

MICROBIAL DIVERSITY IN A BAGASSE-BASED COMPOST PREPARED FOR THE PRODUCTION OF *AGARICUS BRASILIENSIS*

Cristina Ferreira Silva; Raquel Santos Azevedo; Claudia Braga; Romildo da Silva; Eustáquio Souza Dias; Rosane Freitas Schwan*

Departamento de Biologia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, Brasil

Submitted: September 03, 2008; Approved: May 03, 2009.

ABSTRACT

Edible mushrooms are renowned for their nutritional and medicinal properties and are thus of considerable commercial importance. Mushroom production depends on the chemical composition of the basic substrates and additional supplements employed in the compost as well as on the method of composting. In order to minimise the cost of mushroom production, considerable interest has been shown in the use of agro-industrial residues in the preparation of alternative compost mixtures. However, the interaction of the natural microbiota present in agricultural residues during the composting process greatly influences the subsequent colonisation by the mushroom. The aim of the present study was to isolate and identify the microbiota present in a sugar cane bagasse and coast-cross straw compost prepared for the production of *Agaricus brasiliensis*. Composting lasted for 14 days, during which time the substrates and additives were mixed every 2 days, and this was followed by a two-step steam pasteurisation (55 - 65°C; 15 h each step). Bacteria, (mainly *Bacillus* and *Paenibacillus* spp. and members of the Enterobacteriaceae) were the predominant micro-organisms present throughout the composting process with an average population density of 3×10^8 CFU/g. Actinomycetes, and especially members of the genus *Streptomyces*, were well represented with a population density of $2 - 3 \times 10^8$ CFU/g. The filamentous fungi, however, exhibited much lower population densities and were less diverse than the other micro-organisms, although *Aspergillus fumigatus* was present during the whole composting process and after pasteurisation.

Key words: *Agaricus brasiliensis*, cane sugar bagasse; microbial diversity

INTRODUCTION

The mushroom species *Agaricus brasiliensis* (Cogumelo do sol), *A. bisporus* (Champignon), *Pleurotus sajor-caju* (Oyster mushroom) and *Lentinula edodes* (Shiitake) are of important

economical value on account of their exquisite flavour and proven medicinal properties (27). Moreover, the organoleptic, nutritional and medicinal characteristics of *A. brasiliensis* (also known as *A. blazei*, but more correctly named *A.*

*Corresponding Author. Mailing address: Departamento de Biologia, Universidade Federal de Lavras, 37200-000, Lavras, MG, Brazil.; Phone: +55 35 3829 1614 Fax: +55 35 3829 1341.; E-mail: rschwan@ufla.br

subrufescens) have been recognised worldwide (2) and have assured a prime position for this species on the international market (12, 30, 33).

In Brazil, the culture of *A. brasiliensis* is relatively recent, whilst productivity is variable and depends mainly on the type of substrate employed (12). The agronomic techniques involved in the culture of *A. brasiliensis* are similar to those used for *A. bisporus* except for some modifications in the preparation of the compost. While wheat straw, straw-bedded horse manure, chicken manure and gypsum (15) are typically employed as substrates in the commercial culture of mushrooms, there is considerable interest in finding cheaper and more readily available materials for compost production in which the C:N ratio is between 25:1 and 50:1. In this context, the agricultural waste materials sugar-cane bagasse and coast-cross straw are considered to be potential substrates for the cultivation of *A. brasiliensis* in Brazil.

The composting process comprises two stages: in stage I the organic residues are wetted, distributed in layers and mixed periodically for up to 2 weeks, while in the second stage the resulting compost is pasteurised and conditioned (4). Although, the final quality of the compost is determined by the overall composting process, success in mushroom production depends largely on stage II (27). During pasteurisation, microbial activity produces large quantities of heat that serve to eliminate many pests, pathogens and competing micro-organisms. In the conditioning stage, the thermophilic micro-organisms (especially the Actinomycetes) multiply and convert free ammonia into microbial protein. These micro-organisms perform a crucial role in the preparation of an appropriate mushroom compost since residual ammonia is highly toxic and hinders mycelia growth of *Agaricus* species, while the synthesised protein is important for the nutrition of the cultivated fungi (4, 8, 31).

In view of the pivotal importance of the thermophilic micro-organisms that multiply and develop during stage I and act during stage II of composting, we undertook the task of evaluating the microbial diversity that occurs during the preparation of a compost based on sugar-cane bagasse and coast-cross straw.

MATERIALS AND METHODS

Preparation of compost and sampling

The raw materials present in the studied substrate mix were sugar cane (*Saccharum officinarum* L.) bagasse (45%), coast-cross (*Cynodon dactylon* L. Pers.) straw (45%) and wheat bran (10%), supplemented with simple superphosphate (1%), KCl (1%), lime (2%) and gypsum (2%). The bagasse and coast-cross straw were thoroughly wetted and piled in uniform layers onto a wooden pallet. The pile was mixed every 2 days over a 2 week period, with a further addition of water in order to maintain the humidity at 65%. During the second mixing, wheat bran and the inorganic supplements were added to the compost. Immediately before each mixing, the temperature was measured at a depth of 20 cm from the top of the pile and a substrate sample (120 g) was collected for microbiological analysis (counting and identification of the micro-organisms present). After each mixing, the humidity of the pile was determined and, if necessary, extra water was added to maintain humidity.

At the end of stage I (day 14), the compost was submitted to a two-step pasteurisation treatment in a chamber (2 m wide x 2 m high x 24 m deep) equipped with forced ventilation and steam injection systems. The time of pasteurisation (15 h) was measured from the moment the temperature in the chamber reached 60°C, although temperatures of up to 65°C were recorded during the treatment. After the first pasteurisation step, the compost was removed from the chamber, mixed thoroughly and then

submitted to a second pasteurisation step under identical conditions.

Microbiological analysis

A total of eight samples of substrate were obtained during stage I of composting before mixing the pile, on days 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 and 14, and one sample was collected immediately after the pasteurisation procedure. Cell suspensions were prepared by mixing aliquots (20 g) of the samples in 180 mL of water containing 1% peptone and 5% NaCl and shaking the mixture thoroughly for 5 min. Serial dilutions of each sample solution were prepared and inoculated onto Petri dishes containing the following selective media: (1) Martin's medium for the isolation of filamentous fungi [KH_2PO_4 (1.0 g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.5 g/L), peptone (5.0 g/L), dextrose (10.0 g/L), Rose Bengal dye (0.038 g/L), agar (20 g/L), bacitracin (20 mg/L)], (2) YEPG medium for yeast isolation [yeast extract (5.0 g/L), peptone (10 g/L), glucose (20 g/L), agar (20 g/L); adjusted to pH 4.5], (3) Aaronson's medium for the isolation of Actinomycetes [KNO_3 (2.0 g/L), casein (0.8 g/L), NaCl (2.0 g/L), K_2HPO_4 (2.0 g/L), agar (20.0 g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (50 mg/L), CaCO_3 (20.0 g/L), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (40.0 g/L)], and (4) nutrient agar for the isolation of bacteria [meat extract (3.0 g/L), peptone 5.0 g/L, agar (20.0 g/L)]. Plates were incubated at 40°C for 48 h, after which the number of colony forming units (CFU) were counted and the microbial content of each substrate sample expressed in terms of CFU/g. From each type of medium on which isolated colonies were detected, a number equal to the square root of the total colonies were taken at random (16), and purified and stored in 20% glycerol at - 80°C for subsequent identification.

Identification of bacteria

The size, shape, colour, height and edge characteristics of each purified colony were noted, and the colonies were

submitted to Gram-staining and assayed for motility and the presence of catalase before being replicated onto plate count agar (PCA) slants and stored in 20% glycerol at -80°C. Gram-negative bacteria were identified with the aid of Difco Bac-Tray Kits I, II and III used according to the manufacturer's instructions. Gram-positive bacteria were subdivided into sporulating and non-sporulating species by inducing spore release at 80°C for 10 min, and subsequently identified from the results of biochemical and motility assays (14,16). Identities were confirmed using API galleries (BioMerieux, Marcy-l'Etoile, France).

Identification of Actinomycetes

The genera of isolates were identified according to standard morphological methods (16, 28). Isolates were examined for their abilities to utilise a range of substrates (i.e. sucrose, lactose, D-fructose, galactose, d-mannose, D-maltose, xylose, L-arabinose, cellobiose, rhamnose, sodium acetate and m-inositol) as sole carbon source. Each filtered and sterilised carbon source was added to carbon utilisation agar (ISP medium 9) (28, 37) at a concentration of 1.0% (w/v), with the exception of sodium acetate which was employed at 0.1% (w/v). Positive (glucose at 1.0% w/v) and negative (unsupplemented ISP 9) controls were included, and growth was evaluated after 7, 14 and 21 days.

The formation of acids by Actinomycetes in the presence a carbon source was determined by inoculating a double washed (sterile distilled water) spore suspension of an isolate onto a plate containing a basal medium [$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (1.0 g/L), KCl (0.2 g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.5 g/L), bromocresol purple (0.07 g/L), agar (15 g/L)] supplemented with the substrate. The results were considered to be positive when the colour of the medium changed from blue to yellow. Pigment formation was determined on glycerol/asparagine agar (ISP medium 5) after 14 days of incubation, and diffusible pigments were classified as brown, yellow, green or orange.

Melanin production was detected on tyrosine agar (ISP medium 7), and the formation of the dark brown to black soluble melanin pigment was recorded after 4 days of incubation (28).

Identification of filamentous fungi

The initial identification of the genera of fungal cultures grown on potato dextrose agar medium (Merck) was performed by morphotype analysis (particularly colour and appearance) under the optical microscope (21). Members of the genus *Aspergillus* were identified by microscopic examination of spores and mycelia, and subsequently classified further into the sections *Circumdati* (6), *Flavi* (7), *Nigri* and *Aspergillus* (17). Fungal identities were verified on the basis of literature data (21, 22, 26).

RESULTS AND DISCUSSION

A total of 570 microbial colonies were isolated from the experimental samples and analysed. A wide diversity in the number of individuals and species of bacteria, Actinomycetes and filamentous fungi present in the substrate was observed during the composting process. The levels of relative humidity during composting ranged from 68.5 to 74%, but this factor apparently had little effect on the growth and development of the micro-organisms. The highest temperatures (up to 62.6°C) were observed during the first 8 days of composting, and these probably resulted from the presence of the nutritional supplements that were added at the beginning of the process. According to Colak (8), the ideal composting temperature varies between 35 and 55°C, since under such conditions any ammonia produced is quickly removed and the substrate undergoes physical and chemical modifications conferring characteristics to the final compost that are most suitable for the growth of *Agaricus bisporus*.

The composting process is initiated by mesophilic micro-organisms that utilise simple carbohydrates and soluble nitrogen compounds (29). The rise in the internal temperature of the pile produced by the exothermic reactions of the microbiota establishes suitable conditions for the development of thermotolerant and thermophilic populations (Gram-positive bacteria and Actinomycetes), which also predominate after the thermophilic phase (3). These micro-organisms are essential for the selective properties of the compost that favour the growth of the mycelia of *Agaricus* species but are less suitable for competing organisms (13).

The initial population of micro-organisms in the bagasse and coast-cross straw mix was 3.2×10^8 CFU/g, of which 94% were bacterial species. The population density increased to an average of 7.1×10^8 CFU/g between the 2nd and 10th days of composting, after which it fell back to 5.7×10^8 CFU/g by the 14th day. Pasteurisation reduced the total microbial population even further by virtue of the high temperatures (> 60°C) applied.

The occurrence of bacteria, and especially of species of *Bacillus*, was observed in the bagasse and coast-cross straw mix during all of the composting stage, with an average population density of 3×10^8 CFU/g. Indeed, throughout composting, the bacteria formed the most predominant and numerous group of micro-organisms present, followed by the Actinomycetes and then the filamentous fungi (Fig.1). Similar results have been reported in the composting of wheat (1) and rice straw (3) in which prokaryotes together with a few fungi predominated during the earliest days of composting, whilst the Actinomycetes prevailed during the final period.

In the present study, 13 Gram-negative and 20 Gram-positive bacteria were identified in the substrate during composting and after pasteurisation (Table 1). All of the bacteria isolated are very common in soils and are natural

contaminants of agricultural residues, appearing mainly after harvesting and processing. Eighteen of the Gram-negative species belonged to the family Enterobacteriaceae while a further 6 were *Pseudomonas* species. With respect to the Gram-positive species, 8 were members of the genus *Bacillus* (Table 1). Species of *Bacillus* and *Pseudomonas*, as well as members of the Actinomycetes, are believed to play important roles in the assimilation and transformation of ammonia (25), whilst *Pseudomonas putida* is reported to exert a positive effect on the fructification of *A. bisporus* (10).

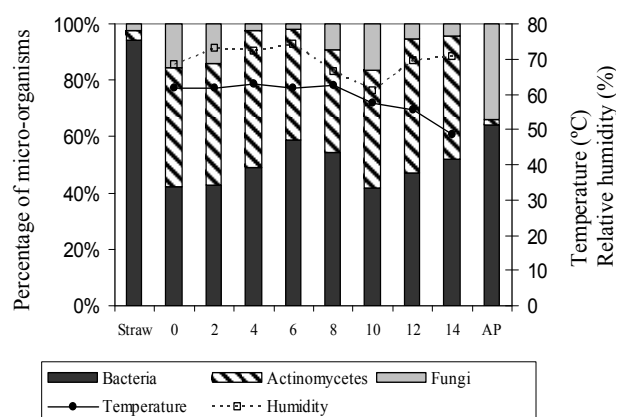


Figure 1. Percentage of micro-organisms present in the original compost materials (Straw), and in the substrate during composting and after pasteurisation (AP). The lines represent the dynamics of temperature (°C) and humidity (%) during the 14 days of composting of a substrate based on sugar cane bagasse and coast-cross grass

A number of pathogenic species, including *Enterobacter agglomerans*, *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*, were also isolated from bagasse and coast-cross straw during

stage I composting. *E. coli* was still detectable after pasteurisation for 30 h, demonstrating that steam pasteurisation is not sufficient to eliminate this contaminant. It has been reported that temperatures of between 54 - 70°C greatly influence the activity and diversity of micro-organisms in edible mushroom compost (20). Moreover, *E. coli*, *Salmonella* and other pathogenic species, including *B. subtilis* and *B. pumilus*, have been isolated from both stage I and II composts, and it is believed that such mesophilic bacteria are able to survive temperatures > 55°C through mechanisms of thermoresistance acquired by genetic mutation (9).

The microbiota present in bagasse and coast-cross straw prior to composting was very similar to those found on day 0 and day 2 of composting, and consisted mainly of *B. circulans* and *B. licheniformis*. The bacterial population altered notably during composting since, from the first day of mixing and onwards, other species of *Bacillus* were detected including *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. sphaericus*, *B. amyloliquefaciens* and *B. anthracis*. Gbolagade (13) also identified various species of *Bacillus* in compost prepared for the culture of *Pleurotus tuber-regium* and *Lentinus squarrosulus*. This author has suggested that *Bacillus* bacteria may stimulate the growth of cellulolytic thermophilic Actinomycetes, since the latter appeared in the substrate after the 2nd day of composting when the diversity of *Bacillus* was greatest. Species of *Paenibacillus* and *Bacillus* were also reported to be the most predominant Gram-positive bacteria in wheat straw-based compost employed in the culture of *Pleurotus ostreatus* (35). Apparently, these bacterial species promote the growth of the mushroom by secreting laccases and inhibiting the growth of *Trichoderma harzianum*. Additionally, species of *Bacillus* and *Paenibacillus* synthesise and excrete toxic peptides, the bacteriocins, which are capable of inhibiting the growth of yeast as well as

Table 1. Diversity of micro-organisms present in sugar cane bagasse and coast-cross straw before and during the composting process and after pasteurisation

Sample (CFU/g)	Bacteria ^a	Actinomycetes ^a	Filamentous fungi ^a
Bagasse and coast-cross straw	<i>Acinetobacter</i> sp <i>Bacillus circulans</i> (4) <i>Bacillus licheniformis</i> <i>Enterobacter agglomerans</i> <i>Klebsiella oxytoca</i> <i>Paenibacillus polymyxa</i> (3) <i>Pseudomonas putida</i> <i>Tatumella ptyseos</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i> (5)
Total population 3.2 x 10 ⁸			
Day 0 of composting	<i>Paenibacillus polymyxa</i> <i>Bacillus coagulans</i> <i>Bacillus licheniformis</i> <i>Bacillus megaterium</i> <i>Brevibacillus brevis</i> <i>Enterobacter agglomerans</i> (3) <i>Enterobacter gergoviae</i> <i>Pseudomonas paucimobilis</i> <i>Serratia marcescens</i> <i>Serratia plymutica</i> <i>Serratia odorifera</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i> (11) <i>Aspergillus niger</i> (3)
Total population 7.1 x 10 ⁸			
Day 2 of composting	<i>Bacillus circulans</i> (2) <i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus pumilus</i> <i>Paenibacillus polymyxa</i> <i>Enterobacter agglomerans</i> (2) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Klebsiella rhinoscleromatis</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i> (16) <i>Aspergillus niger</i> (4)
Total population 7.0 x 10 ⁸			
Day 4 of composting	<i>Bacillus megaterium</i> (2) <i>Paenibacillus polymyxa</i> <i>Paenibacillus macerans</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> (2) <i>Serratia odorifera</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i> (22) <i>Aspergillus niger</i> (2)
Total population 6.1 x 10 ⁸			
Day 6 of composting	<i>Bacillus circulans</i> (2) <i>Bacillus sphaericus</i> (3) <i>Bacillus pumilus</i> <i>Bacillus licheniformis</i> <i>Bacillus megaterium</i> <i>Paenibacillus macerans</i> <i>Acinetobacter</i> sp <i>Pseudomonas vesicularis</i> <i>Tatumella ptyseos</i> <i>Flavobacterium odoratum</i>	<i>Micronaspora</i> (2) <i>Streptomyces</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i> (20)
Total population 5.1 x 10 ⁸			
Day 8 of composting	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> <i>Bacillus licheniformis</i> <i>Bacillus pumilus</i> <i>Paenibacillus polymyxa</i> (3) <i>Enterobacter agglomerans</i> <i>Enterobacter aerogenes</i> <i>Enterobacter cloacae</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Klebsiella rhinoscleromatis</i> <i>Serratia odorifera</i> (2)	<i>Streptomyces</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i> (13)
Total population 5.5 x 10 ⁸			

Day 10 of composting	<i>Bacillus macerans</i> <i>Bacillus circulans</i> (2)	<i>Streptomyces</i> (2)	<i>A. fumigatus</i> (22)
Total population 6.2×10^8	<i>Corynebacterium</i> sp <i>Klebsiella pneumoniae</i>		
Day 12 of composting	<i>Bacillus cereus</i> <i>Bacillus circulans</i> (2)	<i>Micronospora</i> (5) <i>Nocardia</i> (2)	<i>A. fumigatus</i> (21)
Total population 6.4×10^8	<i>Acinetobacter</i> sp <i>Escherichia coli</i> <i>Enterobacter agglomerans</i> <i>Pseudomonas putida</i>	<i>Streptomyces</i> <i>Thermonospora</i> (2)	
Day 14 of composting	<i>Bacillus anthracis</i> <i>Bacillus licheniformis</i> (2)	<i>Dactylosporangium</i> (3) <i>Kibdelosporangium</i>	<i>A. fumigatus</i> (8)
Total population 5.8×10^8	<i>Bacillus megaterium</i> <i>Enterobacter agglomerans</i> <i>Pseudomonas stutzeri</i>	<i>Nocardia</i> <i>Streptomyces</i> (5) <i>Thermonospora</i> (3)	
After pasteurisation	<i>Bacillus circulans</i> (2) <i>Paenibacillus alvei</i>	<i>Streptomyces</i> (9) <i>Nocardia</i>	<i>A. fumigatus</i> (7)
Total population 4.7×10^8	<i>Paenibacillus polymyxa</i> (3) <i>Escherichia coli</i>		

^a The value shown in parenthesis indicates the number of separate isolates obtained for the species.

Gram-positive and Gram-negative bacteria (39).

