendeu a apresentar massa média maior que a linhagem ABL 04/49 em quase todos os fluxos de produção.

6.2. Experimento 2

6.2.1. Produtividade

A Figura 44 apresenta a produtividade de *A.blazei* em função do tipo e época da adição de suplemento ao composto.

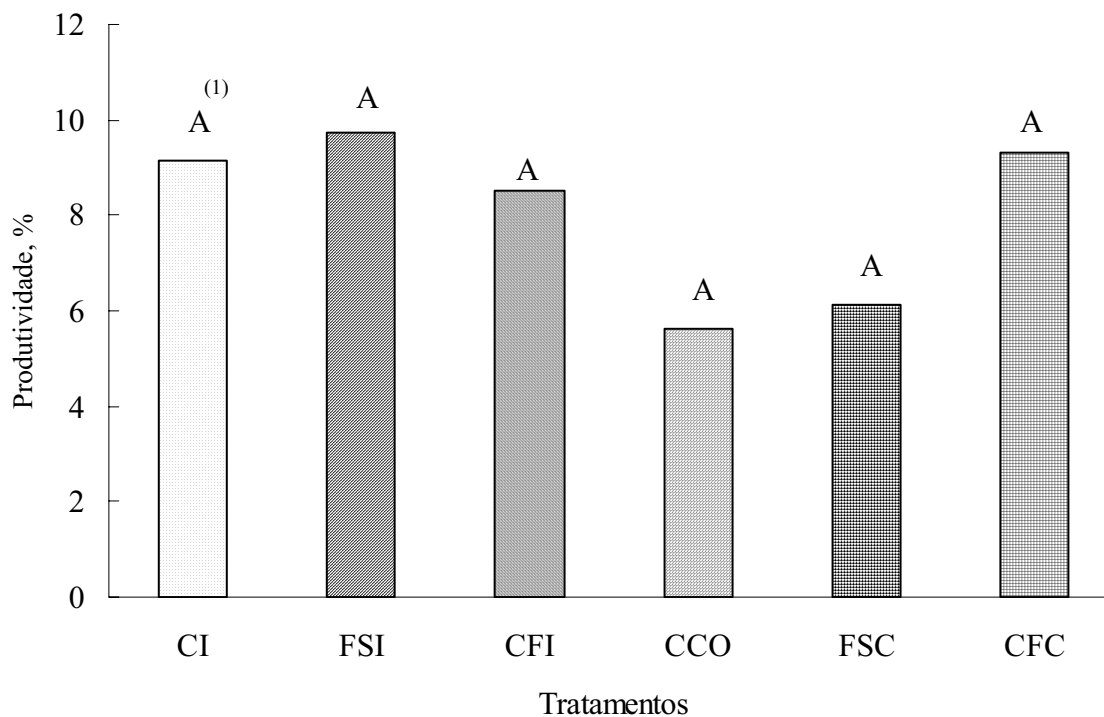


Figura 44. Produtividade de *Agaricus blazei* em função do tipo (farelo de soja e Champ food®) e época da adição de suplemento ao composto (inoculação e pós-colonização).

Onde: CI (composto sem suplementação na inoculação), FSI (farelo de soja na inoculação do composto), CFI (Champ food® na inoculação), CCO (composto colonizado sem suplementação), FSC (farelo de soja pós-colonização) e CFC (Champ food® pós-colonização).

(1) Letras iguais não apresentam diferença significativa, Tukey (5%). CV,%=42,31.

Pela Figura 44, observou-se que não houve diferença significativa entre os tratamentos e a produtividade variou de 5,61 a 9,65%. Contudo, nos tratamentos com a adição ou não de suplemento na época da inoculação do composto, houve uma tendência de produtividades maiores dos tratamentos segundo a ordem FSI>CI>CFI. Por outro lado, esta tendência de maior produtividade obedeceu a ordem CFC>FSC>CCO quando a adição ou não do suplemento deu-se após a colonização do composto pelo *A. blazei*.

O fato do tratamento CCO ter resultado em menor produtividade dentre os tratamentos, pode ser em função da homogeneização do composto e a conseqüente fragmentação do micélio de *A. blazei*, o qual deve ter despendido energia e nutrientes para a sua recuperação e estabilização.

Experimentos conduzidos preliminarmente e em produções comerciais, observou-se produtividades menores e maior susceptibilidade à contaminantes quando os blocos de composto colonizados são fragmentados parcialmente durante o transporte para a propriedade, e/ou no acondicionamento nos sistema de “camas”, onde comumente ocorre a fragmentação para o nivelamento da camada de composto. De outro modo, os tratamentos, FSC e CFC, mesmo com a fragmentação dos compostos, houve reposição de nutrientes para a recuperação do micélio em função da adição dos suplementos disponibilizando-os para a formação de basidiomas.

Após a adição dos suplementos, uma elevação excessiva da temperatura de algumas repetições de compostos pela termogênese microbiana, dificultou o desenvolvimento do micélio de *A. blazei* e facilitou o surgimento de alguns fungos competidores. Deste modo, duas repetições dos tratamentos FSC e CFC foram perdidas por contaminação fúngica, principalmente do gênero *Penicillium* spp. e *Trichoderma* spp. Ainda assim, o tratamento CFC apresentou produtividade 53,27 e 66,66% superior aos tratamentos SFC e CCO.

Petrenko e Bisko (2004), avaliando a adição de suplementos em compostos para cultivo de *A. bisporus* à base de soja, igualmente citam perdas de repetições com a elevação da temperatura dos compostos (acima de 34°C) após a suplementação. Segundo estes mesmos autores, a elevação de temperatura de compostos suplementados é comumente relacionada com a quantidade de nitrogênio adicionado, porém, os resultados demonstraram a que outros fatores químicos e físicos interferiram neste comportamento.

Segundo Oei (2003) e, Schisler e Sinden (1962), os maiores riscos de contaminações no composto, ocorrem com mais frequência, quando se efetua a suplementação no momento da inoculação, onde os nutrientes ficam disponíveis para uma população maior de microrganismos.

A suplementação, pode aumentar a produtividade em até 11% e 22%, quando adicionado no momento ou após a colonização do composto, respectivamente (OEI; 2003).

Schisler e Sinden (1962) demonstraram ganhos de 10% de produtividade quando a suplementação ocorreu na inoculação do composto.

Neste experimento 2, o aumento da produtividade com adição do farelo de soja (FSI) no momento da inoculação, foi de 5,34%, enquanto que, o Champ Food[®] produziu 5,13% em relação ao composto não suplementado (CI).

6.2.2. Massa média de basidiomas

A Figura 45 apresenta a produção diária de basidiomas dos tratamentos CI, FSI, CFI e, a Figura 46, dos tratamentos CCO, FSC, CFC e, durante 100 dias de cultivo.

Para todos os tratamentos, o primeiro fluxo de colheita deu-se aos 23 dias, apresentando intervalos de 11 a 17 dias fluxos e, duração do período de colheita de 3 a 5 dias. As colheitas foram bastante sincronizadas entre os tratamentos, isto é, independentemente do tratamento, todas ocorreram no mesmo período.

O ciclo total de cultivo deste experimento é considerado curto em comparação às produções comerciais de *A. blazei*, contudo, este ciclo de 100 dias é considerado longo para o cultivo de *A. bisporus*, comumente de 2 a 4 fluxos de colheita e duração de 45 a 60 dias.

A precocidade e o sincronismo dos fluxos de colheita são de extrema importância para a otimização do manejo operacional e da viabilidade econômica do cultivo de *A. blazei*, visto que, cultivos de ciclo curto (90 a 120 dias) possibilitam a condução de, no mínimo de três produções anuais. No sentido oposto, quando se tem ciclos longos de cultivo

de *A. blazei*, ocorre redução da rentabilidade em função da ociosidade da mão de obra, tempo de retorno de investimento e ocupação das estruturas de cultivo por períodos muito longos.

A primeira colheita do *A. blazei*, desde que haja temperatura apropriada para a colonização do micélio na camada de cobertura (28°C), pode ocorrer já à partir de 18 dias, estendendo-se até 35 dias após a cobertura do composto (BRAGA, 1999; PARK, 2001; CAVALCANTE, 2003; KOPYTOWSKI FILHO et al., 2006). Porém, em épocas de temperaturas reduzidas (outono e inverno) e em cultivos onde não há um processo de indução controlada, isto é, temperatura constante e aeração reduzida é comum ter-se a primeira colheita somente após 40 dias da cobertura do composto.

No cultivo de *A. bisporus*, com um sistema de manejo de indução, é comum a primeira colheita ocorrer entre 15 a 20 dias após a cobertura do composto. Neste sentido, Flegg (1980), avaliou o período e temperaturas de indução na produtividade do *A. bisporus*. Este autor obteve início de colheita, em média, aos 20,3 dias após a cobertura quando se reduziu a temperatura do ambiente de 24°C para 16°C, por 4 dias. Neste mesmo estudo, o período mais longo para o início do primeiro fluxo de colheita, ocorreu aos 23,9 dias, quando se reduziu a temperatura de 24°C para 16°C e, manteve-se constante até o final do fluxo de colheita.

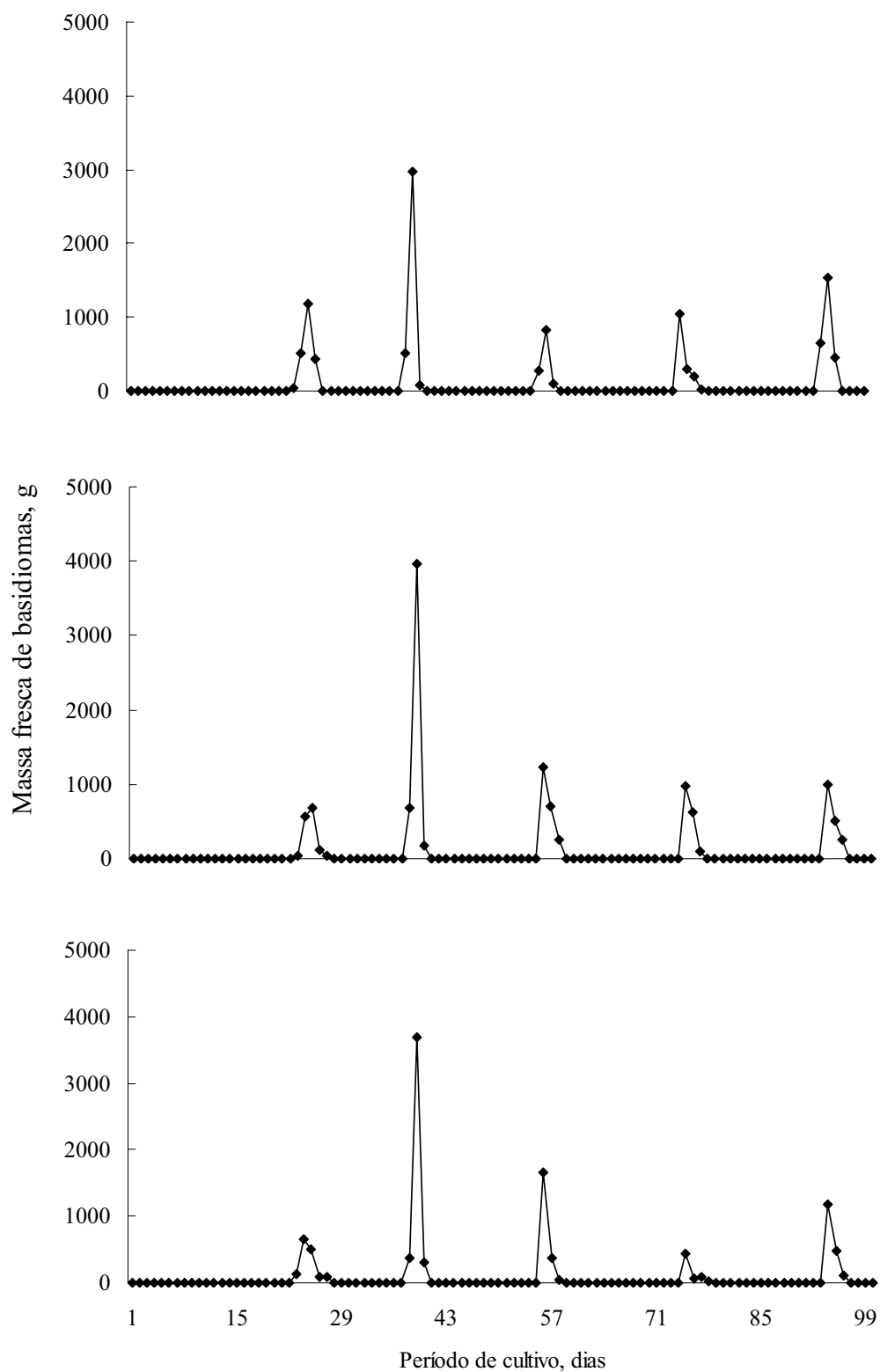


Figura 45. Produção diária de basidiomas frescos da linhagem ABL 04/44 de *Agaricus blazei* com três tratamentos (CI, composto sem suplementação, FSI e CFI, farelo de soja e Champ Food na inoculação, respectivamente), no período de 100 dias de cultivo.