In the present study, the incidence of Gram-negative bacteria was found to be greater on days 0 and 8 of composting in comparison with the other days, and the species identified were similar to those isolated from other types of compost (32). Various genera of Gram-negative bacteria, especially *Pseudomonas* and *Acinetobacter*, possess strong oxidative properties and are able to stimulate mycelia growth and the formation of fructification bodies in *Pleurotus ostreatus* (5). Additionally, species of *Enterobacter*, *Klebsiella* and *Escherichia*, together with *Bacillus*, are important for nitrogen fixation and in the solubilisation and release of phosphorus in the compost (32). Pasteurisation does not diminish the viability of these micro-organisms since the bacterial population was larger following this procedure than at any other point during the composting, and this is important for the maintenance of the natural microbiota of the compost.

The second largest population of micro-organisms in natural bagasse and coast-cross straw were the Actinomycetes with *ca.* 1×10^7 CFU/g (3.8% of the total

population, Fig.1). During composting the population of Actinomycetes increased remarkably (up to $2.0 - 3.0 \times 10^8$ CFU/g) especially between days 2 and 4, and between days 10 and 12. *Streptomyces* spp. were the only Actinomycetes that could be isolated during all steps of the composting process, whilst members of the genera *Nocardia*, *Micromonospora*, *Thermomonospora*, *Dactylosporangium* and *Kibdelosporangium* were variously detected on days 6, 12 and 14 of composting. *Streptomyces* and *Nocardia* were, however, the only Actinomycetes found after pasteurisation.

Actinomycetes are important for the preparation of compost suitable for colonisation by *Agaricus* since they degrade cellulose, thus diminishing the fibre content, and secrete biotin, thiamine and vitamin A. Moreover, Actinomycetes and some thermophilic fungi predominate at the end of stage II of composting (23), resulting in a reduction in the concentration, or the complete disappearance, of ammonia that is toxic for the *Agaricus* mushroom (36). When the compost cools down (to around 25°C) the thermophilic organisms become dormant and the biomass is subsequently digested by the *Agaricus*. A

significant reduction in Actinomycetes during steam pasteurisation is thus unfavourable to the production of high quality compost, even though such a strategy is employed by many small farmers who do not have access to the appropriate infrastructure by which to fully implement stage II composting.

The population of filamentous fungi was low during stage I of composting with a maximum size (1.2×10^8 CFU/g; 16.7% of the total population) being attained on day 10 (Fig.1). However, the density of these organisms increased to 1.6×10^8 CFU/g (34% of the total population) after pasteurisation, demonstrating that the thermoresistance of these organisms was second only to that of bacteria (population 3.0×10^8 CFU/g). The main role of the thermoresistant filamentous fungi that colonise compost material is to degrade lignocelluloses (34), thus diminishing the amount of fibre and increasing the availability of substrate for *Agaricus*. Although filamentous fungi are essential for the transformation of the natural plant substrate into compost (24, 36), this group was the least diversified with only two species (*Aspergillus fumigatus* and *A. niger*) being identified during the composting process. It is possible that other species were present in the compost, including those that do not produce asexual spores, but for their isolation it would be necessary to use techniques other than those used in the present study. *A. fumigatus* was detected throughout stages I and II of composting, and its presence has also been reported in wheat straw-based compost as well (11). Although *A. fumigatus* is an opportunist pathogen that can produce allergic reactions in individuals that are exposed to the spores or are immunosuppressed (18,19), this fungus excretes thermostable cellulases (38, 40) that permit the release of soluble sugars and favour microbial succession during composting (4).

Following pasteurisation, the compost biomass contains high concentrations of organic and inorganic nutrients that favour the colonisation of edible mushrooms. In the present study, the species identified after pasteurisation of compost were *B. circulans*, *Paenibacillus alvei*, *P. polymyxa* and *E. coli*. The occurrence of *B. circulans* (a sporulating bacterium) at this stage can be explained by its strong thermoresistance, whilst the occurrence of *Paenibacillus* spp. and *E. coli* (non-sporulating bacteria) may be explained by the protective effect of the organic material present in the compost. No Gram-negative bacteria were isolated from the compost after pasteurisation. Although the population of Actinomycetes decreased remarkably as a result of pasteurisation, some *Streptomyces* persisted, thus demonstrating their resistance to temperatures of up to 65 °C.

In conclusion, compost based on sugar cane bagasse and coast-cross straw supported a diverse microbial population, consisting mainly of *Bacillus* spp, *Streptomyces* and *Aspergillus fumigatus*, which are responsible for the degradation of fibres and for the physical and chemical characteristics of the final compost. These species were the most persistent micro-organisms during stage I of composting and the most thermostable during pasteurisation. Low cost substrates, such as solid agro- industrial residues, are an economical alternative mainly because they are constantly available irrespective of the season, and are readily converted into an adequate mushroom substrate without requiring refined technology.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for financial support.

RESUMO

Diversidade microbiana em composto a base de bagaço de cana preparado para produção de *Agaricus brasiliensis*.

Os cogumelos comestíveis são apreciados pelas suas propriedades nutricionais e medicinais e, por essa razão, possuem alto valor econômico. A produção de cogumelos depende da composição química dos substratos básicos, dos suplementos utilizados e da preparação do composto no qual o fungo será cultivado. Considerando-se que os custos de produção precisam ser minimizados, os resíduos agro-industriais representam uma fonte alternativa e econômica para a preparação do composto. A interação da microbiota natural dos resíduos agrícolas durante o processo de compostagem influencia a subsequente colonização do cogumelo. Visando-se a produção de *A. brasiliensis*, o presente trabalho objetivou isolar e identificar a microbiota presente no composto preparado a partir de bagaço de cana e capim coast-cross. O processo de compostagem durou 14 dias com reviragens da pilha a cada dois dias, o qual foi seguido de pasteurização (55 - 65 °C) em duas fases por 15 h cada. As bactérias (principalmente *Bacillus*, *Paenibacillus* e espécies da família Enterobacteriaceae) foram os microrganismos predominantes durante todo o processo com uma densidade populacional média de 3.0×10^8 UFC/g. Os actinomicetos, principalmente os do gênero *Streptomyces*, estiveram bem representados, com uma densidade populacional de 2.0 a 3.0×10^8 UFC/g. Os fungos filamentosos foi a classe de microrganismos com menor densidade populacional e menor diversidade, embora a espécie *Aspergillus fumigatus* esteve

presente durante todo o processo de compostagem e também após a pasteurização do composto.

Palavras-chaves: *Agaricus brasiliensis*, bagaço de cana, diversidade microbiana.

REFERENCES

1. Atkey, P.T.; Wood, D.A. (1983). An electron microscope study of wheat straw composted as a substrate for the cultivation of the edible mushroom (*Agaricus bisporus*). *J. Appl. Microbiol.*, 55, 293-304.
2. Bellini, M.F.; Cabrioti, L.N.; Terezan, A.P.; Jordão, B.Q.; Ribeiro, L.R.; Mantovani, M.S. (2008). Cytotoxicity and genotoxicity of *Agaricus blazei* methanolic extract fractions assessed using gene and chromosomal mutation assays. *Genet. Mol. Biol.*, 31, 122-127.
3. Cahyani, V.R.; Matsuya, K.; Asakawa, S.; Kimura, M. (2004). Succession and phylogenetic profile of eukaryotic communities in the composting process of rice straw estimated by PCR-DGGE analysis. *Biol. Fertil. Soils*, 40, 334-344.
4. Chang, S.T., Miles, P.G. (2004). *Mushrooms: Cultivation, Nutritional Value, Medicinal Effect, and Environmental Impact*. CRC Press, Boca Raton, FL.
5. Cho, Y.S.; Kim, J.S.; Crowley, D.E.; Cho, B.G. (2003). Growth promotion of the edible fungus *Pleurotus ostreatus* by fluorescent pseudomonads. *FEMS Microbiol. Lett.*, 218, 271-276.
6. Christensen, M. (1981). A synoptic key and evaluation of species in the *Aspergillus flavus* group. *Mycologia*, 73, 1056-1084.
7. Christensen, M. (1982). The *Aspergillus ochraceus* group: Two new species from western soils and a synoptic key. *Mycologia*, 74, 210-225.
8. Colak, M. (2004). Temperature profiles of *Agaricus bisporus* in composting stages and effects of different composts formulas and casing materials on yield. *African J. Biotechnol.*, 3, 456-462.
9. Droffner, M.L.; Brinton Jr., W.F.; Evans, E. (1995). Evidence for the prominence of well characterized mesophilic bacteria in thermophilic (50-70°C) composting environments. *Biomass Bioenergy*, 8, 191-195.
10. Eger, G. (1972). Experiments and comments on the action of bacteria on sporophore initiation in *Agaricus bisporus*. *Mushroom Sci.*, 8, 719-725.
11. Fermor, T.R.; Randle, P.E.; Smith, J.F. (1985). Compost as substrate and its preparation. In: Flegg, P.B.; Spencer, D.M.; Wood, D.A. (eds).

- The Biology and Technology of the Cultivated Mushroom*. John Wiley, Chichester, UK. p.81-109.
12. Firenzuoli, F.; Gori, L.; Lombardo, G. (2007). The medical mushroom *Agaricus blazei* Murril. Literature and pharmaco-toxicological problems. *e-CAM*, 5, 3-15.
 13. Gbolagade, J.S. (2006). Bacteria associated with compost used for the cultivation of Nigerian edible mushroom *Pleurotus tuber-regium* (Fr.) Singer and *Lentinus squarrosulus* (Berk.). *African J. Biotechnol.*, 5, 338-342.
 14. Hammes, W.P.; Hertel, C. (2003). The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. In: Dworkin, M. (ed.). *The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community*, 3rd Edn. Springer Verlag, New York, NY. p. 320-403.
 15. Have, R.T.; Wijngaard, H.; Aries-Kronenburg, N.A.E.; Straatsma, G.; Schaap, P.J. (2003). Lignin degradation by *Agaricus bisporus* accounts for a 30% increase in bioavailable holocellulose during cultivation on compost. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 2242-2245.
 16. Holt, J.G.; Krieg, N.R.; Sneath, P.H.A.; Staley, J.T.; Williams, S.T. (1994). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9th Edn. Williams and Wilkins, Baltimore, MD.
 17. Klich, M.A.; Pitt, J.I. (1988). *A Laboratory Guide to Common Aspergillus Species and their Teleomorphs*. CSIRO Division of Food Processing, North Ryde, Australia.
 18. Latgé, J.P. (1999). *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clin. Microbiol. Rev.*, 12, 310-350.
 19. Latgé, J.P. (2001). The pathobiology of *Aspergillus fumigatus*. *Trends Microbiol.*, 9, 382-389.
 20. Miyatake, F.; Iwabuchi, K. (2005). Effect of high compost temperature on enzymatic activity and species diversity of culturable bacteria in cattle manure compost. *Biores. Technol.*, 96, 1821-1825.
 21. Pitt, J.I.; Hocking, A.D. (1997). *Fungi and Food Spoilage*, 2nd Edn. Chapman and Hall, Cambridge, UK.
 22. Raper, K.B.; Fennell, D.I. (1965). *The Genus Aspergillus*. Williams and Wilkins, Baltimore, MD.
 23. Ross, R.C.; Harris, P.J. (1983). The significance of thermophilic fungi in mushroom compost. *Sci. Hort.*, 20, 61-70.
 24. Ryckeboer, J.; Mergaert, J.; Coosemans, J.; Deprins, K.; Swings, J. (2003). Microbiological aspects of biowaste during composting in a monitored compost bin. *J. Appl. Microbiol.*, 94, 127-137.
 25. Ryckeboer, J.; Mergaert, J.; Vaes, K.; Klammer, S.; De Clerco, D.; Coosemans, J.; Insam, H.; Swings, J. (2003) A survey of bacteria and fungi occurring during composting and self-heating process. *Ann. Microbiol.*, 53, 349-410.
 26. Samson, R.A.; Hoekstra, E.S.; Frisvad, J.C.; Filtenborg, O. (1995). *Introduction to Food-Borne Fungi*, 4th Edn. Centraalbureau Voor Schimmelcultures, Baarn, The Netherlands.
 27. Sánchez, C. (2004). Modern aspects of mushroom culture technology. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 64, 756-762.
 28. Shirling, E.B.; Gottlieb, D. (1966). Methods for the characterization of *Streptomyces* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 16, 313-340.
 29. Smith, J.F.; Wood, D.A.; Thurston, C.F. (1995). Growth measurement of *Agaricus* mycelium in composed substrates as an indicator of compost selectivity and mushroom productivity. In: Elliot, T.J. (Ed). *Science and Cultivation of Edible Fungi*. Balkema, Rotterdam.
 30. Stijve, T.; Amazonas, M.A.L.A.; Giller, V. (2002). *Flavor and Taste Components of Agaricus brasiliensis ssp. Heinenm: a New Gourmet and Medical Mushroom*. Deutsche Lebensmittel-Rundschau, Stuttgart, Germany.
 31. Straatsma, G.; Banson, R.A.; Olijnsma, T.W. (1994). Ecology of thermophilic fungi in mushroom compost, with emphasis on *Scytalidium thermophilum* and growth stimulation of *Agaricus bisporus* mycelium. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60, 454-458.
 32. Subbarao, N.S. (1992). *Biofertilizers in Agriculture*, 2nd Edn. Oxford and IBH Publishing, New Delhi, India.
 33. Takaku, T.; Kimura, Y.; Okuda, H. (2001). Isolation of an antitumor compound from *Agaricus brasiliensis* Murril. and its mechanism of action. *J. Nutr.* 131, 1409-1413.
 34. Tuomela, M.; Vikman, M.; Ataca, A.; Itävaara M. (2000). Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. *Biores. Technol.*, 72, 169-183.
 35. Velázquez-Cedeño, M.; Farnet, A.M.; Mata, G.; Savoie, J.M. (2008). Role of *Bacillus* spp. in antagonism between *Pleurotus ostreatus* and *Trichoderma harzianum* in heat-treated wheat-straw substrates. *Biores. Technol.* [doi 10.1016/j.biortech.2008.01.022]
 36. Vijay, B.; Gupta, Y. (1994). Microflora of *Agaricus bisporus* compost. In: Nair, M.C. (ed). *Advances in Mushroom Biotechnology*. Scientific Publishers, Jodhpur, India.
 37. Vijayalakshmi, K.; Vijayalakshmi, M. (2007). Studies on cultural, physiological and antimicrobial activities of *Streptomyces rochei*. *J. Appl. Sci. Res.*, 3, 2026-2029.
 38. Vries, R.P.; Visser, J. (2001). *Aspergillus* enzymes involved in the degradation of plant cell wall polysaccharides. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 65, 497-522.
 39. Watabe, M.; Rao, J.R.; Murphy, A.R.; Moore, J.E. (2003). Inhibition of *Listeria ivanovii* by *Paenibacillus lentimorbus* isolated from phase II mushroom compost. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 19, 875-877.

40. Ximenes, E.A.; Felix, C.R.; Ulhoa, C.J. (1996). Production of cellulases by *Aspergillus fumigatus* and characterization of one β -glucosidase. *Curr. Microbiol.*, 32, 119-123.

Diego Cunha Zied, Marli Teixeira de Almeida Minhoni, João Kopytowski Filho, Dorival Pires de Arruda, Meire Cristina Nogueira de Andrade

PRODUÇÃO DE *Agaricus blazei* ss. Heinemann (*A. brasiliensis*) EM FUNÇÃO DE DIFERENTES CAMADAS DE COBERTURA E SUBSTRATOS DE CULTIVO

Interciencia, vol. 34, núm. 6, junio, 2009, pp. 437-442,

Asociación Interciencia

Venezuela

Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=33911405012>



Interciencia,

ISSN (Versão impressa): 0378-1844

interciencia@ivic.ve

Asociación Interciencia

Venezuela

PRODUÇÃO DE *Agaricus blazei* ss. Heinemann (*A. brasiliensis*) EM

FUNÇÃO DE DIFERENTES CAMADAS DE COBERTURA

E SUBSTRATOS DE CULTIVO

Diego Cunha Zied, Marli Teixeira de Almeida Minihoni, João Kopytowski Filho,
Dorival Pires de Arruda e Meire Cristina Nogueira de Andrade

RESUMO

Avaliou-se o efeito de duas formulações de composto, com palha de tifton (*Cynodon sp.*) e com palha de aveia (*Avena sativa*) e três camadas de cobertura (testemunha, testemunha + gel de acrilamida e testemunha + farelo de soja) na produção, eficiência biológica, massa e número de basidiomas de *A. blazei*. O delineamento experimental foi em esquema fatorial 3x2 inteiramente casualizado, com quatro 4 repetições. A unidade experimental constou de 12-12,5kg de composto úmido. A presença de gel de acrilamida como camada de cobertura tendeu a apresentar maior produtividade e eficiência biológica. O composto à base de tifton apresentou uma tendência de menor produção e eficiência biológica em relação ao composto à base de aveia.

Introdução

A produção e o desenvolvimento de basidiomas de *Agaricus bisporus* não dependem unicamente da capacidade genética do micélio para a “frutificação”, mas também de fatores físicos, ambientais, químicos, nutricionais e microbiológicos (Pardo *et al.*, 2003). Devido a estes fatores o processo de compostagem e a adição da camada de cobertura tornam-se fundamentais para o cultivo de cogumelos Agaricáceos (Minihoni *et al.*, 2005). De acordo com Dhar (1994), o composto condiciona a produtividade e a composição química dos basidiomas.

A camada de cobertura afeta a qualidade e a uniformidade da produção, sendo considerada uma das maiores fontes de variação na indústria de cogumelos (Oei, 2003). Durante várias décadas, em muitos países, a camada de

cobertura mais utilizada foi composta por turfa adicionada de calcário ou carbonato de cálcio (Noble e Dobrovin-Pennington, 2005). Atualmente, muitos materiais vêm sendo testados em substituição à turfa. No Brasil, o uso de turfa como camada de cobertura ainda é reduzido, devido o elevado custo e sua consequente extração proibida, decorrente de danos ambientais gerados.

Independente do material a ser utilizado como camada de cobertura alguns parâmetros de qualidade deve ser obedecidos, tais como: textura franco-argilosa, com porosidade que permita a troca de gases, pH entre 6,8 e 7,5, capacidade de troca catiônica elevada, concentração reduzida de sais para minimizar um eventual déficit de água, reduzido material orgânico não decomposto, teores reduzidos de magnésio, contaminantes e

pragas (Nair e Gokulapalan, 1994; Kurtzman, 1995; Zied, 2008). Durante 2005-2006, em um levantamento dos materiais mais utilizados como camada de cobertura na região de Piedade, SP, verificou-se que terra (50% da preferência dos fungicultores) seguido de terra + carvão (37,5%) e de terra + carvão + vermiculita (12,5%) são os materiais mais frequentemente utilizados (Andrade *et al.*, 2006).

Com relação às matérias primas utilizadas para a formulação do composto, fibras ligno-celulósicas vem sendo utilizadas, as quais são adicionadas de produtos nitrogenados, orgânicos e/ou inorgânicos (Kopytowski Filho e Minihoni, 2004). A suplementação de compostos tem o objetivo de fornecer nutrientes que possam ser absorvidas facilmente pelos cogumelos. O uso do farelo de soja como suplemento, está condicionado

ao pré-tratamento, no qual o formol tem excelente efeito de desinfetar e condicionar a liberação lenta dos nutrientes do suplemento, o qual não é estritamente seletivo para os cogumelos, podendo também fornecer nutrientes para diversos organismos contaminantes (Oei, 2003).

Hayes *et al* (1969) relatam que a suplementação da camada de cobertura com óleo de semente de algodão aumenta a produtividade devido à troca de ácidos graxos, esteróis e esteróis-ésteres no pseudo-tecido do cogumelo, induzindo à formação de primórdios, apesar de considerarem a camada de cobertura como material de baixo valor nutricional.

Verificando a importância destas duas etapas de produção (camada de cobertura x composto) no cultivo de cogumelos agaricáceos, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a produção, a efici-

PALAVRAS CHAVE / *Agaricus blazei* / Camada de Cobertura / Cogumelo / Composto / Cultivo /

Recebido: 04/08/2008. Modificado: 09/06/2009. Aceito: 10/06/2009.

Diego Cunha Zied. Engenheiro Agrônomo e Doutorando em Energia na Agricultura, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Brasil. Professor, UNESP, Brasil. Endereço: Departamento de Produção Vegetal. Rua José Barbosa de Barros, 1780 - Fazenda Lage-

ado, CP 237, CEP 18610-307, Botucatu/SP, Brasil. e-mail: dczied@fca.unesp.br

Marli Teixeira de Almeida Minihoni. Bióloga e Doutora, UNESP, Brasil. Professora, UNESP, Brasil. e-mail: marliminhoni@fca.unesp.br

João Kopytowski Filho. Engenheiro Agrônomo e Doutor em Energia na Agricultura, UNESP, Brasil. email: joaokopy@yahoo.com.br

Dorival Pires de Arruda. Mes- trando em Energia na Agricultura, UNESP, Brasil. e- mail: dorival@fca.unesp.br

Meire Cristina Nogueira de Andrade. Bióloga, Bolsista DCR/ CNPq/FAPEAM/INPA. e-mail: meire@inpa.gov.br

PRODUCTION OF *Agaricus blazei* ss. Heinemann (*A. brasiliensis*) IN FUNCTION OF DIFFERENT CASING LAYERS AND COMPOSTS

Diego Cunha Zied, Marli Teixeira de Almeida Minihoni, João Kopytowski Filho, Dorival Pires de Arruda and Meire Cristina Nogueira de Andrade

SUMMARY

The aim of this study was to evaluate yield, biological efficiency, fresh weight and number of mushrooms of *Agaricus blazei* grown in two kinds of compost, prepared with Tifton (*Cynodon sp.*) grass and with oat (*Avena sativa*) straw, and three casing layers (control, control + acrilamylde gel and soil and control + soybean meal). The experiment consisted of four repli-

cates (each with 12-12,5kg of fresh weight compost) arranged in a factorial scheme 3x2. The results showed a tendency for higher yield and biological efficiency when adding acrilamylde gel to the casing soil. The composts made with oat straw presented a tendency for higher yield and biological efficiency compared to the Tifton.

PRODUCCIÓN DE *Agaricus blazei* ss. Heinemann (*A. brasiliensis*) EN FUNCIÓN DE DIFERENTES CAMADAS DE COBERTURA Y SUSTRATOS DE CULTIVO

Diego Cunha Zied, Marli Teixeira de Almeida Minihoni, João Kopytowski Filho, Dorival Pires de Arruda y Meire Cristina Nogueira de Andrade

RESUMEN

Se evaluó el efecto de dos formulaciones de composta, con paja de césped Tifton (*Cynodon sp.*) y con paja de avena (*Avena sativa*) y tres camadas de cobertura (control, control + gel de acrilamida y control + salvado de soya) en la producción, eficiencia biológica, masa y número de basidiomas de *A. blazei*. El diseño experimental fue un esquema factorial 3x2 enteramente aleatorio con cuatro repeticiones. La unidad experimen-

tal consistió de 12-12,5kg de composta húmeda. La presencia de gel de acrilamida como camada de cobertura resultó en una tendencia a presentar mayor productividad y eficiencia biológica. La composta a base de Tifton presentó una tendencia a menor producción y eficiencia biológica en relación a la composta en base a avena.

ência biológica, a massa e o número de basidiomas de *A. blazei*, em função de duas formulações de composto e três camadas de cobertura.

Material e Métodos

O inóculo de *A. blazei* foi produzido a partir da linhagem ABL-04/49, isolada na cidade de São José do Rio Preto, Estado de São Paulo, Brasil, conservada no Banco de Matrizes do Módulo de Cogumelos, Departamento de Produção Vegetal, Defesa Fitossanitária, FCA/UNESP, Brasil.

O substrato utilizado para a produção do inóculo foi à base de grãos de tritcale (*Triticum secale*), gesso e calcário calcítico. Os grãos foram previamente cozidos e, em seguida, adicionados de 20g.kg⁻¹ de calcário calcítico e 160g.kg⁻¹ de gesso. Após a homogeneização, autoclavou-se por 3h a 121°C; após o resfriamento, procedeu-se à inoculação de *A. blazei*. A metodologia utilizada seguiu os procedimentos adotados por Minihoni *et al.* (2005).

Previamente ao preparo dos compostos, amostras das palhas e bagaço de cana-de-

açúcar utilizados na formulação foram encaminhadas ao Laboratório de Fertilizantes e Corretivos para determinação do pH e dos teores de carbono e nitrogênio (Tabela I).

A formulação dos compostos é apresentada na Tabela II. O processo de compostagem Fase I (com duração de 12

dias) foi realizado em área coberta, com piso cimentado e laterais abertas. Antes da montagem das duas leiras de compostagem, as palhas de tifton (*Cynodon sp.*) e aveia (*Avena sativa*) foram umedecidas diariamente, durante 8 dias e reviradas a cada 2 dias.

TABELA I
TEOR DE UMIDADE, CARBONO E NITROGÊNIO DOS MATERIAIS UTILIZADOS NOS COMPOSTOS

Ingredientes	U	C	N	C/N
			%	
Bagaço de cana-de-açúcar	50,0	53,3	0,5	106,8
Palha de tifton	13,0	49,5	1,6	30,9
Palha de aveia	13,0	49,2	1,3	37,8
Farelo de soja	10,0	45,0	7,0	6,4
Uréia	0,0	27,0	45,0	0,6

U: umidade, C: carbono, N: nitrogênio, C/N: relação carbono/nitrogênio.

TABELA II
FORMULAÇÃO DOS COMPOSTOS A BASE DE PALHA DE TIFTON E AVEIA UTILIZADOS NO CULTIVO DE *A. blazei*

Ingredientes (kg)	Composto			
	Tifton		Aveia	
	PU	PS	PU	PS
Bagaço de cana-de-açúcar	600,0	300,0	600,0	300,0
Palha de tifton	280,0	243,6	-	-
Palha de aveia	-	-	280,0	243,6
Farelo de soja	90,0	81,0	100,0	90,0
Uréia	4,0	4,0	4,0	4,0
Gesso	11,0	10,0	11,0	10,0
Calcário calcítico	20,0	18,0	20,0	18,0
Total massa de composto (kg)	1005,0	656,6	1015,0	665,6
Total massa de carbono k(g)	-	318,1	-	321,4
Total massa de nitrogênio (kg)	-	12,8	-	12,6
Relação C/N inicial	-	24,9	-	25,6
Proporção de N farelo / N uréia (%)	-	3,2	-	3,5

PU: peso úmido, PS: peso seco.

Na montagem das leiras, caracterizando o início da Fase I de compostagem, foi feito com uma camada de 20cm de palha (tifton e/ou aveia), seguida de uma camada de 20cm de bagaço de cana-de-açúcar, e assim por diante até que as leiras atingissem aproximadamente 1,8m de altura por 1,8m de largura. Os suplementos e condicionadores (uréia, farelo de soja, gesso e calcário) foram misturados às leiras na primeira revirada destas. Após, foram realizadas mais 4 reviradas, em intervalos de 2 e/ou 3 dias, totalizando 5 reviradas. Durante as reviradas, adicionou-se água visando manter a umidade das leiras em 70-75%.

Ao final da Fase I de compostagem, os compostos foram transferidos para caixas plásticas treliçadas de polipropileno (56,5x46,5x28,5cm; comprimento, largura e profundidade, respectivamente), na quantidade de ~18kg de substrato úmido por caixa. As caixas foram dispostas ao acaso no interior de uma câmara climatizada (Dalsem Mushrooms) para pasteurização e condicionamento, dando início à Fase II de compostagem. A pasteurização foi realizada a $61 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 6h, e o condicionamento a $48 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 11 dias, totalizando 12 dias (Fase II). Em seguida, a temperatura dos compostos foi reduzida para 23°C , para a inoculação dos mesmos.

Os compostos foram transferidos manualmente para caixas menores, revestidas internamente com saco plástico de polietileno transparente perfurados na base. Procedeu-se a inoculação manualmente com a linhagem ABL-04/49 de *A. blazei*, na proporção de 1,25% do peso úmido do composto. Em seguida, as caixas foram cobertas com saco plástico e adicionou-se 12-12,5kg de composto (massa úmida). Após, as mesmas foram dispostas ao acaso em sala de incubação, onde per-

TABELA III
FORMULAÇÃO DAS CAMADAS DE COBERTURA UTILIZADAS
NO CULTIVO DE *A. blazei*

Tratamentos	Camadas de cobertura
T1 e T4	Solo 70% + carvão 25% + calcário calcítico 5% (controle)
T2 e T5	Solo 70% + carvão 25% + calcário calcítico 4,5% + gel de acrilamida 0,5%
T3 e T6	Solo 70% + carvão 25% + calcário calcítico 5% + farelo de soja (161g/caixa).

T1, T2 e T3: compostos à base de palha de tifton; T4, T5 e T6: compostos à base de palha de aveia.

maneceram por 15 dias a $28 \pm 1^\circ\text{C}$.

O solo utilizado nas camadas de cobertura foi classificado como Nitossolo Vermelho Distrófico (Carvalho, 1983), sendo este retirado a uma profundidade de 1,5-2,0m de profundidade e adicionado de carvão vegetal, calcário calcítico, farelo de soja e gel de acrilamida conforme os tratamentos (Tabela III).

Imediatamente após a mistura dos ingredientes, as camadas de cobertura foram adicionadas sobre os compostos colonizados. Não se adotou qualquer procedimento de desinfestação das camadas de cobertura devido à ausência de pragas e contaminantes no solo (nematóides, *Trichoderma* sp., *Verticillium* sp., *Dactylium* sp.). Apenas o farelo de soja que foi previamente desinfestado com solução de formol a 2% (Oei, 2003). Para tanto, o farelo foi condicionado em caixa plástica fechada e adicionado solução aquosa de formol a 2%. Após sete dias, misturou-se 160g de farelo de soja em cada caixa contendo o restante da camada de cobertura deste tratamento (T3-T6).

Após 15 dias de inoculação, adicionaram-se as camadas de cobertura com 5cm de altura sobre os compostos colonizados e revestiu novamente com filme plástico. Assim as caixas foram dispostas, ao acaso, sobre estrutura metálica, no interior de estufa rústica de

cultivo para a colonização das camadas de cobertura por 7 dias. A estufa era revestida com lona plástica dupla face (branca por fora e preta por dentro), a qual possuía controle parcial das variáveis ambientais (temperatura e umidade), sua respectiva medida era $6 \times 1,8 \times 2,1\text{m}$ (comprimento, largura e altura). Ao longo do período de cultivo, a temperatura interna variou entre $15-35^\circ\text{C}$ e a umidade relativa entre 45-95%. A colheita dos basidiomas foi manual, com o púleo ainda fechado. O período de frutificação durou 94 dias, com tempo total de experimentação de 120 dias após a adição da camada de cobertura.

A produção (P, kg) foi determinada através da soma da massa de basidiomas frescos (MB) de cada repetição e dividida por 4.

A eficiência biológica (EB, %), foi obtida com a relação entre a massa de basidiomas frescos (MBF) e a massa do composto seco (MCS), mul-

tiplicada por 100 (dados em porcentagem), ao final do período de colheita, $EB(\%) = MBF/MSC \times 100$ (%). O número de basidiomas (NB) foi determinado diariamente durante a fase de colheita, e a massa de basidiomas (MB; g)

foi obtida através da massa de basidiomas (MBF) divididos pelo número de basidiomas colhidos (NB).

Os dados foram submetidos à análise de variância com delineamento inteiramente casualizado, em seguida foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% (Snedcor e Cochran, 1972). Utilizou-se o programa SISVAR 4.2 desenvolvido pelo Departamento de Ciências Exatas, da Universidade Federal de Lavras (UFLA), MG, Brasil. Os dados de eficiência biológica e produtividade foram transformados utilizando a fórmula $\text{raiz de } x + 0,5$ e $\text{arc sen raiz } p/100$.

Resultados e Discussão

A Figura 1 apresenta os dados médios da produção acumulada em função dos compostos à base de tifton e aveia, respectivamente, adicionados de gel de acrilamida, controle e farelo de soja.

Ambos os compostos iniciaram a produção no dia 28 após a adição da camada de cobertura, obtendo-se três fluxos de produção para o composto à base de tifton e quatro fluxos para o composto à base de aveia. Porém, se observou que o composto à base de aveia, no terceiro fluxo (90 dias de produção), já superava o composto à base de tifton com 14,5% a mais de produtividade. No terceiro fluxo de produção o composto à base de aveia apresen-

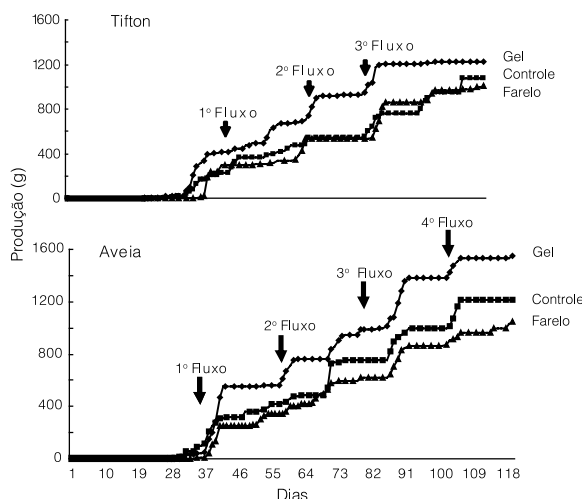


Figura 1. Produção acumulada nos compostos à base de palha de tifton e aveia, adicionados de três tipos de camada de cobertura (controle, gel de acrilamida e farelo de soja).

tava uma produção de 1017,51g (média das três camadas de cobertura), o que representa boa produtividade quando comparada a média obtida pelos produtores do estado de São Paulo, os quais apresentam tempo de produção mais longo (140 dias). Kopytowski Filho (2006) também obteve início de produção no dia 28 após a adição da camada de cobertura. Já Minihoni *et al* (2006), trabalhando com diferentes métodos de desinfestação da camada de cobertura, obteve o início da produção no dia 55. A eficiência biológica, a produção, a massa e o número de basidiomas não diferiram entre si em função dos tipos de compostos e camadas de cobertura utilizadas.

Contudo, no composto à base de aveia, independentemente do tipo de camada de cobertura utilizada, ocorreu uma tendência de eficiência biológica, produção e número de basidiomas maiores, na ordem de 14,5; 13,5 e 16,5%, respectivamente, em relação ao composto à base de tifton (Tabela IV).

Esta larga variação de resultados obtidos no cultivo de *A. blazei* é comum nas produções comerciais no Brasil, onde as instalações, na maioria das vezes rústicas são suscetíveis as variáveis ambientais (Andrade *et al.*, 2007; Kopytowski Filho, 2006; Minihoni *et al.*, 2006).

Nos compostos à base de tifton, o primeiro fluxo apresentou maior produtividade independentemente da camada de cobertura utilizada. Com a cobertura controle, gel de acrilamida e farelo de soja, as produções acumuladas ao final deste primeiro fluxo foram de 542,5g em 40 dias, 675g em 34 dias e 530,3g em 30 dias, respectivamente. O segundo e terceiro fluxos apresentaram produções menores, com os seguintes valores: testemunha (222 e 310,32g), gel de acrilamida (248,4 e 271,8g) e farelo de soja (328 e 152,5g).

TABELA IV
VALORES TOTAIS MÉDIOS DE EFICIÊNCIA BIOLÓGICA, PRODUÇÃO, MASSA E NÚMERO DE BASIDIOMAS EM DOIS COMPOSTOS (TIFTON E AVEIA) ADICIONADOS DE TRÊS CAMADAS DE COBERTURA (GEL DE ACRILAMIDA, CONTROLE E FARELO) NO CULTIVO DE *Agaricus blazei*

Camada de cobertura	Eficiência biológica (%)		Produção (kg)		Massa de basidioma (g)		Número de basidiomas	
	Compostos							
	Tifton	Aveia	Tifton	Aveia	Tifton	Aveia	Tifton	Aveia
Gel de acrilamida	28	A a	36,25	A a	1,22	A a	1,54	A a
Controle	24,75	A a	28,25	A a	1,07	A a	1,21	A a
Farelo de soja	23,25	A a	24,5	A a	1,01	A a	1,04	A a

Médias seguidas de letras iguais, maiúscula em cada coluna e minúscula em cada linha, dentro de cada variável não diferem entre si Tukey (5%).

Andrade *et al.* (2007) trabalhando com composto à base de bagaço de cana-de-açúcar, gramínea coast-cross e camada de cobertura a base de terra + carvão + calcário calcítico, também obteve a maior produção no primeiro fluxo de colheita com 832,5g após 47 dias à adição da camada de cobertura.

Nos compostos à base de aveia, os primeiro, segundo e terceiro fluxos foram os mais longos (dependendo da camada de cobertura utilizada). Na presença da camada de cobertura controle, as produções e tempo de duração dos fluxos foram de 489,2g em 35 dias, 262,55g em 5 dias, 241,17g em 6 dias e 215,1g em 4 dias, para os quatro primeiros fluxos, respectivamente. Na presença da camada de cobertura adicionada de gel de acrilamida, os fluxos apresentaram produções de 555,8g em 15 dias, 206,58g em 6 dias; 619,97g em 21 dias e 145,9g em 4 dias, para os quatro primeiros fluxos, respectivamente. Já a camada de cobertura adicionada de farelo de soja apresentou cinco fluxos, com 252g em 6 dias, 338,4g em 24 dias, 246,35g em 6 dias, 100,7g em 5 dias e 80,35 em 6 dias, para os cinco fluxos, respectivamente.

O período de produção foi de 94 dias para todos os tratamentos (26 dias antes da produção + 94 dias de “frutificação” = 120 dias de cultivo), os quais apresentaram comportamentos distintos em termos de precocidade de produção. Esta precocidade de produção pode

ser observada na seguinte ordem Tgel >Ac >Agel >Af >Tf >Tc, na primeira metade (47 dias após o início da formação de primórdios) do período de produção e as porcentagens de produção, em relação aos tratamentos foram de 75, 61, 58, 57, 53 e 51%, respectivamente (Figura 1).

Observa-se assim que o composto à base de tifton com a camada de cobertura de gel de acrilamida apresentou precocidade elevada (75%) quando comparado com o mesmo composto coberto com a camada de cobertura controle (51%).

A tendência de maior eficiência biológica, produção e número de basidioma observada nos compostos à base de aveia, em relação aos compostos à base de tifton, não podem ser justificadas através das relações C/N iniciais destes, pois estas foram pré-estabelecidas semelhantes entre si, ou seja, 25,6 e 24,9 para o composto à base de tifton e aveia (Tabela II).

Diferenças nas propriedades químicas, físicas e biológicas destes compostos bem como tipo de nitrogênio (orgânico ou mineral) e quantidade adicionado (12,8 e 12,6), podem ser as causas dos resultados obtidos. Como fontes de nitrogênio nos compostos, adicionaram-se uréia e farelo de soja. A quantidade de uréia adicionada foi fixada em 4kg para ambos os compostos. Contudo, a quantidade de farelo de soja adicionada foi de 81kg no composto à base de tifton e de 90kg no composto

à base de aveia. Esta diferença na quantidade de farelo de soja adicionada ocorreu visando estabelecer uma similaridade entre as relações C/N iniciais dos compostos, podendo estes valores justificar a tendência de maior produção no composto à base de aveia. O farelo de soja, além do fornecimento de nitrogênio para a microbiota do composto e para o *A. blazei* propriamente dito, fornece também uma riqueza de outros elementos.

A textura e espessura do caule, a massa foliar e outras características das palhas, condicionaram o grau de decomposição destas e afetam de modo direto ou indireto as propriedades físicas, químicas e biológicas dos compostos, tal como a capacidade de retenção de água e a aeração. O período de 8 dias de pré-umedecimento das palhas pode ter sido excessivo para o tifton. Gerrits e Amsing (1991) relatam que a umidade influencia a densidade do composto e, de acordo com Straatsma (2004), quando a densidade do composto se torna elevada, o volume de poros são reduzidos.

Durante a compostagem, o composto à base de aveia apresentou quantidades elevadas de actinobactérias e odor reduzido de enxofre e amônia, podendo indicar durante o processo de compostagem, uma maior aeração e conseqüente menor teor de umidade, em relação ao composto à base de tifton, estas características podem ter contribuído para uma tendência de maior produtividade dos compostos

à base de aveia, em função de uma maior quantidade de folhas e maior rigidez do caule.

Não houve efeito do tipo de camada de cobertura sobre as variáveis analisadas (Tabela IV). Contudo, houve tendência de eficiência biológica, produção e número de basidiomas maiores em função de tipo de camada de cobertura utilizada, obedecendo à sequência gel de acrilamida >testemunha >farelo de soja.