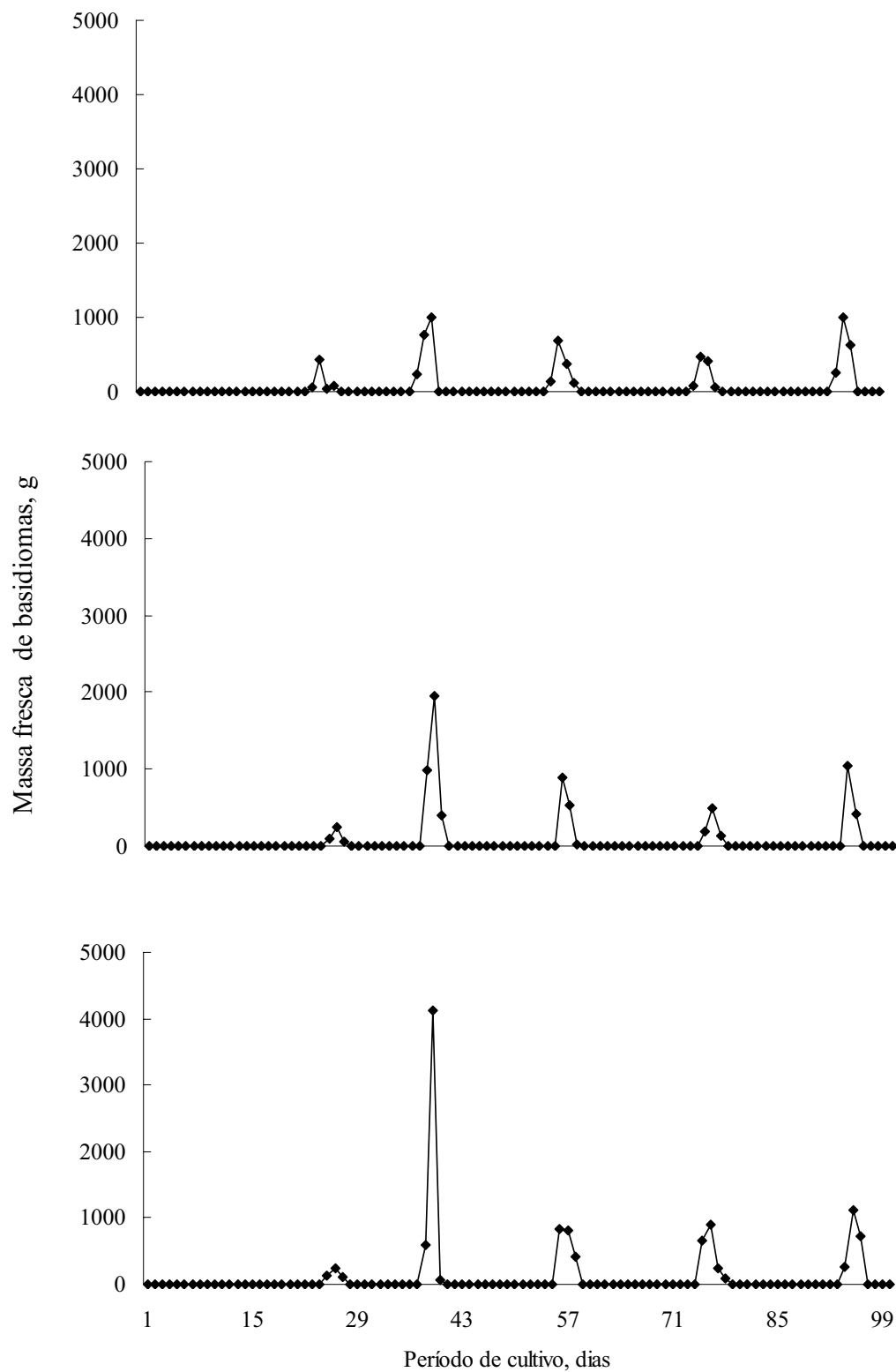


Figura 46. Produção diária de basidiomas frescos da linhagem ABL 04/44 de *Agaricus blazei*, com três tratamentos (CCO, composto fragmentado sem suplementação, FSC e CFC, farelo de soja e Champ Food na pós colonização, respectivamente), no período de 100 dias de cultivo.

A Figura 47 apresenta a massa média de basidiomas (g) em função do tipo de suplemento adicionado ao composto na inoculação e do fluxo de colheita. A Figura 48 apresenta a massa média de basidiomas (g) em função do tipo de suplemento adicionado ao composto na pós-colonização e do fluxo de colheita.

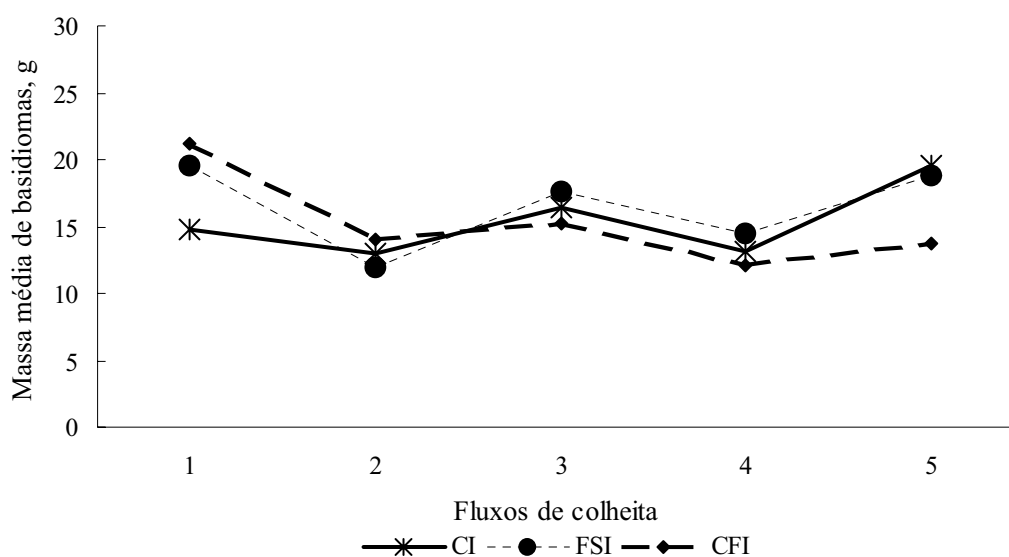


Figura 47. Massa média de basidiomas (g) em função do tipo de suplemento adicionado ao composto na inoculação e o fluxo de colheita no cultivo de *Agaricus blazei*.

Onde: CI (composto sem suplementação na inoculação), FSI (farelo de soja na inoculação do composto), CFI (Champ food® na inoculação).

Na Figura 48, observa-se que o maior massa média de basidiomas (Pmb) no primeiro fluxo, foi o tratamento FSC, com 26,66 g e o menor foi o CI, com 14,82 g. A maior Mmb de todos os tratamentos foi de 20,29 g, e ocorreu no primeiro fluxo de colheita. Para os para o 2º, 3º, 4º e 5º fluxo obteve-se 13,96, 17,41, 13,86 16, 62 g, respectivamente. Para os tratamentos CCO, FSC, CFC, os Mmb foram de 16,98, 17,54, 16,94 e g.

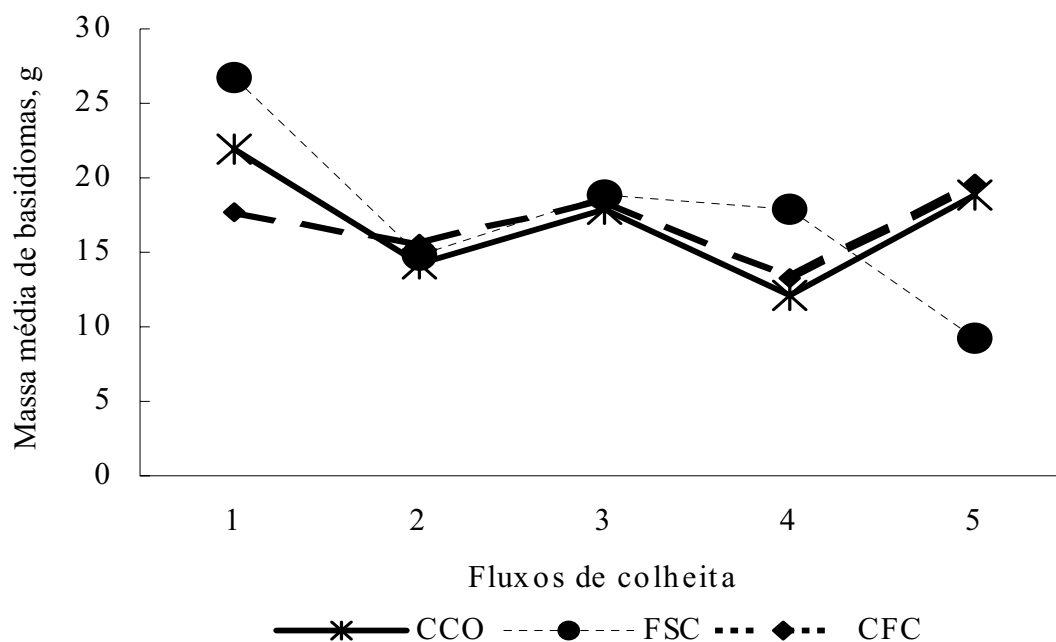


Figura 48. Massa média de basidiomas (g) em função do tipo e época da adição de suplemento ao composto pós-inoculação e o fluxo de colheita no cultivo de *Agaricus blazei*.

Onde: CCO (composto colonizado sem suplementação), FSC (farelo de soja pós-colonização) e CFC (Champ food[®] pós-colonização).

6.3. Experimento 3

6.3.1. Produtividade e Eficiência Biológica

A Tabela 36 apresenta a produtividade e eficiência biológica dos compostos T1, T2 e T3, após 177 dias de cultivo em três ambientes de cultivo.

Tabela 36. Produtividade (P, %) e Eficiência biológica (EB, %) de três compostos (T1, T2 e T3) em dois ambientes de cultivo (câmara climatizada e estufa comercial) da linhagem ABL 99/30 de *Agaricus blazei*.