Quanto à massa de basidiomas, a sequência foi (testemunha = farelo de soja) > gel de acrilamida. A eficiência biológica, a produção e o número de basidiomas da camada de cobertura à base de gel de acrilamida (média dos dois compostos), tenderam a serem 18 e 26%; 17 e 26% e 18 e 30,5% superiores as obtidas nas camadas de cobertura controle e farelo de soja, respectivamente. Por outro lado, a massa de basidioma na camada de cobertura controle e à base de farelo de soja tendeu a ser 15% superior à obtida com camada de cobertura de gel de acrilamida (Tabela IV).

A camada de cobertura à base de gel de acrilamida, sobreposta ao composto de tifton apresentou o maior número de basidiomas colhido no dia 89 com 10,25 basidiomas possuindo a massa de 13,86g (Figura 2), o que representa uma redução de 6% a média da massa de basidioma apresentada por esse tratamento (14,75g). Até o dia 89 a eficiência biológica alcançada foi de 27%. Já no composto à base de aveia, este valor se encontra no dia 41 onde se colheu 11,5 basidiomas com massa de 16,27g, neste caso os basidiomas apresentaram 5% a mais da massa média obtida por este tratamento (15,5g). A eficiência biológica alcançada até o dia 41 foi de 10%

A camada de cobertura adicionada de gel de acrilamida tendeu em apresentar maior eficiência biológica, produção e número de basidiomas que as demais camadas de cobertura, devido este material aumentar a capacidade

de retenção de água da camada de cobertura. Porém Kurtzman (1996), trabalhando com camada de cobertura utilizando gel de acrilamida, não encontrou resultados positivos quando este gel foi adicionado ao solo argiloso/barrento “Turface”. O autor explica que uma das principais características da camada de cobertura é a porosidade e quando se adiciona o gel de acrilamida na “Turface”, esta é reduzida. Assim no presente trabalho para que não ocorresse este problema a camada de cobertura foi adicionada de 25% de carvão vegetal (fragmentos de 0,5 a 2,5cm), visando o aumento da porosidade e evitando a compactação do solo devido o turno de rega diário ao longo do cultivo.

A camada de cobertura controle é largamente utilizada no Brasil devido apresentar custo reduzido. Com relação ao tipo de solo a ser utilizado, Zied (2008) ressalta que o solo deva ter os seguintes teores: areia 462,5-556,5g·kg⁻¹, silte 126,5-90,65g·kg⁻¹ e argila 411,5-352,5g·kg⁻¹, ainda com relação ao solo, o autor demonstra que valores de densidade do solo próximo a 1,0325g·cm⁻³ apresenta produtividade elevada, porém no presente trabalhos não foram realizadas análises físicas do solo.

O composto à base de tifton sobreposto com a camada de cobertura “controle” apresentou o maior número de basidiomas colhido no dia 114 com 5,25 basidiomas possuindo 23,54g de massa (Figura 3), o que representa um aumento de 16% a média da massa apresentada por esse tratamento (19,75g). Até o dia

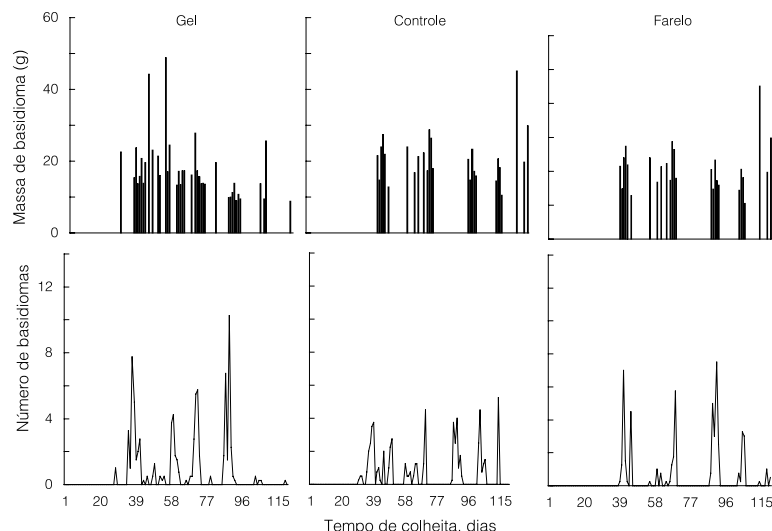


Figura 2. Número e massa de basidiomas em função de dias de colheita no composto à base de tifton utilizando as três camadas de cobertura.

114 a eficiência biológica alcançada foi de 24%. Já no composto à base de aveia, este valor foi encontrado no dia 71 com 9,25 basidiomas de massa de 18,56g, neste caso os basidiomas apresentaram 6% a mais de massa (15,5g). A eficiência biológica alcançada até o dia 71 foi de 16%.

Esta camada de cobertura quando adicionada sobre o composto à base de tifton se destacou por apresentar basidiomas com massa elevada de 75g, cerca de 25% a mais do que a camada de cobertura de gel de acrilamida neste mesmo composto (Tabela IV).

Finalmente a camada de cobertura à base de farelo de soja, sobreposta ao composto à base de tifton, apresentou maior número de basidiomas colhido no dia 91 com 7,5 basidiomas possuindo a massa de 17,4g, o que representa um aumento insignificante na média da massa apresentada por este tratamento (17,25g). Até o dia 91 a eficiência biológica alcançada foi de 18%. Já no composto à base de aveia, este valor se encontra no dia 41 com 7 basidiomas e massa de 17,36g, neste caso, os basidiomas apresentaram 6% a menos de massa. A eficiência biológica alcançada até o dia 41 foi de 6%.

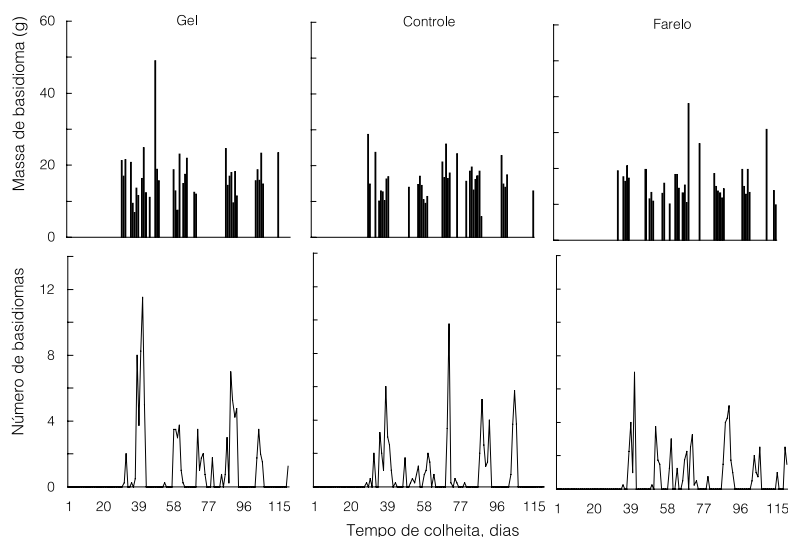


Figura 3. Número e massa de basidiomas em função de dias de colheita no composto à base de aveia utilizando as três camadas de cobertura.

Observando as Figuras 2 e 3, nota-se que as maiores massas de basidiomas são presenciadas, quando se tem o menor número de basidioma colhido ao dia.

Muitos autores citam que a camada de cobertura deve ser pobre em nutrientes (Minhoni *et al.*, 2005; Oei, 2003). Porém Han (1999) trabalhando com bactérias fotossintética (*Rhodospseudomonas palustris*), encontrou resultados positivos quando à pulverizava a camada de cobertura na diluição 3.003×10^9 UFC, em seguida o autor questiona, até que ponto a camada de cobertura deve ser pobre. O autor enfatiza ainda que a quantidade de cogumelos doentes neste trabalho se manteve semelhante à testemunha, onde não foi aplicada a solução contendo bactéria.

Outro fator importante diz respeito à eficiência biológica no composto à base de aveia, com as camadas de cobertura de gel de acrilamida e a de farelo de soja (EB= 36,25% e EB= 24,5%). Estes resultados quando aplicado estatisticamente não demonstram diferença significativa, devido o elevado coeficiente de variação (Tabela IV). Mas a nível de produção comercial este resultado torna-se de grande importância, pois se refere praticamente a 32,5% do ganho de produtividade em um cultivo (Tabela V).

Conclusão

A adição de gel de acrilamida ou farelo de soja à camada de cobertura não afetou as variáveis analisadas. Com relação ao tipo de palha adicionada na formulação do composto, como um complemento ao bagaço de cana-de-açúcar, este também não afetou a produção. Houve apenas uma tendência de melhores resultados no composto com a palha de aveia e camada de cobertura adicionada de gel de acrilamida.

REFERÊNCIAS

- Andrade MCN, Minhoni MTA, Kopytowski Filho J, Zied DC (2006) Camadas de cobertura mais utilizadas na região de Piedade/SP para o cultivo de *Agaricus blazei*. Em *Anais Simp. Int. Sobre Cogumelos no Brasil*. Embrapa. Brasília, Brasil. p. 109.
- Andrade MCN, Kopytowski Filho J, Minhoni MTA, Coutinho LN, Figueiredo MB (2007) Productivity, biological efficiency, and number of *Agaricus blazei* mushroom grown in compost in the presence of *Trichoderma* sp. and *Chaetomium olivacearum* contaminants. *Braz. J. Microbiol.* 38: 243-247.
- Carvalho WA (1983) *Levantamento de Solos da Fazenda Lageado*. Botucatu. Universidade Estadual Paulista. Botucatu, Brasil. 95 pp.
- Dhar BL (1994) Mushroom composting for *Agaricus bisporus*/bitorquis. Em Nair MC (Ed.) *Advances in Mushroom Biotechnology*. Jodhpur, India. pp. 84-90.
- Gerrits PG, Amsing JGM (1991) Water relations in indoor compost. Em Maher MJ (Ed.) *Science and Cultivation of Edible Fungi*. Vol 1. Balke-ma. Rotterdam. Holanda. pp. 181-186.
- Han J (1999) The influence of photosynthetic bacteria treatments on the crop yield, dry matter content, and protein content of the mushroom *Agaricus bisporus*. *Sci. Hort.* 82: 171-178.
- Hayes WA, Randle PE, Last FT (1969) The nature of microbial stimulus affecting sporophore formation in *Agaricus bisporus* (Lange) Sing. *Ann. Appl. Biol.* 64: 177-187.
- Kopytowski Filho J (2006) *Produtividade e Eficiência Biológica de Agaricus blazei (Murrill) Heinemann, em Diferentes Condições de Cultivo*. Tese. Universidade Estadual Paulista, Botucatu, Brasil. 134pp.
- Kopytowski Filho J, Minhoni MTA (2004) C/N ratio on yield of *Agaricus blazei* Murrill ss. Heinemann. Em Romaine CP (Ed.) *Science and Cultivation of Edible Fungi*. Penn State University. Philadelphia, EEUU. pp. 213-220.
- Kurtzman RH (1995) *Agaricus bisporus* (Large.) Imb. casing layer III: Casing from inert material. Em *Proc. Int. Scient. Cong. Cultivation Of Edible Fungi: Mushroom Science*. Vol. 1. Balkena. Rotterdam, Holanda. pp. 333-337.
- Kurtzman RH (1996) *Agaricus bisporus* (Large.) Imb. Casing Layer IV: Ion exchange and Soluble bicarbonate Ion. *Int. J. Mushr. Sci.* 1: 27-32.
- Minhoni MTA, Kopytowski Filho J, Andrade MCN (2005) *Cultivo de Agaricus blazei Murrill ss. Heinemann*. 3ª ed. FEPAF. Botucatu, Brasil. 141 pp.
- Minhoni MTA, Kopytowski Filho J, Andrade MCN, Zied DC (2006) Avaliação de diferentes métodos de desinfestação da camada de cobertura no cultivo do cogumelo *Agaricus blazei* Murrill ss. Heinemann. Em *Anais FERTBIO 2006*. Embrapa. Bonito, Brasil. pp. 1-4.
- Nair MC, Gokulapalan, CDL (1994) *Mushroom Biotechnology*. Jodhpur, India. 193 pp.
- Noble R, Dobrovinn-Pennington A (2005) Partial substitution of peat in mushroom casing with fine particle coal tailing. *Sci. Hort.* 104: 351-367.
- Oei P (2003) *Mushroom Cultivation*. 3ª ed. Backhuys. Leiden, Holanda. 429 pp.
- Pardo A, Juan A, Pardo E (2003) Characterization of different substrates for possible use as casing in mushroom cultivation. *Sci. Technol.* 1: 107-114.
- Snedcor GWE, Cochran WG (1972) *Statistical Methods*. 6ª ed. Iowa State University Press. Ames, IA, EEUU. 325 pp.
- Straatsma G (2004) Processing and composition of mushroom compost. Em Romaine CP (Ed.) *Science and Cultivation of Edible Fungi*. Penn State University. Philadelphia, EEUU. pp. 241-246.
- Zied DC (2008) *Camadas de Cobertura com Diferentes Combinações de Solos e Ambientes de Cultivo na Produção do Cogumelo Agaricus blazei (Murrill) ss. Heinemann*. Tese. Universidade Estadual Paulista, Brasil. 120 pp.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO	
RAD: 12-49370- -7	FECHA: 2013-07-25 16:14:14
DEP: 2020 DIRECCION DE NUEVAS CREACIONES	EVE: 379 FASE NACIONAL INCLUIDO CAPITULO II
TRA: 11 PCT-PATENTE DE INVENCION CAPITULOS I Y II	FOLIOS: 5
ACT: 519 PRESENTACION	

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

2020
Bogotá, D.C.,

Abogado(a)/Señor(a)
GUSTAVO ADOLFO ORTEGA HERNANDEZ

Asunto: Radicación: 12-49370- -7
 Trámite: 11
 Evento: 379
 Actuación: 519
 Oficio: 13497
 Folios: 5

Patente de Invención	X			Patente de Modelo de Utilidad	
Vía Nacional					
Vía PCT (Fase Nacional)	X	Capítulo I		Capítulo II	X
No. Solicitud Internacional	PCT/IB2009/007405				
Fecha de Presentación Internacional	28/10/2009				

Como resultado del Examen de Fondo realizado, con fundamento en el Artículo 45 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se comunica:

1. Documentos estudiados

Descripción	Rad. N° 12-049370-00000-0000	23/marzo/2012
Reivindicaciones:	Rad. N° 12-049370-00001-0000	23/marzo/2012

2. Objeto de la invención

De acuerdo con lo establecido en el numeral 1.2.2.2 del Capítulo Primero del Título X de la Circular Única para efectos del examen de patentabilidad, se tendrá en cuenta la tasa pagada por el solicitante al momento de comenzar el examen para las reivindicaciones adicionales; esto es que cuando la solicitud contenga más de diez (10) reivindicaciones y no se haya pagado la tasa complementaria, sólo se estudiarán las cubiertas por la tasa pagada. Por lo tanto, se estudiaran las reivindicaciones 1 a 19.

Título de la solicitud: “Proceso de compostaje rápido de material vegetal verde para la producción del champiñón” (Fl. 1).

El problema planteado en esta solicitud consiste en la necesidad de proporcionar un procedimiento útil para la preparación de compost para el cultivo de champiñones, rápido, sencillo, fácil de elaborar, de alta eficiencia, económico, más seguro y

ambientalmente favorable.

Para resolver este problema técnico, la solicitud en estudio proporciona un procedimiento para la reparación de un compost óptimo y rápido para el cultivo de champiñones, caracterizado por las etapas de fase 1, en el primer día, mezclar entre un 45-75% de la materia seca de materia vegetal verde, como pasto de corte, con 25-55% de la materia seca de bagazo de caña y formar una pila; en el día tres agregar yeso del 8 al 10% de la materia seca y mezclar, rearmar la pila; día cinco mezclar y formar la pila nuevamente; día siete, mezclar y humedecer si es necesario, pasteurizar y acondicionar en el túnel durante los siguientes cuatro días. En la fase dos la siembra y suplementación del compost. Además, la invención proporciona un compost específico para el cultivo de champiñones obtenido mediante el procedimiento anterior.

El objeto de la presente solicitud se relaciona con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP): C 05 F 17/00, A 01 G 1/04.

3. De la solicitud de patente

Reivindicaciones (Art 30 D 486, Art 22 PCT)

Durante la evaluación de claridad y concisión de las reivindicaciones, esta Oficina encontró que:

- Las reivindicaciones 13 a 17, no son claras porque presentan resultados a obtener *“pH entre 7.5 a 8 a la siembra”, “porcentaje de cenizas entre 18 y 22% a la siembra”, “porcentaje de nitrógeno entre 1.6 a 2 antes de suplementación y siembra”, “por su contenido de nitrógeno de 2 a 4 después de la siembra y suplementación”, “relación C/N de 19 a 23 a la siembra, después de suplementado”,* lo cual no es permitido, puesto que las citadas reivindicaciones incluirían no sólo la solución propuesta por el solicitante, sino todas las alternativas presentes o futuras que lleguen a ese resultado.
- Las reivindicaciones 8 y 9, 18 y 19 no son claras porque presentan efectos *“no hay emisiones de olores pestilentes”, “hay una reducción del 40-50% en emisiones de gases contaminantes CO₂ y NH₃”, “admitir hasta un 75% de agua a la siembra sin que ello afecte la estructura del compost ni se inhiba el buen desarrollo del micelio”, “admitir hasta un 80% de humedad al armado sin que por ello lixivie o se haga anaerobio”,* lo cual no es permitido. Las reivindicaciones deben caracterizar el proceso por una secuencia de etapas técnicas con sus condiciones (materias primas, equipos, temperaturas, flujos, presiones, etc.), por medio de las cuales se transforme una materia en un producto o se obtenga un resultado y las reivindicaciones de producto se caracterizan por la forma o constitución del mismo y las partes que lo componen. No se aceptan reivindicaciones que caractericen resultados, usos, ventajas o efectos.
- La reivindicación 1, no es clara porque presenta términos generales *“longitud necesaria”,* que sugieren de forma imprecisa que la protección se extiende a otras posibles variaciones o modificaciones.
- La reivindicación 3, no es clara porque presenta términos indefinidos *“al menos”,* utilizado para definir el rango de las características del procedimiento deben eliminarse. Estos términos no permiten establecer un intervalo puntual para cada una de las características técnicas, no siendo estas precisas y por lo tanto no claras, ya que no permiten una comparación con el estado de la técnica.
- No existe concisión entre las reivindicaciones 1 y 10 ya que contienen la misma materia a proteger.

- La reivindicación 12 referida a un producto en particular un compost, presenta una falsa dependencia y no es clara porque se encuentran defina en términos del procedimiento de fabricación “se obtiene mediante el proceso de la reivindicación 1”, que se logra de acuerdo a un procedimiento específico, los componentes y los rangos utilizados. Las reivindicaciones deben caracterizar un producto por la forma o constitución del mismo y las partes que lo componen, como por los componentes y los rangos de estos. No se aceptan reivindicaciones que caractericen un producto como resultados, usos o efectos. Al respecto no debe olvidarse que las reivindicaciones de producto y de procedimiento son diferentes y, por ello, deben redactarse de manera independiente en el pliego reivindicatorio. Sobre las mismas, el Tribunal Andino de Justicia ha dicho lo siguiente:

“El objeto de la invención de producto está constituido por un cuerpo cierto destinado llenar una necesidad industrial que el estado de la técnica aún no ha satisfecho. En cambio, el objeto de la invención de procedimiento se encuentra conformado por “una serie o sucesión de operaciones que inciden sobre una materia (solida, liquida o gaseosa) que se encamina a la obtención de una cosa o un resultado”. (Otero Lastres, José Manuel. Ob. Cit)¹

4. Determinación del Estado de la Técnica

El estado de la técnica se determinó con base en la fecha de presentación internacional, es decir, 28 de octubre de 2009.

Consultadas las fuentes de información con que se cuenta, se encontró el siguiente documento que anticipa el objeto de esta solicitud:

Ítem	Documento	Título	Fecha de Publicación
D1	Artículo 1	“Cultivo moderno del champiñón”	1996
D2	Artículo 2	“Microbial diversity in a bagasse-bases compost prepared for the production of <i>Agaricus brasiliensis</i> ”	Septiembre 2009
D3	Artículo 3	“Production of <i>Agaricus blazei</i> ss. Heinemann (A-brasiliensis) in function of different casing layers and composts”	Junio 2009

El documento D1² divulga el proceso de compostaje para la producción del champiñón (Cultivo moderno del champiñón. P.J.C. Vedder. 1996. Madrid. España. Págs. 172 a 204).

El documento D2 divulga el proceso de producción de hongos el cual depende de la composición química de la base sustratos y suplementos adicionales empleados en el compost, así como en el método de compostaje. Con el fin de minimizar el coste de la producción, un interés considerable se ha demostrado en el uso de residuos agro-industriales en la preparación de mezclas alternativas de compost. Sin embargo, la interacción de la microbiota natural presente en los residuos agrícolas durante el proceso de compostaje influye mucho en la posterior colonización por el hongo. El objetivo del presente estudio fue aislar e identificar el microbiota presente en un bagazo de caña y de la costa transversal compost de paja preparado para la producción de *Agaricus brasiliensis*. El compostaje duró 14 días, tiempo durante el cual los sustratos y

1 Proceso 129-IP-2007

2http://books.google.com.co/books?id=igWSb9D7fckC&pg=PA172&lpg=PA172&dq=composicion+compost+champi%C3%B1on&source=bl&ots=mV3umfRO31&sig=82x1s6Nj10NlmsRQItNKsgNHtTs&hl=es&sa=X&ei=a5e2UYiaFlrq8gSf_4GoDw&ved=0CDMQ6AEwAg#v=onepage&q=composicion%20compost%20champi%C3%B1on&f=false

aditivos fueron mezclados cada 2 días, y esto fue seguido por una pasteurización de vapor de dos etapas (55 - 65 ° C; 15 h cada paso) (Ferreira, C. et al. Microbial diversity in a bagasse-bases compost prepared for the production of *Agaricus brasiliensis*. Brazilian Journal of Microbiology. Septiembre 2009. Vol. 9. No. 3. Resumen. Pág. 590-600).

El documento D3 divulga un estudio para evaluar la eficiencia biológica, rendimiento, peso fresco y número de setas de la especie *Agaricus blazei* cultiva en dos tipos de compost preparado con Tifton (*Cynodon* sp) con la hierba y la avena (*Avena sativa*) de paja, y tres capas de envoltura. Los resultados mostraron una tendencia de mayor rendimiento y eficiencia biológica cuando se añade gel acrilamida al suelo. Los abonos hechos con paja de avena presentan una tendencia a un mayor rendimiento y eficiencia biológica en comparación con el Tyfton. (Zied D.C. et al. Production of *Agaricus blazei* ss. Heinemann (A-brasiliensis) in function of different casing layers and composts. Interciencia. Junio 2009. Vol. 34, No. 6, Pág. 437 a 442).

5. Examen de Patentabilidad (Art 14 D486)

Nivel inventivo (Art18 D486)

Las reivindicación 13 a 15 consisten en “Compost específico para el cultivo de champiñones según la reivindicación 12 (...)” (Ver página 3 del radicado N° 12-049370-00001-0000).

La reivindicación 12 no contiene materia que se pueda analizar, por lo tanto se estudiaran las características técnicas del compost mencionadas en las reivindicaciones 13 a 15.

Comparación de las características técnicas esenciales, con las del estado de la técnica:

Rev.	Características esenciales	D1
13 a 15	Compost específico para el cultivo de champiñones según la reivindicación 12, caracterizado porque	Compost para champiñón (Pág. 172 a 204).
13	Tiene un pH entre 7.5 – 8 a la siembra.	El pH durante el compostaje desciende a 8.5, en la pasterización a 7.5, aproximadamente , y durante el desarrollo del micelio baja a 7 (Pág. 174, líneas 28 y 29) (resultado a alcanzar)
14	Contiene un porcentaje de cenizas entre 18 y 22% a la siembra.	No menciona. (resultado a alcanzar)
15	Un porcentaje de nitrógeno entre 1.6 a 2 antes de la suplementación y siembra	Contenido de nitrógeno de 1.5 a 2% (Pág. 173, línea 34). (resultado a alcanzar)

El documento D1, se considera el estado de la técnica cercano a la invención definida en la reivindicaciones 13 a 15 porque divulgan compost para champiñones.

La diferencia entre la invención definida en la reivindicación 13 y el compost específico para el cultivo de champiñones de D1 consiste en que este último no menciona el porcentaje obtenido de cenizas 18 y 22% a la siembra.

El efecto que logra un compost que contiene un porcentaje de cenizas entre 18 y 22% a la siembra, es que facilita el crecimiento del champiñón por disminuir la conductividad eléctrica y disminuye el material que no es utilizado por el champiñón, ya que en el compost queda la mayoría de los minerales de la formulación.

Por lo tanto, el problema técnico objetivo que pretende resolver esta invención se puede formular así: ¿cómo modificar la composición del compost para el cultivo de champiñones conocido en D1 para facilitar el crecimiento del champiñón?.

Sin embargo, una persona normalmente versada en la materia con el saber general de la técnica D2 y D3 y con una serie de conocimientos específicos de la invención, esperaría que las características fisicoquímicas del compost final obtenido como el contenido de cenizas este en el rango reivindicado implícitamente, dado que el compost proviene de las mismas materias primas propuestas por la invención (bagazo de caña y material vegetal como pasto) y es obtenido por medio de un procedimiento muy similar, ya que la no humectación y aceleración de la fase I propuesta por la invención no parece influir en las características finales del compost, sino que únicamente mejoran el proceso de obtención del mismo, motivo por el cual se consideran obvias.

De igual manera, las reivindicaciones dependientes 16 a 19 no mencionan características técnicas tangibles adicionales que puedan brindarle nivel inventivo al objeto de la reivindicación 12, puesto que estas se encuentran redactadas en términos de resultados o efectos.

6. Conclusión

Los requisitos de Patentabilidad de la presente solicitud están afectados así:

Item	Documento	Reivindicaciones afectadas	Requisito que afecta
D1	Artículo 1	12 a 19	Nivel Inventivo
D2	Artículo 2	12 a 19	Nivel inventivo
D3	Artículo 3	12 a 19	Nivel inventivo

En cumplimiento del artículo 45 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se le indica que debe dar respuesta dentro del término de sesenta (60) días contados a partir de la fecha de notificación de la presente comunicación. En caso de no dar respuesta al presente requerimiento, o si a pesar de la respuesta subsistieran los impedimentos para la concesión, se denegará la patente.

Se invita al solicitante se sirva indicar, si así lo considera, su renuncia al término faltante de sesenta (60) días para dar respuesta a este requerimiento y presentarla por escrito.

Finalmente, se le recuerda al solicitante que si como respuesta a este requerimiento llegara a modificar el capítulo reivindicatorio y éste contenga más de diez (10) reivindicaciones, no pagará la tasa de modificación voluntaria pero sí la correspondiente al pago por reivindicación adicional.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única No. 10 de 2001.



JOSÉ LUIS SALAZAR LÓPEZ
Director de Nuevas Creaciones (c)

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista, de fecha 2013-07-30

Elaboró: Yenny Marcela Campos Borda
Revisó: Olga Ximena Benavides Salazar
Revisó: Maria Del Socorro Pimienta Corbacho

MICROBIAL DIVERSITY IN A BAGASSE-BASED COMPOST PREPARED FOR THE PRODUCTION OF *AGARICUS BRASILIENSIS*

Cristina Ferreira Silva; Raquel Santos Azevedo; Claudia Braga; Romildo da Silva; Eustáquio Souza Dias; Rosane Freitas Schwan*

Departamento de Biologia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, Brasil

Submitted: September 03, 2008; Approved: May 03, 2009.

ABSTRACT

Edible mushrooms are renowned for their nutritional and medicinal properties and are thus of considerable commercial importance. Mushroom production depends on the chemical composition of the basic substrates and additional supplements employed in the compost as well as on the method of composting. In order to minimise the cost of mushroom production, considerable interest has been shown in the use of agro-industrial residues in the preparation of alternative compost mixtures. However, the interaction of the natural microbiota present in agricultural residues during the composting process greatly influences the subsequent colonisation by the mushroom. The aim of the present study was to isolate and identify the microbiota present in a sugar cane bagasse and coast-cross straw compost prepared for the production of *Agaricus brasiliensis*. Composting lasted for 14 days, during which time the substrates and additives were mixed every 2 days, and this was followed by a two-step steam pasteurisation (55 - 65°C; 15 h each step). Bacteria, (mainly *Bacillus* and *Paenibacillus* spp. and members of the Enterobacteriaceae) were the predominant micro-organisms present throughout the composting process with an average population density of 3×10^8 CFU/g. Actinomycetes, and especially members of the genus *Streptomyces*, were well represented with a population density of $2 - 3 \times 10^8$ CFU/g. The filamentous fungi, however, exhibited much lower population densities and were less diverse than the other micro-organisms, although *Aspergillus fumigatus* was present during the whole composting process and after pasteurisation.

Key words: *Agaricus brasiliensis*, cane sugar bagasse; microbial diversity

INTRODUCTION

The mushroom species *Agaricus brasiliensis* (Cogumelo do sol), *A. bisporus* (Champignon), *Pleurotus sajor-caju* (Oyster mushroom) and *Lentinula edodes* (Shiitake) are of important

economical value on account of their exquisite flavour and proven medicinal properties (27). Moreover, the organoleptic, nutritional and medicinal characteristics of *A. brasiliensis* (also known as *A. blazei*, but more correctly named *A.*

*Corresponding Author. Mailing address: Departamento de Biologia, Universidade Federal de Lavras, 37200-000, Lavras, MG, Brazil.; Phone: +55 35 3829 1614 Fax: +55 35 3829 1341.; E-mail: rschwan@ufla.br

subrufescens) have been recognised worldwide (2) and have assured a prime position for this species on the international market (12, 30, 33).

In Brazil, the culture of *A. brasiliensis* is relatively recent, whilst productivity is variable and depends mainly on the type of substrate employed (12). The agronomic techniques involved in the culture of *A. brasiliensis* are similar to those used for *A. bisporus* except for some modifications in the preparation of the compost. While wheat straw, straw-bedded horse manure, chicken manure and gypsum (15) are typically employed as substrates in the commercial culture of mushrooms, there is considerable interest in finding cheaper and more readily available materials for compost production in which the C:N ratio is between 25:1 and 50:1. In this context, the agricultural waste materials sugar-cane bagasse and coast-cross straw are considered to be potential substrates for the cultivation of *A. brasiliensis* in Brazil.

The composting process comprises two stages: in stage I the organic residues are wetted, distributed in layers and mixed periodically for up to 2 weeks, while in the second stage the resulting compost is pasteurised and conditioned (4). Although, the final quality of the compost is determined by the overall composting process, success in mushroom production depends largely on stage II (27). During pasteurisation, microbial activity produces large quantities of heat that serve to eliminate many pests, pathogens and competing micro-organisms. In the conditioning stage, the thermophilic micro-organisms (especially the Actinomycetes) multiply and convert free ammonia into microbial protein. These micro-organisms perform a crucial role in the preparation of an appropriate mushroom compost since residual ammonia is highly toxic and hinders mycelia growth of *Agaricus* species, while the synthesised protein is important for the nutrition of the cultivated fungi (4, 8, 31).

In view of the pivotal importance of the thermophilic micro-organisms that multiply and develop during stage I and act during stage II of composting, we undertook the task of evaluating the microbial diversity that occurs during the preparation of a compost based on sugar-cane bagasse and coast-cross straw.

MATERIALS AND METHODS

Preparation of compost and sampling

The raw materials present in the studied substrate mix were sugar cane (*Saccharum officinarum* L.) bagasse (45%), coast-cross (*Cynodon dactylon* L. Pers.) straw (45%) and wheat bran (10%), supplemented with simple superphosphate (1%), KCl (1%), lime (2%) and gypsum (2%). The bagasse and coast-cross straw were thoroughly wetted and piled in uniform layers onto a wooden pallet. The pile was mixed every 2 days over a 2 week period, with a further addition of water in order to maintain the humidity at 65%. During the second mixing, wheat bran and the inorganic supplements were added to the compost. Immediately before each mixing, the temperature was measured at a depth of 20 cm from the top of the pile and a substrate sample (120 g) was collected for microbiological analysis (counting and identification of the micro-organisms present). After each mixing, the humidity of the pile was determined and, if necessary, extra water was added to maintain humidity.

At the end of stage I (day 14), the compost was submitted to a two-step pasteurisation treatment in a chamber (2 m wide x 2 m high x 24 m deep) equipped with forced ventilation and steam injection systems. The time of pasteurisation (15 h) was measured from the moment the temperature in the chamber reached 60°C, although temperatures of up to 65°C were recorded during the treatment. After the first pasteurisation step, the compost was removed from the chamber, mixed thoroughly and then

submitted to a second pasteurisation step under identical conditions.

Microbiological analysis

A total of eight samples of substrate were obtained during stage I of composting before mixing the pile, on days 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 and 14, and one sample was collected immediately after the pasteurisation procedure. Cell suspensions were prepared by mixing aliquots (20 g) of the samples in 180 mL of water containing 1% peptone and 5% NaCl and shaking the mixture thoroughly for 5 min. Serial dilutions of each sample solution were prepared and inoculated onto Petri dishes containing the following selective media: (1) Martin's medium for the isolation of filamentous fungi [KH_2PO_4 (1.0 g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.5 g/L), peptone (5.0 g/L), dextrose (10.0 g/L), Rose Bengal dye (0.038 g/L), agar (20 g/L), bacitracin (20 mg/L)], (2) YEPG medium for yeast isolation [yeast extract (5.0 g/L), peptone (10 g/L), glucose (20 g/L), agar (20 g/L); adjusted to pH 4.5], (3) Aaronson's medium for the isolation of Actinomycetes [KNO_3 (2.0 g/L), casein (0.8 g/L), NaCl (2.0 g/L), K_2HPO_4 (2.0 g/L), agar (20.0 g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (50 mg/L), CaCO_3 (20.0 g/L), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (40.0 g/L)], and (4) nutrient agar for the isolation of bacteria [meat extract (3.0 g/L), peptone 5.0 g/L, agar (20.0 g/L)]. Plates were incubated at 40°C for 48 h, after which the number of colony forming units (CFU) were counted and the microbial content of each substrate sample expressed in terms of CFU/g. From each type of medium on which isolated colonies were detected, a number equal to the square root of the total colonies were taken at random (16), and purified and stored in 20% glycerol at - 80°C for subsequent identification.

Identification of bacteria

The size, shape, colour, height and edge characteristics of each purified colony were noted, and the colonies were

submitted to Gram-staining and assayed for motility and the presence of catalase before being replicated onto plate count agar (PCA) slants and stored in 20% glycerol at -80°C. Gram-negative bacteria were identified with the aid of Difco Bac-Tray Kits I, II and III used according to the manufacturer's instructions. Gram-positive bacteria were subdivided into sporulating and non-sporulating species by inducing spore release at 80°C for 10 min, and subsequently identified from the results of biochemical and motility assays (14,16). Identities were confirmed using API galleries (BioMerieux, Marcy-l'Etoile, France).

Identification of Actinomycetes

The genera of isolates were identified according to standard morphological methods (16, 28). Isolates were examined for their abilities to utilise a range of substrates (i.e. sucrose, lactose, D-fructose, galactose, d-mannose, D-maltose, xylose, L-arabinose, cellobiose, rhamnose, sodium acetate and m-inositol) as sole carbon source. Each filtered and sterilised carbon source was added to carbon utilisation agar (ISP medium 9) (28, 37) at a concentration of 1.0% (w/v), with the exception of sodium acetate which was employed at 0.1% (w/v). Positive (glucose at 1.0% w/v) and negative (unsupplemented ISP 9) controls were included, and growth was evaluated after 7, 14 and 21 days.

The formation of acids by Actinomycetes in the presence a carbon source was determined by inoculating a double washed (sterile distilled water) spore suspension of an isolate onto a plate containing a basal medium [$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (1.0 g/L), KCl (0.2 g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.5 g/L), bromocresol purple (0.07 g/L), agar (15 g/L)] supplemented with the substrate. The results were considered to be positive when the colour of the medium changed from blue to yellow. Pigment formation was determined on glycerol/asparagine agar (ISP medium 5) after 14 days of incubation, and diffusible pigments were classified as brown, yellow, green or orange.

Melanin production was detected on tyrosine agar (ISP medium 7), and the formation of the dark brown to black soluble melanin pigment was recorded after 4 days of incubation (28).

Identification of filamentous fungi

The initial identification of the genera of fungal cultures grown on potato dextrose agar medium (Merck) was performed by morphotype analysis (particularly colour and appearance) under the optical microscope (21). Members of the genus *Aspergillus* were identified by microscopic examination of spores and mycelia, and subsequently classified further into the sections *Circumdati* (6), *Flavi* (7), *Nigri* and *Aspergillus* (17). Fungal identities were verified on the basis of literature data (21, 22, 26).

RESULTS AND DISCUSSION

A total of 570 microbial colonies were isolated from the experimental samples and analysed. A wide diversity in the number of individuals and species of bacteria, Actinomycetes and filamentous fungi present in the substrate was observed during the composting process. The levels of relative humidity during composting ranged from 68.5 to 74%, but this factor apparently had little effect on the growth and development of the micro-organisms. The highest temperatures (up to 62.6°C) were observed during the first 8 days of composting, and these probably resulted from the presence of the nutritional supplements that were added at the beginning of the process. According to Colak (8), the ideal composting temperature varies between 35 and 55°C, since under such conditions any ammonia produced is quickly removed and the substrate undergoes physical and chemical modifications conferring characteristics to the final compost that are most suitable for the growth of *Agaricus bisporus*.

The composting process is initiated by mesophilic micro-organisms that utilise simple carbohydrates and soluble nitrogen compounds (29). The rise in the internal temperature of the pile produced by the exothermic reactions of the microbiota establishes suitable conditions for the development of thermotolerant and thermophilic populations (Gram-positive bacteria and Actinomycetes), which also predominate after the thermophilic phase (3). These micro-organisms are essential for the selective properties of the compost that favour the growth of the mycelia of *Agaricus* species but are less suitable for competing organisms (13).

The initial population of micro-organisms in the bagasse and coast-cross straw mix was 3.2×10^8 CFU/g, of which 94% were bacterial species. The population density increased to an average of 7.1×10^8 CFU/g between the 2nd and 10th days of composting, after which it fell back to 5.7×10^8 CFU/g by the 14th day. Pasteurisation reduced the total microbial population even further by virtue of the high temperatures (> 60°C) applied.

The occurrence of bacteria, and especially of species of *Bacillus*, was observed in the bagasse and coast-cross straw mix during all of the composting stage, with an average population density of 3×10^8 CFU/g. Indeed, throughout composting, the bacteria formed the most predominant and numerous group of micro-organisms present, followed by the Actinomycetes and then the filamentous fungi (Fig.1). Similar results have been reported in the composting of wheat (1) and rice straw (3) in which prokaryotes together with a few fungi predominated during the earliest days of composting, whilst the Actinomycetes prevailed during the final period.

In the present study, 13 Gram-negative and 20 Gram-positive bacteria were identified in the substrate during composting and after pasteurisation (Table 1). All of the bacteria isolated are very common in soils and are natural

contaminants of agricultural residues, appearing mainly after harvesting and processing. Eighteen of the Gram-negative species belonged to the family Enterobacteriaceae while a further 6 were *Pseudomonas* species. With respect to the Gram-positive species, 8 were members of the genus *Bacillus* (Table 1). Species of *Bacillus* and *Pseudomonas*, as well as members of the Actinomycetes, are believed to play important roles in the assimilation and transformation of ammonia (25), whilst *Pseudomonas putida* is reported to exert a positive effect on the fructification of *A. bisporus* (10).