Composto	Câmara climatizada		Estufa comercial	
	P, %	EB, %	P, %	EB, %
T1	9,6A	27,5A	8,3A	23,8A
T2	9,9A	34,2A	6,2A	21,1A
T3	8,8A	34,9A	7,2A	28,7A
CV, %	20,08	21,59	55,89	57,29

(1) Compostos: T1 (orgânico), T2 (semi-sintético) e T3 (sintético).

(2) Para cada coluna, médias seguidas por letras iguais na coluna não diferem significativamente entre si (Tukey, 5%).

Observa-se pela Tabela 36, que a Câmara climatizada apresentou os melhores resultados de Produtividade e Eficiência biológica em relação à estufa comercial.

Observa-se na câmara climatizada que os compostos não apresentaram diferença, porém com tendência do composto T1 e T2 serem mais produtivos que o T3.

Na estufa comercial, também não houve diferença entre si, porém, neste ambiente, o composto mais produtivo foi o T1, seguido do T3 e T2. É possível que em função deste ambiente ser mais susceptível às variáveis ambientais, além de obter menores produtividades, o cultivo em estufa comercial obteve resultado adverso em relação a um ambiente controlado. Ao se comparar a Eficiência biológica, o composto T1 tendeu a obter o menor valor dentre os tratamentos, isto é, apresentou o menor aproveitamento da matéria seca do composto para a formação dos basidiomas.

Era de se esperar que os composto mais produtivo apresentasse também a maior eficiência biológica, porém, neste experimento ocorreu o inverso. O composto T1,

que, em ambos os ambientes de cultivo foi mais produtivo, apresentou menor eficiência biológica em relação aos compostos T2 e T3. Neste sentido, o composto T1, com teor mais reduzido de carbono em comparação aos compostos T2 e T3, possuía maior teor de cinzas totais. Deste modo, infere-se que o aproveitamento de energia e nutrientes do micélio de *A. blazei* para a formação dos basidiomas no composto T1, foi mais reduzido em função da reduzida disponibilidade dos mesmos.

As Figuras 49 e 50, apresentam dados de produção diária de basidiomas frescos, em dois ambientes, durante 177 dias de cultivo

Comparando-se as Figuras 49 e 50, observa-se fluxos de colheita mais curtos e sincronizados (período entre fluxos de colheita determinados) quando o *A. blazei* foi cultivado em câmara climatizada (Figura 50). O motivo deste comportamento obtido neste ambiente controlado, pode estar relacionado ao sistema de indução “rápida” e precisa onde a temperatura média dos composto foi reduzida de 28°C para 20°C em apenas 24 horas. O primeiro fluxo de colheita, independentemente do tipo de composto, iniciou-se aos 28 e 49 dias após a cobertura do composto, em câmara climatizada e em estufa modelo comercial, respectivamente.

Após, o período dos fluxos de colheita na câmara climatizada duraram de 7 a 13 dias, com intervalos entre fluxos de 3 a 11 dias. Vale salientar que, o alongamento dos intervalos entre fluxos, à partir do segundo fluxo de colheita, deveram-se em parte a problemas técnicos nos equipamentos da câmara climatizada, em pelos menos dois períodos de início de indução e intervalos entre fluxos (ausência de energia por 10 a 24 horas e problemas no sistema de produção de vapor), resultaram em primórdios deformados ou abortados.

Na estufa comercial, a influência do ambiente externo foi parcial. A diferença de temperatura máxima e mínima externa à estufa, foi de até 14°C num mesmo dia, enquanto que as temperaturas internas da estufa acusaram uma diferença máxima entre temperatura máxima e mínima de até 9°C, permanecendo na faixa 13°C a 22°C. Deste modo, infere-se que as temperaturas não foram suficientes para uma indução homogênea de toda a massa de composto, isto é, diferentes partes puderam atingir as temperaturas necessárias ou permanecendo determinados períodos mais curtos ou longos, em temperaturas não adequadas.

Pesquisas sobre o aumento de produtividade, massa média de basidiomas e precocidade do início do 1º fluxo têm sido constantes para o *A. bisporus*. Neste sentido, Flegg (1980) avaliou efeitos de temperaturas de indução (redução de 24°C para 16°C), tempo de exposição dos compostos à estas temperaturas (temperatura contínua ou não, ou seja, de 4 e 6 dias) e o tamanho dos primórdios para o início do processo de 1º indução (com 2 mm de diâmetro e dois dias após atingir 2 mm) sobre a produtividade de *A. bisporus*. Quando os primórdios atingiram 2 mm de diâmetro e manteve-se a temperatura de indução constante a 16°C até o final do fluxo, observou-se tempo médio de 22,4 dias para o 1º fluxo de colheita bem como o massa média de basidiomas menor (9,6 g). Por outro lado, os melhores resultados obtidos foram aos 20,3 dias, quando manteve-se a temperatura à 16°C por 4 dias, seguido da elevação a 24°C.

Neste Experimento 3, podemos relacionar maiores produtividades, fluxo de colheita mais rápido e concentrado e, com possibilidade de período de cultivo mais rápido, quando o cultivo do *A. blazei* é conduzido em ambiente mais controlado.

6.3.2. Teores de elementos metálicos e As

A Tabela 37 apresenta os teores de As, Cd, Cr, Cu, Hg, Pb, Zn e Ni em três tipos de composto (T1, T2 e T3).

Tabela 37. Teores médios de As, Cd, Cr, Cu, Hg, Pb, Zn e Ni, em basidiomas de *Agaricus blazei* (linhagem ABL99/30), em três tipos de composto (T1, T2 e T3) (média de três repetições).

Composto ⁽¹⁾	Elemento							
	As	Cd	Cr	Cu	Hg	Pb	Zn	Ni
	-----Teor, mg kg ⁻¹ -----							
T1	nd ⁽²⁾	0,013A ⁽³⁾	nd	29,000A	0,016A	0,856A	58,216A	nd
T2	nd	0,006A	nd	30,083A	0,133A	nd	67,896A	nd
T3	nd	nd	nd	30,550A	0,056A	1,510A	76,060A	nd

CV, %	---	85,23	---	8,65	77,23	110,0	12,01	

(1) Compostos: T1 (orgânico), T2 (semi-sintético) e T3 (sintético).

(2) nd: não detectável.

(3) Para cada coluna, médias seguidas por letras iguais na coluna, não diferem significativamente entre si (Tukey, 5%).