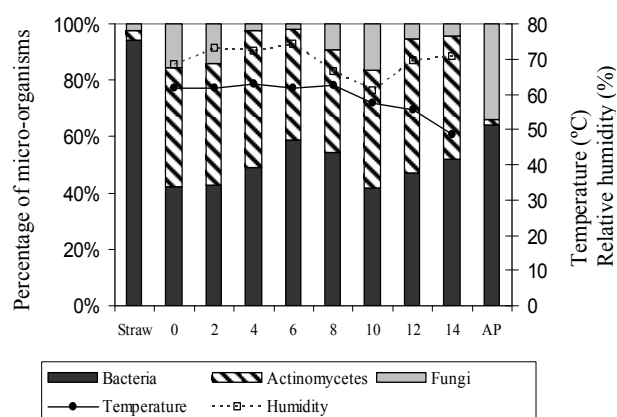


Figure 1. Percentage of micro-organisms present in the original compost materials (Straw), and in the substrate during composting and after pasteurisation (AP). The lines represent the dynamics of temperature (°C) and humidity (%) during the 14 days of composting of a substrate based on sugar cane bagasse and coast-cross grass

A number of pathogenic species, including *Enterobacter agglomerans*, *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*, were also isolated from bagasse and coast-cross straw during

stage I composting. *E. coli* was still detectable after pasteurisation for 30 h, demonstrating that steam pasteurisation is not sufficient to eliminate this contaminant. It has been reported that temperatures of between 54 - 70°C greatly influence the activity and diversity of micro-organisms in edible mushroom compost (20). Moreover, *E. coli*, *Salmonella* and other pathogenic species, including *B. subtilis* and *B. pumilus*, have been isolated from both stage I and II composts, and it is believed that such mesophilic bacteria are able to survive temperatures > 55°C through mechanisms of thermoresistance acquired by genetic mutation (9).

The microbiota present in bagasse and coast-cross straw prior to composting was very similar to those found on day 0 and day 2 of composting, and consisted mainly of *B. circulans* and *B. licheniformis*. The bacterial population altered notably during composting since, from the first day of mixing and onwards, other species of *Bacillus* were detected including *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. sphaericus*, *B. amyloliquefaciens* and *B. anthracis*. Gbolagade (13) also identified various species of *Bacillus* in compost prepared for the culture of *Pleurotus tuber-regium* and *Lentinus squarrosulus*. This author has suggested that *Bacillus* bacteria may stimulate the growth of cellulolytic thermophilic Actinomycetes, since the latter appeared in the substrate after the 2nd day of composting when the diversity of *Bacillus* was greatest. Species of *Paenibacillus* and *Bacillus* were also reported to be the most predominant Gram-positive bacteria in wheat straw-based compost employed in the culture of *Pleurotus ostreatus* (35). Apparently, these bacterial species promote the growth of the mushroom by secreting laccases and inhibiting the growth of *Trichoderma harzianum*. Additionally, species of *Bacillus* and *Paenibacillus* synthesise and excrete toxic peptides, the bacteriocins, which are capable of inhibiting the growth of yeast as well as

Table 1. Diversity of micro-organisms present in sugar cane bagasse and coast-cross straw before and during the composting process and after pasteurisation

Sample (CFU/g)	Bacteria ^a	Actinomycetes ^a	Filamentous fungi ^a
Bagasse and coast-cross straw	<i>Acinetobacter</i> sp <i>Bacillus circulans</i> (4) <i>Bacillus licheniformis</i> <i>Enterobacter agglomerans</i> <i>Klebsiella oxytoca</i> <i>Paenibacillus polymyxa</i> (3) <i>Pseudomonas putida</i> <i>Tatumella ptyseos</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i> (5)
Total population 3.2 x 10 ⁸			
Day 0 of composting	<i>Paenibacillus polymyxa</i> <i>Bacillus coagulans</i> <i>Bacillus licheniformis</i> <i>Bacillus megaterium</i> <i>Brevibacillus brevis</i> <i>Enterobacter agglomerans</i> (3) <i>Enterobacter gergoviae</i> <i>Pseudomonas paucimobilis</i> <i>Serratia marcescens</i> <i>Serratia plymutica</i> <i>Serratia odorifera</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i> (11) <i>Aspergillus niger</i> (3)
Total population 7.1 x 10 ⁸			
Day 2 of composting	<i>Bacillus circulans</i> (2) <i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus pumilus</i> <i>Paenibacillus polymyxa</i> <i>Enterobacter agglomerans</i> (2) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Klebsiella rhinoscleromatis</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i> (16) <i>Aspergillus niger</i> (4)
Total population 7.0 x 10 ⁸			
Day 4 of composting	<i>Bacillus megaterium</i> (2) <i>Paenibacillus polymyxa</i> <i>Paenibacillus macerans</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> (2) <i>Serratia odorifera</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i> (22) <i>Aspergillus niger</i> (2)
Total population 6.1 x 10 ⁸			
Day 6 of composting	<i>Bacillus circulans</i> (2) <i>Bacillus sphaericus</i> (3) <i>Bacillus pumilus</i> <i>Bacillus licheniformis</i> <i>Bacillus megaterium</i> <i>Paenibacillus macerans</i> <i>Acinetobacter</i> sp <i>Pseudomonas vesicularis</i> <i>Tatumella ptyseos</i> <i>Flavobacterium odoratum</i>	<i>Micronaspora</i> (2) <i>Streptomyces</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i> (20)
Total population 5.1 x 10 ⁸			
Day 8 of composting	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> <i>Bacillus licheniformis</i> <i>Bacillus pumilus</i> <i>Paenibacillus polymyxa</i> (3) <i>Enterobacter agglomerans</i> <i>Enterobacter aerogenes</i> <i>Enterobacter cloacae</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Klebsiella rhinoscleromatis</i> <i>Serratia odorifera</i> (2)	<i>Streptomyces</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i> (13)
Total population 5.5 x 10 ⁸			

Day 10 of composting	<i>Bacillus macerans</i> <i>Bacillus circulans</i> (2)	<i>Streptomyces</i> (2)	<i>A. fumigatus</i> (22)
Total population 6.2×10^8	<i>Corynebacterium</i> sp <i>Klebsiella pneumoniae</i>		
Day 12 of composting	<i>Bacillus cereus</i> <i>Bacillus circulans</i> (2)	<i>Micronospora</i> (5) <i>Nocardia</i> (2)	<i>A. fumigatus</i> (21)
Total population 6.4×10^8	<i>Acinetobacter</i> sp <i>Escherichia coli</i> <i>Enterobacter agglomerans</i> <i>Pseudomonas putida</i>	<i>Streptomyces</i> <i>Thermonospora</i> (2)	
Day 14 of composting	<i>Bacillus anthracis</i> <i>Bacillus licheniformis</i> (2)	<i>Dactylosporangium</i> (3) <i>Kibdelosporangium</i>	<i>A. fumigatus</i> (8)
Total population 5.8×10^8	<i>Bacillus megaterium</i> <i>Enterobacter agglomerans</i> <i>Pseudomonas stutzeri</i>	<i>Nocardia</i> <i>Streptomyces</i> (5) <i>Thermonospora</i> (3)	
After pasteurisation	<i>Bacillus circulans</i> (2) <i>Paenibacillus alvei</i>	<i>Streptomyces</i> (9) <i>Nocardia</i>	<i>A. fumigatus</i> (7)
Total population 4.7×10^8	<i>Paenibacillus polymyxa</i> (3) <i>Escherichia coli</i>		

^a The value shown in parenthesis indicates the number of separate isolates obtained for the species.

Gram-positive and Gram-negative bacteria (39).

In the present study, the incidence of Gram-negative bacteria was found to be greater on days 0 and 8 of composting in comparison with the other days, and the species identified were similar to those isolated from other types of compost (32). Various genera of Gram-negative bacteria, especially *Pseudomonas* and *Acinetobacter*, possess strong oxidative properties and are able to stimulate mycelia growth and the formation of fructification bodies in *Pleurotus ostreatus* (5). Additionally, species of *Enterobacter*, *Klebsiella* and *Escherichia*, together with *Bacillus*, are important for nitrogen fixation and in the solubilisation and release of phosphorus in the compost (32). Pasteurisation does not diminish the viability of these micro-organisms since the bacterial population was larger following this procedure than at any other point during the composting, and this is important for the maintenance of the natural microbiota of the compost.

The second largest population of micro-organisms in natural bagasse and coast-cross straw were the Actinomycetes with *ca.* 1×10^7 CFU/g (3.8% of the total

population, Fig.1). During composting the population of Actinomycetes increased remarkably (up to $2.0 - 3.0 \times 10^8$ CFU/g) especially between days 2 and 4, and between days 10 and 12. *Streptomyces* spp. were the only Actinomycetes that could be isolated during all steps of the composting process, whilst members of the genera *Nocardia*, *Micromonospora*, *Thermomonospora*, *Dactylosporangium* and *Kibdelosporangium* were variously detected on days 6, 12 and 14 of composting. *Streptomyces* and *Nocardia* were, however, the only Actinomycetes found after pasteurisation.

Actinomycetes are important for the preparation of compost suitable for colonisation by *Agaricus* since they degrade cellulose, thus diminishing the fibre content, and secrete biotin, thiamine and vitamin A. Moreover, Actinomycetes and some thermophilic fungi predominate at the end of stage II of composting (23), resulting in a reduction in the concentration, or the complete disappearance, of ammonia that is toxic for the *Agaricus* mushroom (36). When the compost cools down (to around 25°C) the thermophilic organisms become dormant and the biomass is subsequently digested by the *Agaricus*. A

significant reduction in Actinomycetes during steam pasteurisation is thus unfavourable to the production of high quality compost, even though such a strategy is employed by many small farmers who do not have access to the appropriate infrastructure by which to fully implement stage II composting.

The population of filamentous fungi was low during stage I of composting with a maximum size (1.2×10^8 CFU/g; 16.7% of the total population) being attained on day 10 (Fig.1). However, the density of these organisms increased to 1.6×10^8 CFU/g (34% of the total population) after pasteurisation, demonstrating that the thermoresistance of these organisms was second only to that of bacteria (population 3.0×10^8 CFU/g). The main role of the thermoresistant filamentous fungi that colonise compost material is to degrade lignocelluloses (34), thus diminishing the amount of fibre and increasing the availability of substrate for *Agaricus*. Although filamentous fungi are essential for the transformation of the natural plant substrate into compost (24, 36), this group was the least diversified with only two species (*Aspergillus fumigatus* and *A. niger*) being identified during the composting process. It is possible that other species were present in the compost, including those that do not produce asexual spores, but for their isolation it would be necessary to use techniques other than those used in the present study. *A. fumigatus* was detected throughout stages I and II of composting, and its presence has also been reported in wheat straw-based compost as well (11). Although *A. fumigatus* is an opportunist pathogen that can produce allergic reactions in individuals that are exposed to the spores or are immunosuppressed (18,19), this fungus excretes thermostable cellulases (38, 40) that permit the release of soluble sugars and favour microbial succession during composting (4).

Following pasteurisation, the compost biomass contains high concentrations of organic and inorganic nutrients that favour the colonisation of edible mushrooms. In the present study, the species identified after pasteurisation of compost were *B. circulans*, *Paenibacillus alvei*, *P. polymyxa* and *E. coli*. The occurrence of *B. circulans* (a sporulating bacterium) at this stage can be explained by its strong thermoresistance, whilst the occurrence of *Paenibacillus* spp. and *E. coli* (non-sporulating bacteria) may be explained by the protective effect of the organic material present in the compost. No Gram-negative bacteria were isolated from the compost after pasteurisation. Although the population of Actinomycetes decreased remarkably as a result of pasteurisation, some *Streptomyces* persisted, thus demonstrating their resistance to temperatures of up to 65 °C.

In conclusion, compost based on sugar cane bagasse and coast-cross straw supported a diverse microbial population, consisting mainly of *Bacillus* spp, *Streptomyces* and *Aspergillus fumigatus*, which are responsible for the degradation of fibres and for the physical and chemical characteristics of the final compost. These species were the most persistent micro-organisms during stage I of composting and the most thermostable during pasteurisation. Low cost substrates, such as solid agro- industrial residues, are an economical alternative mainly because they are constantly available irrespective of the season, and are readily converted into an adequate mushroom substrate without requiring refined technology.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for financial support.

RESUMO

Diversidade microbiana em composto a base de bagaço de cana preparado para produção de *Agaricus brasiliensis*.

Os cogumelos comestíveis são apreciados pelas suas propriedades nutricionais e medicinais e, por essa razão, possuem alto valor econômico. A produção de cogumelos depende da composição química dos substratos básicos, dos suplementos utilizados e da preparação do composto no qual o fungo será cultivado. Considerando-se que os custos de produção precisam ser minimizados, os resíduos agroindustriais representam uma fonte alternativa e econômica para a preparação do composto. A interação da microbiota natural dos resíduos agrícolas durante o processo de compostagem influencia a subsequente colonização do cogumelo. Visando-se a produção de *A. brasiliensis*, o presente trabalho objetivou isolar e identificar a microbiota presente no composto preparado a partir de bagaço de cana e capim coast-cross. O processo de compostagem durou 14 dias com reviragens da pilha a cada dois dias, o qual foi seguido de pasteurização (55 - 65 °C) em duas fases por 15 h cada. As bactérias (principalmente *Bacillus*, *Paenibacillus* e espécies da família Enterobacteriaceae) foram os microrganismos predominantes durante todo o processo com uma densidade populacional média de 3.0×10^8 UFC/g. Os actinomicetos, principalmente os do gênero *Streptomyces*, estiveram bem representados, com uma densidade populacional de 2.0 a 3.0×10^8 UFC/g. Os fungos filamentosos foi a classe de microrganismos com menor densidade populacional e menor diversidade, embora a espécie *Aspergillus fumigatus* esteve

presente durante todo o processo de compostagem e também após a pasteurização do composto.

Palavras-chaves: *Agaricus brasiliensis*, bagaço de cana, diversidade microbiana.

REFERENCES

1. Atkey, P.T.; Wood, D.A. (1983). An electron microscope study of wheat straw composted as a substrate for the cultivation of the edible mushroom (*Agaricus bisporus*). *J. Appl. Microbiol.*, 55, 293-304.
2. Bellini, M.F.; Cabrioti, L.N.; Terezan, A.P.; Jordão, B.Q.; Ribeiro, L.R.; Mantovani, M.S. (2008). Cytotoxicity and genotoxicity of *Agaricus blazei* methanolic extract fractions assessed using gene and chromosomal mutation assays. *Genet. Mol. Biol.*, 31, 122-127.
3. Cahyani, V.R.; Matsuya, K.; Asakawa, S.; Kimura, M. (2004). Succession and phylogenetic profile of eukaryotic communities in the composting process of rice straw estimated by PCR-DGGE analysis. *Biol. Fertil. Soils*, 40, 334-344.
4. Chang, S.T., Miles, P.G. (2004). *Mushrooms: Cultivation, Nutritional Value, Medicinal Effect, and Environmental Impact*. CRC Press, Boca Raton, FL.
5. Cho, Y.S.; Kim, J.S.; Crowley, D.E.; Cho, B.G. (2003). Growth promotion of the edible fungus *Pleurotus ostreatus* by fluorescent pseudomonads. *FEMS Microbiol. Lett.*, 218, 271-276.
6. Christensen, M. (1981). A synoptic key and evaluation of species in the *Aspergillus flavus* group. *Mycologia*, 73, 1056-1084.
7. Christensen, M. (1982). The *Aspergillus ochraceus* group: Two new species from western soils and a synoptic key. *Mycologia*, 74, 210-225.
8. Colak, M. (2004). Temperature profiles of *Agaricus bisporus* in composting stages and effects of different composts formulas and casing materials on yield. *African J. Biotechnol.*, 3, 456-462.
9. Droffner, M.L.; Brinton Jr., W.F.; Evans, E. (1995). Evidence for the prominence of well characterized mesophilic bacteria in thermophilic (50-70°C) composting environments. *Biomass Bioenergy*, 8, 191-195.
10. Eger, G. (1972). Experiments and comments on the action of bacteria on sporophore initiation in *Agaricus bisporus*. *Mushroom Sci.*, 8, 719-725.
11. Fermor, T.R.; Randle, P.E.; Smith, J.F. (1985). Compost as substrate and its preparation. In: Flegg, P.B.; Spencer, D.M.; Wood, D.A. (eds).

- The Biology and Technology of the Cultivated Mushroom*. John Wiley, Chichester, UK. p.81-109.
12. Firenzuoli, F.; Gori, L.; Lombardo, G. (2007). The medical mushroom *Agaricus blazei* Murril. Literature and pharmaco-toxicological problems. *e-CAM*, 5, 3-15.
 13. Gbolagade, J.S. (2006). Bacteria associated with compost used for the cultivation of Nigerian edible mushroom *Pleurotus tuber-regium* (Fr.) Singer and *Lentinus squarrosulus* (Berk.). *African J. Biotechnol.*, 5, 338-342.
 14. Hammes, W.P.; Hertel, C. (2003). The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. In: Dworkin, M. (ed.). *The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community*, 3rd Edn. Springer Verlag, New York, NY. p. 320-403.
 15. Have, R.T.; Wijngaard, H.; Aries-Kronenburg, N.A.E.; Straatsma, G.; Schaap, P.J. (2003). Lignin degradation by *Agaricus bisporus* accounts for a 30% increase in bioavailable holocellulose during cultivation on compost. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 2242-2245.
 16. Holt, J.G.; Krieg, N.R.; Sneath, P.H.A.; Staley, J.T.; Williams, S.T. (1994). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9th Edn. Williams and Wilkins, Baltimore, MD.
 17. Klich, M.A.; Pitt, J.I. (1988). *A Laboratory Guide to Common Aspergillus Species and their Teleomorphs*. CSIRO Division of Food Processing, North Ryde, Australia.
 18. Latgé, J.P. (1999). *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clin. Microbiol. Rev.*, 12, 310-350.
 19. Latgé, J.P. (2001). The pathobiology of *Aspergillus fumigatus*. *Trends Microbiol.*, 9, 382-389.
 20. Miyatake, F.; Iwabuchi, K. (2005). Effect of high compost temperature on enzymatic activity and species diversity of culturable bacteria in cattle manure compost. *Biores. Technol.*, 96, 1821-1825.
 21. Pitt, J.I.; Hocking, A.D. (1997). *Fungi and Food Spoilage*, 2nd Edn. Chapman and Hall, Cambridge, UK.
 22. Raper, K.B.; Fennell, D.I. (1965). *The Genus Aspergillus*. Williams and Wilkins, Baltimore, MD.
 23. Ross, R.C.; Harris, P.J. (1983). The significance of thermophilic fungi in mushroom compost. *Sci. Hort.*, 20, 61-70.
 24. Ryckeboer, J.; Mergaert, J.; Coosemans, J.; Deprins, K.; Swings, J. (2003). Microbiological aspects of biowaste during composting in a monitored compost bin. *J. Appl. Microbiol.*, 94, 127-137.
 25. Ryckeboer, J.; Mergaert, J.; Vaes, K.; Klammer, S.; De Clerco, D.; Coosemans, J.; Insam, H.; Swings, J. (2003) A survey of bacteria and fungi occurring during composting and self-heating process. *Ann. Microbiol.*, 53, 349-410.
 26. Samson, R.A.; Hoekstra, E.S.; Frisvad, J.C.; Filtenborg, O. (1995). *Introduction to Food-Borne Fungi*, 4th Edn. Centraalbureau Voor Schimmelcultures, Baarn, The Netherlands.
 27. Sánchez, C. (2004). Modern aspects of mushroom culture technology. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 64, 756-762.
 28. Shirling, E.B.; Gottlieb, D. (1966). Methods for the characterization of *Streptomyces* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 16, 313-340.
 29. Smith, J.F.; Wood, D.A.; Thurston, C.F. (1995). Growth measurement of *Agaricus* mycelium in composed substrates as an indicator of compost selectivity and mushroom productivity. In: Elliot, T.J. (Ed). *Science and Cultivation of Edible Fungi*. Balkema, Rotterdam.
 30. Stijve, T.; Amazonas, M.A.L.A.; Giller, V. (2002). *Flavor and Taste Components of Agaricus brasiliensis ssp. Heinenm: a New Gourmet and Medical Mushroom*. Deutsche Lebensmittel-Rundschau, Stuttgart, Germany.
 31. Straatsma, G.; Banson, R.A.; Olijnsma, T.W. (1994). Ecology of thermophilic fungi in mushroom compost, with emphasis on *Scytalidium thermophilum* and growth stimulation of *Agaricus bisporus* mycelium. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60, 454-458.
 32. Subbarao, N.S. (1992). *Biofertilizers in Agriculture*, 2nd Edn. Oxford and IBH Publishing, New Delhi, India.
 33. Takaku, T.; Kimura, Y.; Okuda, H. (2001). Isolation of an antitumor compound from *Agaricus brasiliensis* Murril. and its mechanism of action. *J. Nutr.* 131, 1409-1413.
 34. Tuomela, M.; Vikman, M.; Ataca, A.; Itävaara M. (2000). Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. *Biores. Technol.*, 72, 169-183.
 35. Velázquez-Cedeño, M.; Farnet, A.M.; Mata, G.; Savoie, J.M. (2008). Role of *Bacillus* spp. in antagonism between *Pleurotus ostreatus* and *Trichoderma harzianum* in heat-treated wheat-straw substrates. *Biores. Technol.* [doi 10.1016/j.biortech.2008.01.022]
 36. Vijay, B.; Gupta, Y. (1994). Microflora of *Agaricus bisporus* compost. In: Nair, M.C. (ed). *Advances in Mushroom Biotechnology*. Scientific Publishers, Jodhpur, India.
 37. Vijayalakshmi, K.; Vijayalakshmi, M. (2007). Studies on cultural, physiological and antimicrobial activities of *Streptomyces rochei*. *J. Appl. Sci. Res.*, 3, 2026-2029.
 38. Vries, R.P.; Visser, J. (2001). *Aspergillus* enzymes involved in the degradation of plant cell wall polysaccharides. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 65, 497-522.
 39. Watabe, M.; Rao, J.R.; Murphy, A.R.; Moore, J.E. (2003). Inhibition of *Listeria ivanovii* by *Paenibacillus lentimorbis* isolated from phase II mushroom compost. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 19, 875-877.