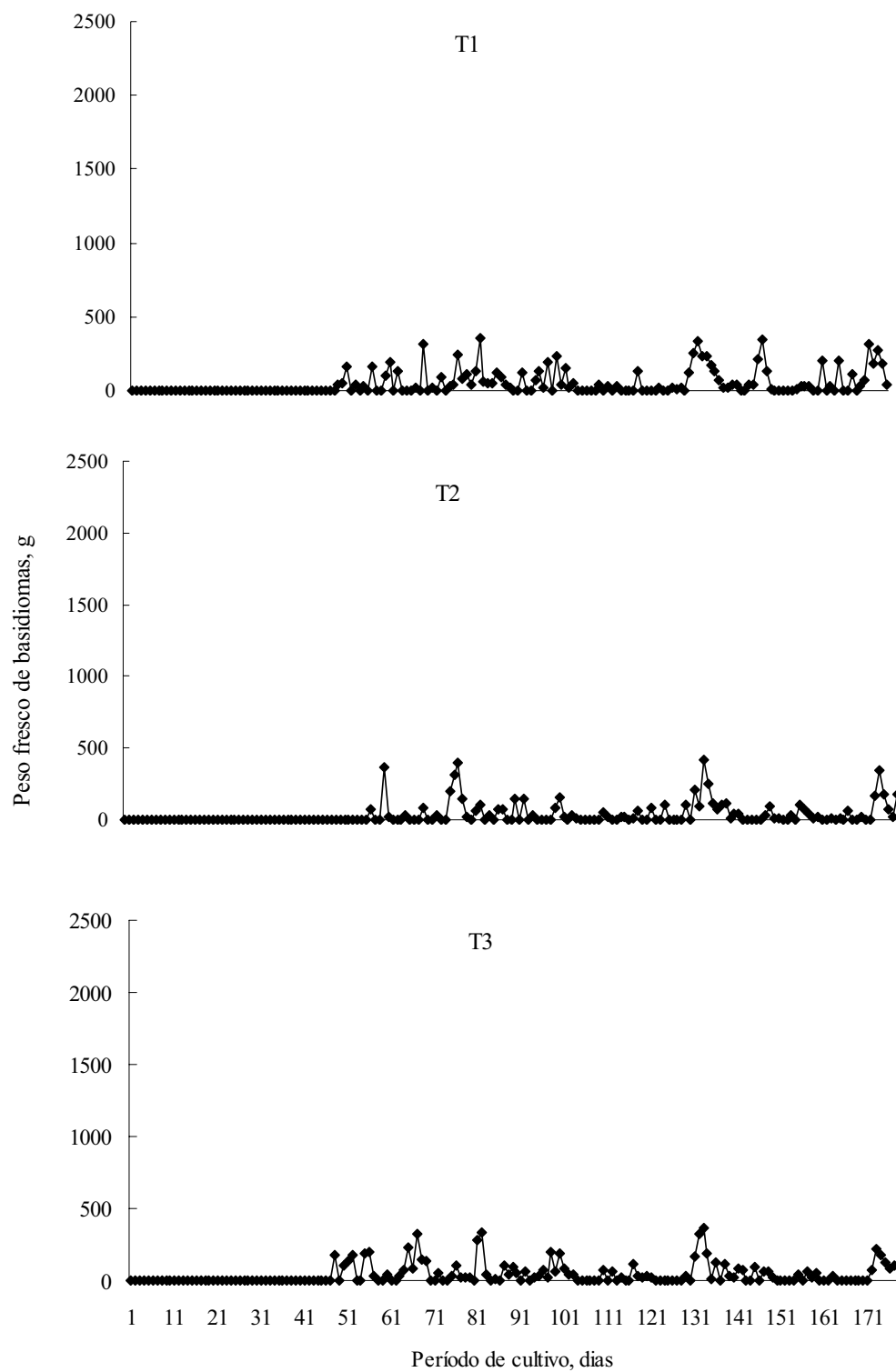


Figura 49. Produção de basidiomas frescos em três compostos (T1, T2 e T3), no período de cultivo de 177 dias, em ambiente parcialmente controlado (Estufa modelo comercial).

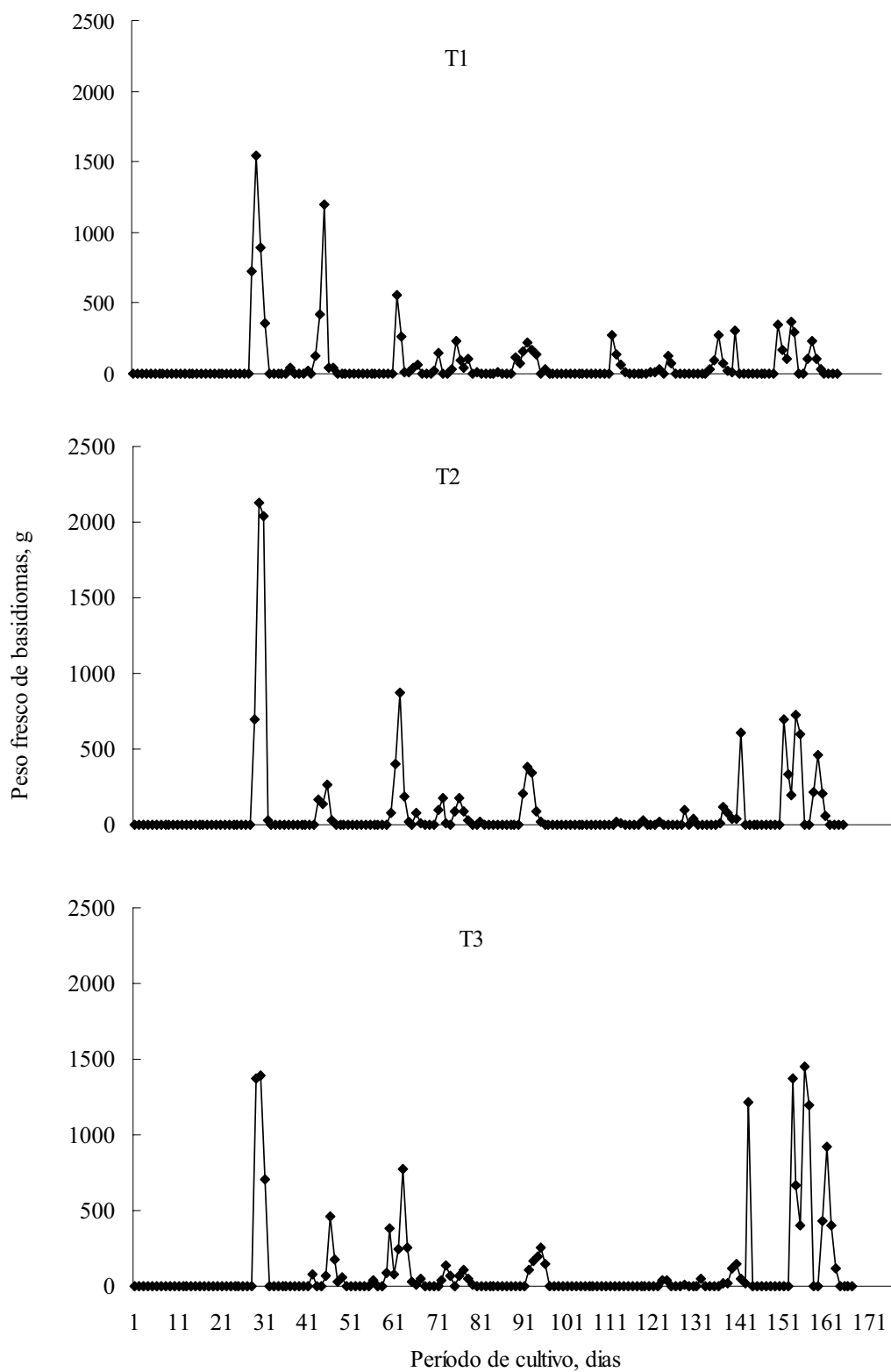


Figura 50. Produção de basidiomas frescos em três compostos (T1, T2 e T3), no período de cultivo de 177 dias, em ambiente controlado (Câmara climatizada Dalsem).

A Tabela 38 apresenta os teores de As, Cd, Cr e Cu; em basidiomas de *A. blazei* (linhagem ABL99/30), em três tipos de composto (T1, T2 e T3).

Tabela 38. Teores de As, Cd, Cr e Cu em basidiomas de *A. blazei* (ABL99/30), em três tipos de composto (T1, T2 e T3).

Tipo de composto ⁽¹⁾	Elemento			
	As	Cd	Cr	Cu
	-----Teor, mg kg ⁻¹ -----			
T1	nd ⁽²⁾	0,086A ⁽³⁾	nd	68,303A
T2	nd	nd	nd	58,370A
T3	nd	0,036A	nd	44,930A
CV, %	---	138,79	---	11,66

(1) Compostos: T1 (orgânico), T2 (semi-sintético) e T3 (sintético).

(2) nd: não detectável.

(3) Para cada coluna, médias seguidas por letras iguais na coluna, não diferem significativamente entre si (Tukey, 5%).

As Tabelas 39, apresenta os teores de Hg, Pb, Zn e Ni, em basidiomas de *A. blazei* (ABL99/30), em três tipos de composto (T1, T2 e T3) enquanto a Tabela 40 apresenta o fator de acumulação de As, Cd, Cr, Cu, Hg, Pb, Zn e Ni.