40. Ximenes, E.A.; Felix, C.R.; Ulhoa, C.J. (1996). Production of cellulases by *Aspergillus fumigatus* and characterization of one β -glucosidase. *Curr. Microbiol.*, 32, 119-123.

Diego Cunha Zied, Marli Teixeira de Almeida Minhoni, João Kopytowski Filho, Dorival Pires de Arruda, Meire Cristina Nogueira de Andrade

PRODUÇÃO DE *Agaricus blazei* ss. Heinemann (*A. brasiliensis*) EM FUNÇÃO DE DIFERENTES CAMADAS DE COBERTURA E SUBSTRATOS DE CULTIVO

Interciencia, vol. 34, núm. 6, junio, 2009, pp. 437-442,

Asociación Interciencia

Venezuela

Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=33911405012>



Interciencia,

ISSN (Versão impressa): 0378-1844

interciencia@ivic.ve

Asociación Interciencia

Venezuela

PRODUÇÃO DE *Agaricus blazei* ss. Heinemann (*A. brasiliensis*) EM

FUNÇÃO DE DIFERENTES CAMADAS DE COBERTURA

E SUBSTRATOS DE CULTIVO

Diego Cunha Zied, Marli Teixeira de Almeida Minhoni, João Kopytowski Filho,
Dorival Pires de Arruda e Meire Cristina Nogueira de Andrade

RESUMO

Avaliou-se o efeito de duas formulações de composto, com palha de tifton (*Cynodon sp.*) e com palha de aveia (*Avena sativa*) e três camadas de cobertura (testemunha, testemunha + gel de acrilamida e testemunha + farelo de soja) na produção, eficiência biológica, massa e número de basidiomas de *A. blazei*. O delineamento experimental foi em esquema fatorial 3x2 inteiramente casualizado, com quatro 4 repetições. A unidade experimental constou de 12-12,5kg de composto úmido. A presença de gel de acrilamida como camada de cobertura tendeu a apresentar maior produtividade e eficiência biológica. O composto à base de tifton apresentou uma tendência de menor produção e eficiência biológica em relação ao composto à base de aveia.

Introdução

A produção e o desenvolvimento de basidiomas de *Agaricus bisporus* não dependem unicamente da capacidade genética do micélio para a “frutificação”, mas também de fatores físicos, ambientais, químicos, nutricionais e microbiológicos (Pardo *et al.*, 2003). Devido a estes fatores o processo de compostagem e a adição da camada de cobertura tornam-se fundamentais para o cultivo de cogumelos Agaricáceos (Minhoni *et al.*, 2005). De acordo com Dhar (1994), o composto condiciona a produtividade e a composição química dos basidiomas.

A camada de cobertura afeta a qualidade e a uniformidade da produção, sendo considerada uma das maiores fontes de variação na indústria de cogumelos (Oei, 2003). Durante várias décadas, em muitos países, a camada de

cobertura mais utilizada foi composta por turfa adicionada de calcário ou carbonato de cálcio (Noble e Dobrovin-Pennington, 2005). Atualmente, muitos materiais vêm sendo testados em substituição à turfa. No Brasil, o uso de turfa como camada de cobertura ainda é reduzido, devido o elevado custo e sua consequente extração proibida, decorrente de danos ambientais gerados.

Independente do material a ser utilizado como camada de cobertura alguns parâmetros de qualidade deve ser obedecidos, tais como: textura franco-argilosa, com porosidade que permita a troca de gases, pH entre 6,8 e 7,5, capacidade de troca catiônica elevada, concentração reduzida de sais para minimizar um eventual déficit de água, reduzido material orgânico não decomposto, teores reduzidos de magnésio, contaminantes e

pragas (Nair e Gokulapalan, 1994; Kurtzman, 1995; Zied, 2008). Durante 2005-2006, em um levantamento dos materiais mais utilizados como camada de cobertura na região de Piedade, SP, verificou-se que terra (50% da preferência dos fungicultores) seguido de terra + carvão (37,5%) e de terra + carvão + vermiculita (12,5%) são os materiais mais freqüentemente utilizados (Andrade *et al.*, 2006).

Com relação às matérias primas utilizadas para a formulação do composto, fibras ligno-celulósicas vem sendo utilizadas, as quais são adicionadas de produtos nitrogenados, orgânicos e/ou inorgânicos (Kopytowski Filho e Minhoni, 2004). A suplementação de compostos tem o objetivo de fornecer nutrientes que possam ser absorvidas facilmente pelos cogumelos. O uso do farelo de soja como suplemento, está condicionado

ao pré-tratamento, no qual o formol tem excelente efeito de desinfetar e condicionar a liberação lenta dos nutrientes do suplemento, o qual não é estritamente seletivo para os cogumelos, podendo também fornecer nutrientes para diversos organismos contaminantes (Oei, 2003).

Hayes *et al* (1969) relatam que a suplementação da camada de cobertura com óleo de semente de algodão aumenta a produtividade devido à troca de ácidos graxos, esteróis e esteróis-ésteres no pseudo-tecido do cogumelo, induzindo à formação de primórdios, apesar de considerarem a camada de cobertura como material de baixo valor nutricional.

Verificando a importância destas duas etapas de produção (camada de cobertura x composto) no cultivo de cogumelos agaricáceos, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a produção, a efici-

PALAVRAS CHAVE / *Agaricus blazei* / Camada de Cobertura / Cogumelo / Composto / Cultivo /

Recebido: 04/08/2008. Modificado: 09/06/2009. Aceito: 10/06/2009.

Diego Cunha Zied. Engenheiro Agrônomo e Doutorando em Energia na Agricultura, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Brasil. Professor, UNESP, Brasil. Endereço: Departamento de Produção Vegetal. Rua José Barbosa de Barros, 1780 - Fazenda Lage-

ado, CP 237, CEP 18610-307, Botucatu/SP, Brasil. e-mail: dczied@fca.unesp.br

Marli Teixeira de Almeida Minhoni. Bióloga e Doutora, UNESP, Brasil. Professora, UNESP, Brasil. e-mail: marliminhoni@fca.unesp.br

João Kopytowski Filho. Engenheiro Agrônomo e Doutor em Energia na Agricultura, UNESP, Brasil. email: joaokopy@yahoo.com.br

Dorival Pires de Arruda. Mes- trando em Energia na Agricultura, UNESP, Brasil. e- mail: dorival@fca.unesp.br

Meire Cristina Nogueira de Andrade. Bióloga, Bolsista DCR/ CNPq/FAPEAM/INPA. e-mail: meire@inpa.gov.br

PRODUCTION OF *Agaricus blazei* ss. Heinemann (*A. brasiliensis*) IN FUNCTION OF DIFFERENT CASING LAYERS AND COMPOSTS

Diego Cunha Zied, Marli Teixeira de Almeida Minihoni, João Kopytowski Filho, Dorival Pires de Arruda and Meire Cristina Nogueira de Andrade

SUMMARY

The aim of this study was to evaluate yield, biological efficiency, fresh weight and number of mushrooms of *Agaricus blazei* grown in two kinds of compost, prepared with Tifton (*Cynodon sp.*) grass and with oat (*Avena sativa*) straw, and three casing layers (control, control + acrilamylde gel and soil and control + soybean meal). The experiment consisted of four repli-

cates (each with 12-12,5kg of fresh weight compost) arranged in a factorial scheme 3x2. The results showed a tendency for higher yield and biological efficiency when adding acrilamylde gel to the casing soil. The composts made with oat straw presented a tendency for higher yield and biological efficiency compared to the Tifton.

PRODUCCIÓN DE *Agaricus blazei* ss. Heinemann (*A. brasiliensis*) EN FUNCIÓN DE DIFERENTES CAMADAS DE COBERTURA Y SUSTRATOS DE CULTIVO

Diego Cunha Zied, Marli Teixeira de Almeida Minihoni, João Kopytowski Filho, Dorival Pires de Arruda y Meire Cristina Nogueira de Andrade

RESUMEN

Se evaluó el efecto de dos formulaciones de composta, con paja de césped Tifton (*Cynodon sp.*) y con paja de avena (*Avena sativa*) y tres camadas de cobertura (control, control + gel de acrilamida y control + salvado de soya) en la producción, eficiencia biológica, masa y número de basidiomas de *A. blazei*. El diseño experimental fue un esquema factorial 3x2 enteramente aleatorio con cuatro repeticiones. La unidad experimen-

tal consistió de 12-12,5kg de composta húmeda. La presencia de gel de acrilamida como camada de cobertura resultó en una tendencia a presentar mayor productividad y eficiencia biológica. La composta a base de Tifton presentó una tendencia a menor producción y eficiencia biológica en relación a la composta en base a avena.

ência biológica, a massa e o número de basidiomas de *A. blazei*, em função de duas formulações de composto e três camadas de cobertura.

Material e Métodos

O inóculo de *A. blazei* foi produzido a partir da linhagem ABL-04/49, isolada na cidade de São José do Rio Preto, Estado de São Paulo, Brasil, conservada no Banco de Matrizes do Módulo de Cogumelos, Departamento de Produção Vegetal, Defesa Fitossanitária, FCA/UNESP, Brasil.

O substrato utilizado para a produção do inóculo foi à base de grãos de triticale (*Triticum secale*), gesso e calcário calcítico. Os grãos foram previamente cozidos e, em seguida, adicionados de 20g.kg⁻¹ de calcário calcítico e 160g.kg⁻¹ de gesso. Após a homogeneização, autoclavou-se por 3h a 121°C; após o resfriamento, procedeu-se à inoculação de *A. blazei*. A metodologia utilizada seguiu os procedimentos adotados por Minihoni *et al.* (2005).

Previamente ao preparo dos compostos, amostras das palhas e bagaço de cana-de-

açúcar utilizados na formulação foram encaminhadas ao Laboratório de Fertilizantes e Corretivos para determinação do pH e dos teores de carbono e nitrogênio (Tabela I).

A formulação dos compostos é apresentada na Tabela II. O processo de compostagem Fase I (com duração de 12

dias) foi realizado em área coberta, com piso cimentado e laterais abertas. Antes da montagem das duas leiras de compostagem, as palhas de tifton (*Cynodon sp.*) e aveia (*Avena sativa*) foram umedecidas diariamente, durante 8 dias e reviradas a cada 2 dias.

TABELA I
TEOR DE UMIDADE, CARBONO E NITROGÊNIO DOS MATERIAIS UTILIZADOS NOS COMPOSTOS

Ingredientes	U	C	N	C/N
	%			
Bagaço de cana-de-açúcar	50,0	53,3	0,5	106,8
Palha de tifton	13,0	49,5	1,6	30,9
Palha de aveia	13,0	49,2	1,3	37,8
Farelo de soja	10,0	45,0	7,0	6,4
Uréia	0,0	27,0	45,0	0,6

U: umidade, C: carbono, N: nitrogênio, C/N: relação carbono/nitrogênio.

TABELA II
FORMULAÇÃO DOS COMPOSTOS A BASE DE PALHA DE TIFTON E AVEIA UTILIZADOS NO CULTIVO DE *A. blazei*

Ingredientes (kg)	Composto			
	Tifton		Aveia	
	PU	PS	PU	PS
Bagaço de cana-de-açúcar	600,0	300,0	600,0	300,0
Palha de tifton	280,0	243,6	-	-
Palha de aveia	-	-	280,0	243,6
Farelo de soja	90,0	81,0	100,0	90,0
Uréia	4,0	4,0	4,0	4,0
Gesso	11,0	10,0	11,0	10,0
Calcário calcítico	20,0	18,0	20,0	18,0
Total massa de composto (kg)	1005,0	656,6	1015,0	665,6
Total massa de carbono k(g)	-	318,1	-	321,4
Total massa de nitrogênio (kg)	-	12,8	-	12,6
Relação C/N inicial	-	24,9	-	25,6
Proporção de N farelo / N uréia (%)	-	3,2	-	3,5

PU: peso úmido, PS: peso seco.

Na montagem das leiras, caracterizando o início da Fase I de compostagem, foi feito com uma camada de 20cm de palha (tifton e/ou aveia), seguida de uma camada de 20cm de bagaço de cana-de-açúcar, e assim por diante até que as leiras atingissem aproximadamente 1,8m de altura por 1,8m de largura. Os suplementos e condicionadores (uréia, farelo de soja, gesso e calcário) foram misturados às leiras na primeira revirada destas. Após, foram realizadas mais 4 reviradas, em intervalos de 2 e/ou 3 dias, totalizando 5 reviradas. Durante as reviradas, adicionou-se água visando manter a umidade das leiras em 70-75%.

Ao final da Fase I de compostagem, os compostos foram transferidos para caixas plásticas treliçadas de polipropileno (56,5x46,5x28,5cm; comprimento, largura e profundidade, respectivamente), na quantidade de ~18kg de substrato úmido por caixa. As caixas foram dispostas ao acaso no interior de uma câmara climatizada (Dalsem Mushrooms) para pasteurização e condicionamento, dando início à Fase II de compostagem. A pasteurização foi realizada a $61 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 6h, e o condicionamento a $48 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 11 dias, totalizando 12 dias (Fase II). Em seguida, a temperatura dos compostos foi reduzida para 23°C , para a inoculação dos mesmos.

Os compostos foram transferidos manualmente para caixas menores, revestidas internamente com saco plástico de polietileno transparente perfurados na base. Procedeu-se a inoculação manualmente com a linhagem ABL-04/49 de *A. blazei*, na proporção de 1,25% do peso úmido do composto. Em seguida, as caixas foram cobertas com saco plástico e adicionou-se 12-12,5kg de composto (massa úmida). Após, as mesmas foram dispostas ao acaso em sala de incubação, onde per-

TABELA III
FORMULAÇÃO DAS CAMADAS DE COBERTURA UTILIZADAS
NO CULTIVO DE *A. blazei*

Tratamentos	Camadas de cobertura
T1 e T4	Solo 70% + carvão 25% + calcário calcítico 5% (controle)
T2 e T5	Solo 70% + carvão 25% + calcário calcítico 4,5% + gel de acrilamida 0,5%
T3 e T6	Solo 70% + carvão 25% + calcário calcítico 5% + farelo de soja (161g/caixa).

T1, T2 e T3: compostos à base de palha de tifton; T4, T5 e T6: compostos à base de palha de aveia.

maneceram por 15 dias a $28 \pm 1^\circ\text{C}$.

O solo utilizado nas camadas de cobertura foi classificado como Nitossolo Vermelho Distrófico (Carvalho, 1983), sendo este retirado a uma profundidade de 1,5-2,0m de profundidade e adicionado de carvão vegetal, calcário calcítico, farelo de soja e gel de acrilamida conforme os tratamentos (Tabela III).

Imediatamente após a mistura dos ingredientes, as camadas de cobertura foram adicionadas sobre os compostos colonizados. Não se adotou qualquer procedimento de desinfestação das camadas de cobertura devido à ausência de pragas e contaminantes no solo (nematóides, *Trichoderma* sp., *Verticillium* sp., *Dactylium* sp.). Apenas o farelo de soja que foi previamente desinfestado com solução de formol a 2% (Oei, 2003). Para tanto, o farelo foi condicionado em caixa plástica fechada e adicionado solução aquosa de formol a 2%. Após sete dias, misturou-se 160g de farelo de soja em cada caixa contendo o restante da camada de cobertura deste tratamento (T3-T6).

Após 15 dias de inoculação, adicionaram-se as camadas de cobertura com 5cm de altura sobre os compostos colonizados e revestiu novamente com filme plástico. Assim as caixas foram dispostas, ao acaso, sobre estrutura metálica, no interior de estufa rústica de

cultivo para a colonização das camadas de cobertura por 7 dias. A estufa era revestida com lona plástica dupla face (branca por fora e preta por dentro), a qual possuía controle parcial das variáveis ambientais (temperatura e umidade), sua respectiva medida era $6 \times 1,8 \times 2,1\text{m}$ (comprimento, largura e altura). Ao longo do período de cultivo, a temperatura interna variou entre $15-35^\circ\text{C}$ e a umidade relativa entre 45-95%. A colheita dos basidiomas foi manual, com o púleo ainda fechado. O período de frutificação durou 94 dias, com tempo total de experimentação de 120 dias após a adição da camada de cobertura.

A produção (P, kg) foi determinada através da soma da massa de basidiomas frescos (MB) de cada repetição e dividida por 4.

A eficiência biológica (EB, %), foi obtida com a relação entre a massa de basidiomas frescos (MBF) e a massa do composto seco (MCS), mul-

tiplicada por 100 (dados em porcentagem), ao final do período de colheita, $EB(\%) = MBF/MSC \times 100$ (%). O número de basidiomas (NB) foi determinado diariamente durante a fase de colheita, e a massa de basidiomas (MB; g)

foi obtida através da massa de basidiomas (MBF) divididos pelo número de basidiomas colhidos (NB).

Os dados foram submetidos à análise de variância com delineamento inteiramente casualizado, em seguida foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% (Snedcor e Cochran, 1972). Utilizou-se o programa SISVAR 4.2 desenvolvido pelo Departamento de Ciências Exatas, da Universidade Federal de Lavras (UFLA), MG, Brasil. Os dados de eficiência biológica e produtividade foram transformados utilizando a fórmula $\text{raiz de } x + 0,5$ e $\text{arc sen raiz } p/100$.

Resultados e Discussão

A Figura 1 apresenta os dados médios da produção acumulada em função dos compostos à base de tifton e aveia, respectivamente, adicionados de gel de acrilamida, controle e farelo de soja.

Ambos os compostos iniciaram a produção no dia 28 após a adição da camada de cobertura, obtendo-se três fluxos de produção para o composto à base de tifton e quatro fluxos para o composto à base de aveia. Porém, se observou que o composto à base de aveia, no terceiro fluxo (90 dias de produção), já superava o composto à base de tifton com 14,5% a mais de produtividade. No terceiro fluxo de produção o composto à base de aveia apresen-

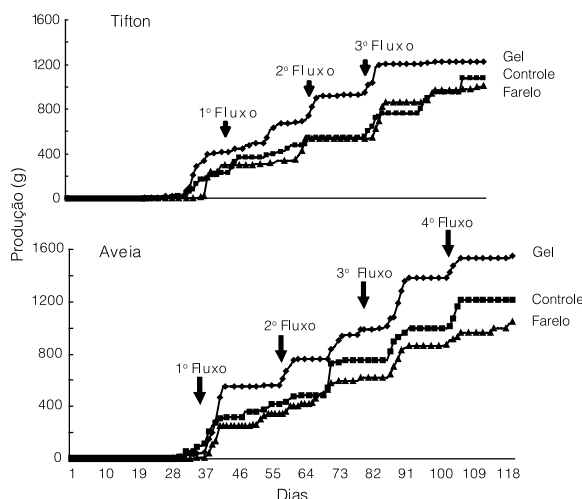


Figura 1. Produção acumulada nos compostos à base de palha de tifton e aveia, adicionados de três tipos de camada de cobertura (controle, gel de acrilamida e farelo de soja).

tava uma produção de 1017,51g (média das três camadas de cobertura), o que representa boa produtividade quando comparada a média obtida pelos produtores do estado de São Paulo, os quais apresentam tempo de produção mais longo (140 dias). Kopytowski Filho (2006) também obteve início de produção no dia 28 após a adição da camada de cobertura. Já Minihoni *et al* (2006), trabalhando com diferentes métodos de desinfestação da camada de cobertura, obteve o início da produção no dia 55. A eficiência biológica, a produção, a massa e o número de basidiomas não diferiram entre si em função dos tipos de compostos e camadas de cobertura utilizadas.