Tabela 39. Teores de Hg, Pb, Zn e Ni, em basidiomas de *A. blazei* (linhagem ABL99/30), em três tipos de composto (T1, T2 e T3).

Tipo de composto ⁽¹⁾	Elemento			
	Hg	Pb	Zn	Ni
	-----Teor, mg kg ⁻¹ -----			
T1	0,026	6,790A ⁽³⁾	399,000A	nd
T2	nd ⁽²⁾	4,990A	352,560A	nd
T3	nd	0,970A	291,300A	nd
CV, %	---	102,790	14,03	---

(1) Compostos: T1 (orgânico), T2 (semi-sintético) e T3 (sintético).

(2) nd: não detectável.

(3) Para cada coluna, médias seguidas por letras iguais não diferem significativamente entre si (Tukey, 5%).

Tabela 40. Fator de acumulação (FA) As, Cd, Cr, Cu Hg, Pb, Zn e Ni em basidiomas de *Agaricus blazei* (linhagem ABL 99/30).

Composto	As	Cd	Cr	Cu	Hg	Pb	Zn	Ni
T1	nd ⁽¹⁾	6,61	nd	2,48	16,25	40,74	5,18	nd
T2	nd	nd	nd	1,85	nd	+	3,4	nd
T3	nd	+ ⁽²⁾	nd	2,98	nd	22,55	6,69	nd

(1) nd: não detectável.

(2) “+”: quando o FA não foi definido devido aos teores nos compostos não terem sido detectados.

Observa-se nas Tabelas 38, 39 e 40, que não detectou-se nos basidiomas teores de As ($< 0,006$), Ni (teores $< 0,005 \text{ mg kg}^{-1}$) e Cr ($< 0,004 \text{ mg kg}^{-1}$).

As possíveis fontes de contaminação de As para os compostos foram o calcário calcítico e o gesso, apresentando teores de $167,4 \text{ mg kg}^{-1}$ e $26,41 \text{ mg kg}^{-1}$, enquanto o solo de preparo da camada de cobertura e carvão, apresentaram teores de $0,148 \text{ mg kg}^{-1}$ e $559,2 \text{ mg kg}^{-1}$.

Para o Ni, a única fonte de Ni detectável nos ingredientes foi o gesso com teor de $2,17 \text{ mg kg}^{-1}$, enquanto para os materiais da camada de cobertura, o solo apresentou teor de $0,148 \text{ mg kg}^{-1}$.

No caso do Cr, os teores do calcário calcítico e gesso, com $4,05$ e $0,3465 \text{ mg kg}^{-1}$, respectivamente, não afetaram os teores nos basidiomas.

Não houve diferença significativa nos teores de Cd nos basidiomas produzidos nos compostos T1 e T3, porém o basidioma produzido no composto T1 tendeu a apresentar teor médio mais elevado, isto é, $0,086 \text{ mg kg}^{-1}$, em comparação aos produzido no composto T3, que apresentou teor de $0,036 \text{ mg kg}^{-1}$. Com relação ao fator de acumulação do Cd duplicou em basidiomas cultivados no composto T1 em relação ao composto T3 e para os basidiomas produzidos no composto T2.

O teor de Cu não apresentou diferença nos basidiomas, porém seus e seus fatores de acumulação apresentaram-se relativamente baixos, isto é, com $2,98$, $2,48$ e $1,85$ para os basidiomas cultivados nos compostos T1, T2 e T3, respectivamente.

Os teores de Cu dos compostos apresentaram-se elevados em função da maioria dos ingredientes adicionados aos compostos possuírem teores de Cu relativamente altos, principalmente os farelos orgânico, o convencional e a palha de capim coast-cross, com teores de 36,57, 34,77 e 22,26 mg kg⁻¹, respectivamente.

Nos basidiomas, observou-se teores de Hg somente no basidioma produzido no composto T1. Segundo a Tabela 8, as fontes potenciais de Hg para os compostos deste experimento foram os farelos orgânico e convencional e, a palha de coast-cross com teores de 0,016, 0,033 e 0,036 mg kg⁻¹, respectivamente.

Não houve diferença no teor de Pb dos basidiomas, mas com os teores de Pb mantendo esta ordem: T1>T2>T3. De outro modo, fatores de acumulação apresentaram-se elevados, isto é, 40,7, 0,74 e 22,55, para os basidiomas produzidos nos compostos T1, T2 e T3, respectivamente.

7. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos e de acordo com a condução dos experimentos propostos, conclui-se que.

- O ciclo de cultivo de *A. blazei* é mais curto, produtivo e com fluxos mais definidos quando desenvolvido em ambiente controlado do que em ambiente parcialmente controlado.

- A acumulação de elementos metálicos nos basidiomas de *A. blazei*, varia em função do segmento do basidioma (píleo ou estípete), fluxo de colheita; formulação e procedência dos ingredientes dos compostos, ou seja, dos tipos de compostos.

- Há uma tendência de acumulação maior de elementos metálicos no píleo do que no estípete.

- Os teores de elementos metálicos nos basidiomas, não são proporcionais aos teores destes nos ingredientes dos compostos.

- Não houve efeito na produtividade composto com ingredientes com certificação orgânica em relação aos compostos preparados com ingredientes convencionais.

- Os maiores teores de Cd no píleo, foram determinados quando o *A. blazei* foi produzido em composto orgânico certificado.

8. REFERÊNCIAS

- ALONSO MOLNAR, A. *Efeito da camada de cobertura na produtividade e acúmulo de metais pesados em Agaricus blazei*. 2002. 100 f. Tese (Doutorado em Agronomia)-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2002.
- AMAZONAS, M. A. L. A. *Agaricus brasiliensis* (= *Agaricus blazei* ss. Heinem.): a última visão sobre a polêmica questão da identidade de um dos mais promissores cogumelos comercial. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE COGUMELOS NO BRASIL, 2., 2004, Brasília. *Anais...* Brasília/DF: EMBRAPA, CENARGEN, 2004. p. 81-82
- ANDRADE, C. A.; ABREU, M. F.; ANDRADE, J. C. Determinação de cobre, ferro, manganês, zinco, cádmio, cromo, níquel e chumbo em solos usando a solução de DTPA em pH 7,3. In: RAIJ, B.; ANDRADE, J. C.; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J. A. *Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais*. Campinas: Instituto Agrônomo, 2001. cap. 16, p. 240-250.
- AS, A. M. M.; DULLEMAN, E. Mechanization and equipment. In: GRINSVEN, L. J. L. D. (Ed.) *The cultivation of mushroom*. Sussex: Darlington Mushroom Laboratories, 1988. p. 309-59.
- BERTON, R. S. Disponibilidade e toxicidade de metais no solo. In: MELO, I. S., SILVA, C. M. M. S.; SCRAMIN, S.; SPESSOTO, A. (Ed.). *Biodegradação*. Jaguariúna: EMBRAPA Meio Ambiente, 2001. p. 107-113.
- BONONI, V. L. R.; CAPELARI, M.; MAZIERO, R.; TRUFEM, S. F. B. R. *Cultivo de cogumelos comestíveis*. São Paulo: Ícone, 1995. 206 p.
- BRAGA, G. C. *Produtividade de Agaricus blazei Murrill em função do ambiente de cultivo, massa do substrato e camada de cobertura*. Botucatu. 1999. 73 f. Tese (Doutorado em Agronomia)-Faculdade de Ciências Agrônomicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1999.
- BRAGA, G. C.; EIRA, A. F.; CELSO, P. G.; COLAUTO, N. B. *Manual do cultivo de Agaricus blazei Murrill, cogumelo-do-sol*. Botucatu: Fundação de Estudos e Pesquisas Agrícolas e Florestais, 1998. 44 p.
- BRASIL. Projeto de lei 659-A-1999, de 21 de julho de 2000. Dispõe sobre agricultura orgânica, altera dispositivo de lei de 7802 de 11 de julho de 1989 e dá outras providências. Brasília, 21 de julho de 2000. Disponível em: <<http://www.ibd.com.br/legislacao/659a.htm>>. Acesso em: 24 mar. 2003.
- CARVALHO, W. A.; ESPÍNDOLA, C. R.; PACCOLA, A. A. Legenda atualizada de solos da Fazenda Lageado – Estação Experimental “Presidente Médici”. *Boletim. Científico*. Botucatu, n.1, 1983. 95 p. (Legenda Complementar Atualizada, 2000).