Contudo, no composto à base de aveia, independentemente do tipo de camada de cobertura utilizada, ocorreu uma tendência de eficiência biológica, produção e número de basidiomas maiores, na ordem de 14,5; 13,5 e 16,5%, respectivamente, em relação ao composto à base de tifton (Tabela IV).

Esta larga variação de resultados obtidos no cultivo de *A. blazei* é comum nas produções comerciais no Brasil, onde as instalações, na maioria das vezes rústicas são suscetíveis as variáveis ambientais (Andrade *et al.*, 2007; Kopytowski Filho, 2006; Minihoni *et al.*, 2006).

Nos compostos à base de tifton, o primeiro fluxo apresentou maior produtividade independentemente da camada de cobertura utilizada. Com a cobertura controle, gel de acrilamida e farelo de soja, as produções acumuladas ao final deste primeiro fluxo foram de 542,5g em 40 dias, 675g em 34 dias e 530,3g em 30 dias, respectivamente. O segundo e terceiro fluxos apresentaram produções menores, com os seguintes valores: testemunha (222 e 310,32g), gel de acrilamida (248,4 e 271,8g) e farelo de soja (328 e 152,5g).

TABELA IV
VALORES TOTAIS MÉDIOS DE EFICIÊNCIA BIOLÓGICA, PRODUÇÃO, MASSA E NÚMERO DE BASIDIOMAS EM DOIS COMPOSTOS (TIFTON E AVEIA) ADICIONADOS DE TRÊS CAMADAS DE COBERTURA (GEL DE ACRILAMIDA, CONTROLE E FARELO) NO CULTIVO DE *Agaricus blazei*

Camada de cobertura	Eficiência biológica (%)		Produção (kg)		Massa de basidioma (g)		Número de basidiomas					
	Compostos											
	Tifton	Aveia	Tifton	Aveia	Tifton	Aveia	Tifton	Aveia				
Gel de acrilamida	28	A a	36,25	A a	1,22	A a	14,75	A a	83	A a	100,5	A a
Controle	24,75	A a	28,25	A a	1,07	A a	15,5	A a	68	A a	82,25	A a
Farelo de soja	23,25	A a	24,5	A a	1,01	A a	17,25	A a	59	A a	68,5	A a

Médias seguidas de letras iguais, maiúscula em cada coluna e minúscula em cada linha, dentro de cada variável não diferem entre si Tukey (5%).

Andrade *et al.* (2007) trabalhando com composto à base de bagaço de cana-de-açúcar, gramínea coast-cross e camada de cobertura a base de terra + carvão + calcário calcítico, também obteve a maior produção no primeiro fluxo de colheita com 832,5g após 47 dias à adição da camada de cobertura.

Nos compostos à base de aveia, os primeiro, segundo e terceiro fluxos foram os mais longos (dependendo da camada de cobertura utilizada). Na presença da camada de cobertura controle, as produções e tempo de duração dos fluxos foram de 489,2g em 35 dias, 262,55g em 5 dias, 241,17g em 6 dias e 215,1g em 4 dias, para os quatro primeiros fluxos, respectivamente. Na presença da camada de cobertura adicionada de gel de acrilamida, os fluxos apresentaram produções de 555,8g em 15 dias, 206,58g em 6 dias; 619,97g em 21 dias e 145,9g em 4 dias, para os quatro primeiros fluxos, respectivamente. Já a camada de cobertura adicionada de farelo de soja apresentou cinco fluxos, com 252g em 6 dias, 338,4g em 24 dias, 246,35g em 6 dias, 100,7g em 5 dias e 80,35 em 6 dias, para os cinco fluxos, respectivamente.

O período de produção foi de 94 dias para todos os tratamentos (26 dias antes da produção + 94 dias de “frutificação” = 120 dias de cultivo), os quais apresentaram comportamentos distintos em termos de precocidade de produção. Esta precocidade de produção pode

ser observada na seguinte ordem Tgel >Ac >Agel >Af >Tf >Tc, na primeira metade (47 dias após o início da formação de primórdios) do período de produção e as porcentagens de produção, em relação aos tratamentos foram de 75, 61, 58, 57, 53 e 51%, respectivamente (Figura 1).

Observa-se assim que o composto à base de tifton com a camada de cobertura de gel de acrilamida apresentou precocidade elevada (75%) quando comparado com o mesmo composto coberto com a camada de cobertura controle (51%).

A tendência de maior eficiência biológica, produção e número de basidioma observada nos compostos à base de aveia, em relação aos compostos à base de tifton, não podem ser justificadas através das relações C/N iniciais destes, pois estas foram pré-estabelecidas semelhantes entre si, ou seja, 25,6 e 24,9 para o composto à base de tifton e aveia (Tabela II).

Diferenças nas propriedades químicas, físicas e biológicas destes compostos bem como tipo de nitrogênio (orgânico ou mineral) e quantidade adicionado (12,8 e 12,6), podem ser as causas dos resultados obtidos. Como fontes de nitrogênio nos compostos, adicionaram-se uréia e farelo de soja. A quantidade de uréia adicionada foi fixada em 4kg para ambos os compostos. Contudo, a quantidade de farelo de soja adicionada foi de 81kg no composto à base de tifton e de 90kg no composto

à base de aveia. Esta diferença na quantidade de farelo de soja adicionada ocorreu visando estabelecer uma similaridade entre as relações C/N iniciais dos compostos, podendo estes valores justificar a tendência de maior produção no composto à base de aveia. O farelo de soja, além do fornecimento de nitrogênio para a microbiota do composto e para o *A. blazei* propriamente dito, fornece também uma riqueza de outros elementos.

A textura e espessura do caule, a massa foliar e outras características das palhas, condicionaram o grau de decomposição destas e afetam de modo direto ou indireto as propriedades físicas, químicas e biológicas dos compostos, tal como a capacidade de retenção de água e a aeração. O período de 8 dias de pré-umedecimento das palhas pode ter sido excessivo para o tifton. Gerrits e Amsing (1991) relatam que a umidade influencia a densidade do composto e, de acordo com Straatsma (2004), quando a densidade do composto se torna elevada, o volume de poros são reduzidos.

Durante a compostagem, o composto à base de aveia apresentou quantidades elevadas de actinobactérias e odor reduzido de enxofre e amônia, podendo indicar durante o processo de compostagem, uma maior aeração e conseqüente menor teor de umidade, em relação ao composto à base de tifton, estas características podem ter contribuído para uma tendência de maior produtividade dos compostos

à base de aveia, em função de uma maior quantidade de folhas e maior rigidez do caule.

Não houve efeito do tipo de camada de cobertura sobre as variáveis analisadas (Tabela IV). Contudo, houve tendência de eficiência biológica, produção e número de basidiomas maiores em função de tipo de camada de cobertura utilizada, obedecendo à sequência gel de acrilamida >testemunha >farelo de soja.

Quanto à massa de basidiomas, a sequência foi (testemunha = farelo de soja) > gel de acrilamida. A eficiência biológica, a produção e o número de basidiomas da camada de cobertura à base de gel de acrilamida (média dos dois compostos), tenderam a serem 18 e 26%; 17 e 26% e 18 e 30,5% superiores as obtidas nas camadas de cobertura controle e farelo de soja, respectivamente. Por outro lado, a massa de basidioma na camada de cobertura controle e à base de farelo de soja tendeu a ser 15% superior à obtida com camada de cobertura de gel de acrilamida (Tabela IV).

A camada de cobertura à base de gel de acrilamida, sobreposta ao composto de tifton apresentou o maior número de basidiomas colhido no dia 89 com 10,25 basidiomas possuindo a massa de 13,86g (Figura 2), o que representa uma redução de 6% a média da massa de basidioma apresentada por esse tratamento (14,75g). Até o dia 89 a eficiência biológica alcançada foi de 27%. Já no composto à base de aveia, este valor se encontra no dia 41 onde se colheu 11,5 basidiomas com massa de 16,27g, neste caso os basidiomas apresentaram 5% a mais da massa média obtida por este tratamento (15,5g). A eficiência biológica alcançada até o dia 41 foi de 10%

A camada de cobertura adicionada de gel de acrilamida tendeu em apresentar maior eficiência biológica, produção e número de basidiomas que as demais camadas de cobertura, devido este material aumentar a capacidade

de retenção de água da camada de cobertura. Porém Kurtzman (1996), trabalhando com camada de cobertura utilizando gel de acrilamida, não encontrou resultados positivos quando este gel foi adicionado ao solo argiloso/barrento "Turface". O autor explica que uma das principais características da camada de cobertura é a porosidade e quando se adiciona o gel de acrilamida na "Turface", esta é reduzida. Assim no presente trabalho para que não ocorresse este problema a camada de cobertura foi adicionada de 25% de carvão vegetal (fragmentos de 0,5 a 2,5cm), visando o aumento da porosidade e evitando a compactação do solo devido o turno de rega diário ao longo do cultivo.

A camada de cobertura controle é largamente utilizada no Brasil devido apresentar custo reduzido. Com relação ao tipo de solo a ser utilizado, Zied (2008) ressalta que o solo deva ter os seguintes teores: areia 462,5-556,5g·kg⁻¹, silte 126,5-90,65g·kg⁻¹ e argila 411,5-352,5g·kg⁻¹, ainda com relação ao solo, o autor demonstra que valores de densidade do solo próximo a 1,0325g·cm⁻³ apresenta produtividade elevada, porém no presente trabalhos não foram realizadas análises físicas do solo.

O composto à base de tifton sobreposto com a camada de cobertura "controle" apresentou o maior número de basidiomas colhido no dia 114 com 5,25 basidiomas possuindo 23,54g de massa (Figura 3), o que representa um aumento de 16% a média da massa apresentada por esse tratamento (19,75g). Até o dia

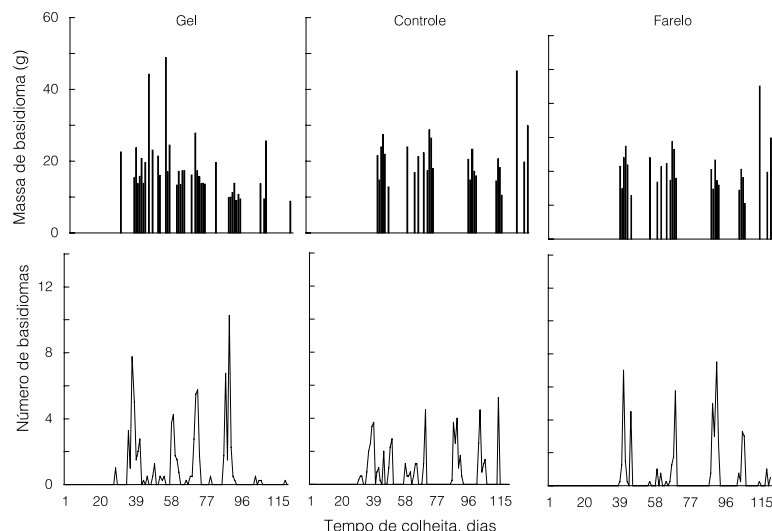


Figura 2. Número e massa de basidiomas em função de dias de colheita no composto à base de tifton utilizando as três camadas de cobertura.

114 a eficiência biológica alcançada foi de 24%. Já no composto à base de aveia, este valor foi encontrado no dia 71 com 9,25 basidiomas de massa de 18,56g, neste caso os basidiomas apresentaram 6% a mais de massa (15,5g). A eficiência biológica alcançada até o dia 71 foi de 16%.

Esta camada de cobertura quando adicionada sobre o composto à base de tifton se destacou por apresentar basidiomas com massa elevada de 75g, cerca de 25% a mais do que a camada de cobertura de gel de acrilamida neste mesmo composto (Tabela IV).

Finalmente a camada de cobertura à base de farelo de soja, sobreposta ao composto à base de tifton, apresentou maior número de basidiomas colhido no dia 91 com 7,5 basidiomas possuindo a massa de 17,4g, o que representa um aumento insignificante na média da massa apresentada por este tratamento (17,25g). Até o dia 91 a eficiência biológica alcançada foi de 18%. Já no composto à base de aveia, este valor se encontra no dia 41 com 7 basidiomas e massa de 17,36g, neste caso, os basidiomas apresentaram 6% a menos de massa. A eficiência biológica alcançada até o dia 41 foi de 6%.

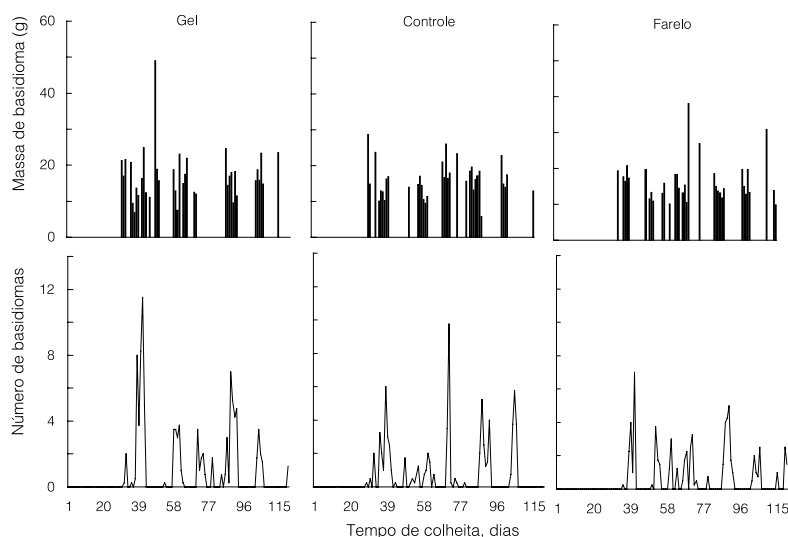


Figura 3. Número e massa de basidiomas em função de dias de colheita no composto à base de aveia utilizando as três camadas de cobertura.

Observando as Figuras 2 e 3, nota-se que as maiores massas de basidiomas são presenciadas, quando se tem o menor número de basidioma colhido ao dia.

Muitos autores citam que a camada de cobertura deve ser pobre em nutrientes (Minhoni *et al.*, 2005; Oei, 2003). Porém Han (1999) trabalhando com bactérias fotossintética (*Rhodospseudomonas palustris*), encontrou resultados positivos quando à pulverizava a camada de cobertura na diluição 3.003×10^9 UFC, em seguida o autor questiona, até que ponto a camada de cobertura deve ser pobre. O autor enfatiza ainda que a quantidade de cogumelos doentes neste trabalho se manteve semelhante à testemunha, onde não foi aplicada a solução contendo bactéria.

Outro fator importante diz respeito à eficiência biológica no composto à base de aveia, com as camadas de cobertura de gel de acrilamida e a de farelo de soja (EB= 36,25% e EB= 24,5%). Estes resultados quando aplicado estatisticamente não demonstram diferença significativa, devido o elevado coeficiente de variação (Tabela IV). Mas a nível de produção comercial este resultado torna-se de grande importância, pois se refere praticamente a 32,5% do ganho de produtividade em um cultivo (Tabela V).

Conclusão

A adição de gel de acrilamida ou farelo de soja à camada de cobertura não afetou as variáveis analisadas. Com relação ao tipo de palha adicionada na formulação do composto, como um complemento ao bagaço de cana-de-açúcar, este também não afetou a produção. Houve apenas uma tendência de melhores resultados no composto com a palha de aveia e camada de cobertura adicionada de gel de acrilamida.

REFERÊNCIAS

- Andrade MCN, Minhoni MTA, Kopytowski Filho J, Zied DC (2006) Camadas de cobertura mais utilizadas na região de Piedade/SP para o cultivo de *Agaricus blazei*. Em *Anais Simp. Int. Sobre Cogumelos no Brasil*. Embrapa. Brasília, Brasil. p. 109.
- Andrade MCN, Kopytowski Filho J, Minhoni MTA, Coutinho LN, Figueiredo MB (2007) Productivity, biological efficiency, and number of *Agaricus blazei* mushroom grown in compost in the presence of *Trichoderma* sp. and *Chaetomium olivacearum* contaminants. *Braz. J. Microbiol.* 38: 243-247.
- Carvalho WA (1983) *Levantamento de Solos da Fazenda Lageado*. Botucatu. Universidade Estadual Paulista. Botucatu, Brasil. 95 pp.
- Dhar BL (1994) Mushroom composting for *Agaricus bisporus*/bitorquis. Em Nair MC (Ed.) *Advances in Mushroom Biotechnology*. Jodhpur, India. pp. 84-90.
- Gerrits PG, Amsing JGM (1991) Water relations in indoor compost. Em Maher MJ (Ed.) *Science and Cultivation of Edible Fungi*. Vol 1. Balke-ma. Rotterdam. Holanda. pp. 181-186.
- Han J (1999) The influence of photosynthetic bacteria treatments on the crop yield, dry matter content, and protein content of the mushroom *Agaricus bisporus*. *Sci. Hort.* 82: 171-178.
- Hayes WA, Randle PE, Last FT (1969) The nature of microbial stimulus affecting sporophore formation in *Agaricus bisporus* (Lange) Sing. *Ann. Appl. Biol.* 64: 177-187.
- Kopytowski Filho J (2006) *Produtividade e Eficiência Biológica de Agaricus blazei (Murrill) Heinemann, em Diferentes Condições de Cultivo*. Tese. Universidade Estadual Paulista, Botucatu, Brasil. 134pp.
- Kopytowski Filho J, Minhoni MTA (2004) C/N ratio on yield of *Agaricus blazei* Murrill ss. Heinemann. Em Romaine CP (Ed.) *Science and Cultivation of Edible Fungi*. Penn State University. Philadelphia, EEUU. pp. 213-220.
- Kurtzman RH (1995) *Agaricus bisporus* (Large.) Imb. casing layer III: Casing from inert material. Em *Proc. Int. Scient. Cong. Cultivation Of Edible Fungi: Mushroom Science*. Vol. 1. Balkena. Rotterdam, Holanda. pp. 333-337.
- Kurtzman RH (1996) *Agaricus bisporus* (Large.) Imb. Casing Layer IV: Ion exchange and Soluble bicarbonate Ion. *Int. J. Mushr. Sci.* 1: 27-32.
- Minhoni MTA, Kopytowski Filho J, Andrade MCN (2005) *Cultivo de Agaricus blazei Murrill ss. Heinemann*. 3ª ed. FEPAF. Botucatu, Brasil. 141 pp.
- Minhoni MTA, Kopytowski Filho J, Andrade MCN, Zied DC (2006) Avaliação de diferentes métodos de desinfestação da camada de cobertura no cultivo do cogumelo *Agaricus blazei* Murrill ss. Heinemann. Em *Anais FERTBIO 2006*. Embrapa. Bonito, Brasil. pp. 1-4.
- Nair MC, Gokulapalan, CDL (1994) *Mushroom Biotechnology*. Jodhpur, India. 193 pp.
- Noble R, Dobrov-Pennington A (2005) Partial substitution of peat in mushroom casing with fine particle coal tailing. *Sci. Hort.* 104: 351-367.
- Oei P (2003) *Mushroom Cultivation*. 3ª ed. Backhuys. Leiden, Holanda. 429 pp.
- Pardo A, Juan A, Pardo E (2003) Characterization of different substrates for possible use as casing in mushroom cultivation. *Sci. Technol.* 1: 107-114.
- Snedcor GWE, Cochran WG (1972) *Statistical Methods*. 6ª ed. Iowa State University Press. Ames, IA, EEUU. 325 pp.
- Straatsma G (2004) Processing and composition of mushroom compost. Em Romaine CP (Ed.) *Science and Cultivation of Edible Fungi*. Penn State University. Philadelphia, EEUU. pp. 241-246.
- Zied DC (2008) *Camadas de Cobertura com Diferentes Combinações de Solos e Ambientes de Cultivo na Produção do Cogumelo Agaricus blazei (Murrill) ss. Heinemann*. Tese. Universidade Estadual Paulista, Brasil. 120 pp.