CAVALCANTE, J. L. R. *Avaliação da produtividade do cogumelo Agaricus blazei (Murrill) ss. Heinemann em dois ambientes de cultivo e três tipos de camada de cobertura no município de Guaramiranga-Estado do Ceará*. 2003. 83 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2003.

CELSONO, P. G. *Interações entre Agaricus bisporus e microrganismos termófilos isolados do substrato de cultivo do cogumelo*. 1999. 84 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia)-Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 1999.

CHO, S. B. *Mushroom growers handbook 1 (Oyster mushroom cultivation)*. Seul: Mushword, 2004. p. 1-14.

DAROLT, M. R. *As dimensões da sustentabilidade: um estudo da agricultura orgânica na região metropolitana de Curitiba-PR*. 2000. 310 f. Tese (Doutorado em Meio Ambiente e Desenvolvimento)-Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2000.

DEMIRBAS, A. Heavy metal bioaccumulation by mushroom from artificially fortified soils. *Food Chemistry*, Kidlington, v. 74, p. 293-301, 2001.

DEMIRBAS, A.. Trace metal concentrations in ashes from various types of biomass species. *Energy Sources*, Philadelphia, v. 25, 743-751, 2004.

DENADAI, R.; ALVES DE LIMA, P. L.; SUGUI, M. M.; EIRA, A. F.; SALVADORI, D. M. F; SPEIT, G., RIBEIRO, L. R. Antimutagenic effect of *Agaricus blazei* Murrill mushroom on the genotoxicity induced by cyclophosphamide. *Mutation Research*, Amsterdam, v. 496, p. 15-21, 2001.

DHAR, B. L. Mushroom composting for *Agaricus bisporus/bitorquis*. In: NAIR, M. C. (Ed.) *Advances in mushroom biotechnology*. Jodhpur: Scientific Publishers, 1994. p. 84-90.

DHAR, B. L.; AHLAWAT, O. P.; NATH, A.; DUBEY, J. K. Organic mushroom production through improved substrate fermentation process and cultural practices In: ROMAINE, C. P. (Ed.) *Science and cultivation of edible Fungi*. University Park: Penn State University, 2004. p. 289-296.

DUFFUS, J. H. et al. Heavy metals: a meaningless term?. *Pure Applied Chemistry*, Edinburgh, v. 74, n. 5, p.793-807, 2002.

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

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

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION/WORLD HEALTH ORGANIZATION (Codex Alimentarius). Codex Stan 230-2001, 2001. Disponível em: <www.codexalimentarius.net/download/standards/372/CXS_230f.pdf>. Acesso em: 5 maio 2006.

FERMOR, T. R.; RANDLE, P. E.; SMITH, J. F. Compost as a substrate and its preparation. In: FLEGG, P. B.; SPENCER, D. M.; WOOD, D. A. (Ed.) *The biology and technology of the cultivated mushroom*. Chichester: John Wiley, 1985. cap. 6, p. 81-109.

FLEGG, P. B. Temperature-induced synchronization of sporophore production in the mushroom *Agaricus bisporus*. *Scientia Horticulturae*, Amsterdam, v. 13, p. 307-314, 1980.

FLEGG, P. B.; SPENCER, D. M.; WOOD, D. A. (Ed.) *The biology and technology of the cultivated mushroom*. Chichester: John Wiley, 1985. 347 p.

GERRITS, J. P. G. Nutrition and compost. In: GRIENSVEN, L. J. L. D. (Ed.) *The cultivation of mushrooms*. Horst: Mushroom Experimental Station, 1988. p.29-72.

GERRITS, P. G., AMSING, J. G. M. Water relations in indoor compost. In: MAHER, M. J. (Ed.) *Science and cultivation of edible fungi*. Rotterdam: Balkema, 1991 v. 1, p. 181- 6.

GRIENSVEN, L. J. L. D. (Ed.) *The cultivation of mushrooms*. Horst: Mushroom Experimental Station, 1988. 515 p.

IBD: Instituto biodinâmico. Disponível em: <<http://www.ibd.com.br/diretrizes/diretrizesIBD13ed.pdf>>. Acesso em: 24 mar. 2001.

IWADE, I.; MIZUNO, T. V. Cultivation of kawariharatake (*Agaricus blazei* Murill). *Food Review International*, Monticello, v.13, p. 383-90, 1997.

KALAC, P.; SVOBODA, L. A review of trace element concentrations in edible mushrooms. *Food Chemistry*, Kidlington, v. 69, p. 273-281, 2000.

KALAC, P.; SVOBODA, L.; HAVLICKOVA, B. Contents of detrimental metals mercury, cadmium and lead in wild growing edible mushrooms: a review. *Energy Education Science and technology*, Trabzon, v. 13, n. 1, p. 31-38, 2004.

KAWAGUISHI, H.; INAGAKI, R.; KANAO, T.; MIZUNO, T.; SHIMURA, K.; ITO, H., HAGIWARA, T.; NAKAMURA, T. Fractionation and antitumor activity of the water-insoluble residue of *Agaricus blazei* fruiting bodies. *Carbohydrate Research*, Amsterdam, v.186, p.267-73, 1989.

KERRIGAN, R. W. *Agaricus subrufescens*, a cultivated edible and medicinal mushroom, and its synonyms. *Mycologia*, Philadelphia, n. 97, p. 12-24, 2005.

KIEHL, E. J. *Manual de compostagem: maturação e qualidade do composto*. Piracicaba: E. J. KIEHL, 1998. 171 p.

KOPYTOWSKI FILHO, J. Relação C/N e proporção de fontes nitrogenadas na produtividade de *Agaricus blazei* Murrill e poder calorífico do composto. 2002. 101 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia)-Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2002.

KOPYTOWSKI FILHO, J. Compostagem orgânica e produção de *Agaricus blazei*. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE COGUMELOS NO BRASIL, 2., 2004, Brasília. *Anais...* Brasília/DF: EMBRAPA, CENARGEN, 2004. p. 55-56.

KOPYTOWSKI FILHO, J.; MINHONI, M. T. A. C/N ratio on yield of *Agaricus blazei* Murrill ss. Heinemann. In: ROMAINE, C. P. (Ed.) *Science and cultivation of edible Fungi*. University Park: Penn State University, 2004. p. 213-220.

KOPYTOWSKI FILHO, J.; MINHONI, M. T. A.; RODRIGUEZ ESTRADA, A. *Agaricus blazei* – “The Almond Portobello”: cultivation and commercialization. American Mushroom Institute. *Mushroom News*, Washington DC, v. 54, n. 2, p. 22-28, 2006.

KURTZMAN, R.. Dolomite upsets the carbon dioxide balance. In: MAHER, M.J. (Ed.) *Science and cultivation of edible fungi*. Rotterdam: Balkema, 1991. v. 2, p.7 47-51.

LABORDE, J.; LANZI, G.; FRANCESCUTTI, B.; GIORDANI, E. Indoor composting: general principles and large scale development in Italy. In: CHANG, S. T.; BUSWELL, J. A.; CHIU, S. W. (Ed.) *Mushroom biology and mushroom products*. Hong Kong: Chinese University Press, 1993. p. 93-113.

SECRETARIA NACIONAL DE DEFESA AGROPECUÁRIA (Laboratório Nacional de Referência Vegetal). *Análise de fertilizantes e inoculantes: métodos oficiais*. Brasília, 1988. 104 p.

LATTIF, L. A.; DARAN, A. B. M.; MOHAMED, A. B. Relative distribution of minerals in the pileus and stalk of some selected edible mushrooms. *Food Chemistry*, Kidlington, v. 56, p. 115-121, 1996.

LINCOFF, G. H. *Field guide to mushroom*. New York: Alfred A. Knopf, 1981. p. 11.

LOON, P. C. C.; SWINKELS, H. A. T. I.; RIESVEN, L. J. L. D. Dry matter content in mushrooms (*Agaricus bisporus*) as an indicator for mushroom quality. In: GRIESVEN, L. J. L. D. (Ed.) *Science and cultivation of edible fungi*. Rotterdam: Balkema, 2000. v. 2, p. 507-513.

LOON, P. C. C.; BAAR, J.; STRAATSMA, G. Production of organic compost for *Agaricus bisporus*. In: ROMAINE, C. P. (Ed.) *Science and cultivation of edible Fungi*. University Park: Penn State University, 2004. p. 247-252.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA S. A. *Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações*. 2. ed. Piracicaba: POTAFOS, 1997. p. 231-313.

MAZIEIRO, R. *Gli Agaricus*. Milano:dalla Natura, 2005. p. 56-7.

MENDONÇA, M.; KASUYA, M. C.; CADORIN, A.; VIEIRA, A. J. *Mushroom growers handbook 2 (Shiitake cultivation)*. Seul: Mushword, 2005. p. 246-57.

MENOLI, R. C. R.; MANTOVANI, M. S.; ALVES DE LIMA, P. L.; RIBEIRO, L. R., SPEIT, G.; JORDAO, B.Q. Antimutagenic effects of the mushroom *Agaricus blazei* Murrill extracts on V79 cells. *Mutation Research*, Amsterdam, v. 496, p. 5-13, 2001.

MILLER, F. C.; HARPER, E. R.; MACAULY, 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, p. 287-96, 1990.

MILLES, P. G., CHANG, S. T. *Mushroom biology: concise basics and current developments*. London: World Scientific, 1997. 177 p.

MINHONI, M. T. A.; KOPYTOWSKI FILHO, J.; ANDRADE, M. C. N. *Cultivo de Agaricus blazei Murrill ss. Heinemann*. 3. ed Botucatu: Fundação de Estudos e Pesquisas Agrícolas e Florestais, 2005. 101 f.

MIZUNO, M.; MORIMOTO, M.; MINATAC, K.; TSUCHIDA, H. Polysaccharides from *Agaricus blazei* stimulate lymphocyte T-cell subsets in mice. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, Tóquio.v.62, p.434-7, 1998.

MURRILL, W. A. New Florida Fungi. *Journal of the Florida Academy of Sciences*, Orlando, v. 8, p. 191-98, 1945.

NASCIMENTO, J. S. Etiologia, controle e demanda de energiana prevenção da falsa trufa (*Diehliomyces microsporus*) em cultivo de *Agaricus blazei*. 2003.115 f. Tese (Doutorado em Agronomia)-Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2003.

NASCIMENTO, J. S.; EIRA, A. F. Ocorrencia of false truffle (*Dielhiomyces microsporus*) and damage on the Himematsutake medicinal mushroom (*Agaricus brasiliensis* S. Wasser et al.). *International Journal of Medicinal Mushroom*, . v. 5, n. 1, p. 87-94, 2003.

NEVES, M. A. *Caracterização ecológica, fisiológica e genética de Agaricus blazei Murrill através de estirpes provenientes de diferentes empresas de produção de cogumelos*. 2000. 69 f. Dissertação (Doutorado em Agronomia)–Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2000.

OEI, P. *Mushroom cultivation: appropriate technology for mushroom growers*. Backhuys Publishers: Leiden, 2003. 426 p.

OSAKI, F. *Calagem e adubação*. Curitiba: F. OSAKI, 1990. p. 44-57.

PARK, J. Characteristics and cultivation echnology of *Agaricus blazei*. Seul: Mushworld, 2001. Disponível em: <www.worldmush.com>. Acesso em: 10 abr. 2006.

PETRENKO, F.; BISCO, N. A. Influence of the addition of soybean supplements to the compost on the yield of *Agaricus bisporus* In: ROMAINE, C. P. (Ed.) *Science and cultivation of edible Fungi*. University Park: Penn State University, 2004. p. 353-358.

RACZ, L.; OLDAL, V. Investigation of uptake processes in a soil/mushroom system by AES and AAS methods. *Microchemical Journal*, Orlando, n. 67, p. 115-118, 2000.

RAIJ, B. et al. *Análise química para avaliação de fertilidade de solos tropicais*. Campinas: Instituto Agrônômico de Campinas, 2001. 285 p.

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

SARDELLA, A.; MATEUS, E. *Curso de química geral*. São Paulo: Ática, 1996. 117 p.

SCHILER, L. C.; SINDEN, J. W. Nutrient supplementation of mushroom of mushroom compost at spawning. *Mushroom Science*. n. 5, p. 150-164, 1962.

SHARMA, H. S. S. Biochemical and thermal analyses of mushroom compost during preparation. In: MAHER, M. J. (Ed.). *Science and cultivation of edible fungi*. Rotterdam: Balkema, 1991. v.1, p.169- 79.

SHARMA, H. S. S.; KILPATRICK, M.; LYONS, G.; MURRAY, J.; MOORE, S.; CHEUNG, L.; FINEGAN, K.; STURGEON, S.; MELLON, R. Changes in the quality of mushroom compost during the last decade. In: ROMAINE, C. P. (Ed.). *Science and cultivation of edible Fungi*. University Park: Penn State University, 2004. p. 229-239.

SIQUEIRA, P. Cogumelos e suas delícias. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE COGUMELOS NO BRASIL, 2., 2004, Brasília. *Anais...* Brasília/DF: EMBRAPA, CENARGEN, 2004. p. 141.

SNEDCOR, G. W. E.; COCHRAN, W. G. *Statiscal methods*. 6. ed. Ames: Iwoa State University, 1972. 325 p.

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

STRAATSMA, G. Processing and composition of mushroom compost. In: ROMAINE, C. P. (Ed.). *Science and cultivation of edible Fungi* University Park: Penn State University, 2004, p. 241-246.

SVOBODA, L.; KALAC, P.; SPICKA, J.; JANOUSKOVA, D. Leaching of cadmium and mercury from fresh and differently preserved edible mushroom, *Xerocomus badius*, during soaking and boiling. *Food Chemistry*, Kidlington, n. 79, p. 41-45, 2002.

VEDDER, P. J. C. *Cultivo moderno del champignon*. Madrid: Mundi Prensa, 1996. 369p.

VERBEKE, M. N.; OVERSTYNS, A.; KURTZMAN, R.. Interrelationships between activated charcoal, carbon dioxide, oxalate and iron chemistry for frutification of *Agaricus bisporus*. In: MAHER, M. J. (Ed.). *Science and cultivation of edible fungi*. Rotterdam: Balkema, 1991. v. 2, p. 737-47.

VIJAY, B.; GUPTA, Y. Microflora of *Agaricus bisporus* compost. In: NAIR, M. C. (Ed.). *Advances in mushroom biotechnology*. Jodhpur: Scientific Publishers, 1994. p. 91-9.

ZHANXI, L; ZANHUA, L. *Juncal technology*. Beijing: China Agricultural Sciencetech Press, 2001. p. 216-25.

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

WUEST, P.J. *Penn State handbook for commercial mushroom growers*. University Park: Penn State University, 1982. 129 p.

UNICORN: Embalagens especiais. Disponível em : < <http://www.unicornbags.com> >. Acesso em: 25 mar. 2006.