



VINÍCIUS REIS DE FIGUEIRÊDO

**VARIÁVEIS FÍSICO-QUÍMICAS, BIOLÓGICAS
E AMBIENTAIS PARA PRODUÇÃO DOS
COGUMELOS *Agaricus bisporus* E *Agaricus
subrufescens***

LAVRAS - MG

2013

VINÍCIUS REIS DE FIGUEIRÊDO

**VARIÁVEIS FÍSICO-QUÍMICAS, BIOLÓGICAS E AMBIENTAIS
PARA PRODUÇÃO DOS COGUMELOS *Agaricus bisporus* E *Agaricus
subrufescens***

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração em Biologia de Fungos Filamentosos, para a obtenção do título de Doutor.

Orientador

Dr. Eustáquio Souza Dias

LAVRAS - MG

2013

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Figueiredo, Vinícius Reis de.

Variáveis físico-químicas, biológicas e ambientais para produção dos cogumelos *Agaricus bisporus* e *Agaricus subrufescens* / Vinícius Reis de Figueiredo. – Lavras : UFLA, 2013.

87 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2013.

Orientador: Eustáquio Souza Dias.

Bibliografia.

1. *Agaricus*. 2. Aditivos microbianos. 3. Compostagem. 4. APPCC. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 660.62

VINÍCIUS REIS DE FIGUEIRÊDO

**VARIÁVEIS FÍSICO-QUÍMICAS, BIOLÓGICAS E AMBIENTAIS
PARA PRODUÇÃO DOS COGUMELOS *Agaricus bisporus* E *Agaricus
subrufescens***

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração em Biologia de Fungos Filamentosos, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 26 de abril de 2013.

Dr. Whasley Ferreira Duarte	UFLA
Dr. José Emilio Pardo González	UCLM
Dra. Meire Cristina Nogueira de Andrade	USC
Dr. Diego Cunha Zied	FIB

Dr. Eustáquio Souza Dias
Orientador

LAVRAS - MG

2013

À minha mãe,

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Baiano, pela concessão da licença para a realização do doutorado.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola (PPGMA), pela oportunidade concedida para realizar o doutorado.

À Universidad de Castilla-La Mancha (UCLM) e ao Centro de Investigación, Experimentación y Servicios del Champiñón (CIES), España, por permitirem a realização do doutorado sanduiche.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de estudos para o doutorado sanduíche.

Ao professor Eustáquio Souza Dias, pela orientação e conhecimentos transmitidos, os quais foram importantes para o meu aperfeiçoamento profissional.

Aos colegas do Laboratório de Cogumelos Comestíveis da UFLA, William, Emerson, Thiago, Pedro, Thales, Raul, Thales, Maiara, Manuela, Simone e Débora, e aos funcionários Paulinho e Sandra.

Aos produtores de cogumelos que permitiram acesso às suas propriedades e a realização de experimentos, em especial ao sítio dos Micélios (Cogumelos Pérola), na pessoa do Sr. Helton Cobucci.

Aos professores José Emílio Pardo González e Arturo Pardo Giménez, pela simplicidade, pela acolhida na Espanha, pelos ensinamentos e pela amizade.

Aos pesquisadores e funcionários do CIES, Paco, María Jesús, Antonio, Paqui, Miguel Angel, Roque e Gabriel.

Aos companheiros da UCLM, Manolo e Eulogio.

Ao professor Diego Cunha Zied, pelas informações técnico-científicas e por auxiliar na realização de pesquisas na Espanha.

A minha querida avó, Eló, pelos inúmeros ensinamentos da vida.

A meu irmão, Fábio pela confiança, companherismo e vibração.

À minha mãe, pelo amor incondicional, por sua força indescritível, pela inspiração, pelos sacrifícios, por acreditar nos meus objetivos e por me ensinar que a fé, a humildade e o caráter são características dos sábios.

À minha esposa, Roselin Reis, pelo amor, carinho, companherismo, cumplicidade, por compartilhar infinitos momentos de felicidade, superar as dificuldades da distância que, em muitos momentos, foram inevitáveis, pela coragem, pelo constante incentivo e por me ajudar a tornar possível a realização de meus (nossos) sonhos.

Aos amigos e familiares.

À luz divina, antes de tudo, sempre presente em minha vida, a qual fortalece minha fé e me dá forças para superar todos os desafios.

“Quando você deseja algo, todo
o universo conspira a seu favor
para que seu desejo se realize”

Paulo Coelho

RESUMO

A prática do cultivo de cogumelos vem sendo exercida, durante muitos anos, em diversos países, em função das suas propriedades nutricionais, terapêuticas, econômicas e ecológicas. A produção de cogumelos no Brasil ainda é pequena, quando comparada com a de outros países, em consequência de fatores como nível tecnológico e consumo *per capita*. O *Agaricus bisporus*, também conhecido como champignon, é o cogumelo mais produzido e consumido no mundo. Alguns fatores nas etapas de produção podem ser fundamentais para o aumento da produção. No Brasil, o cultivo de *A. subrufescens*, conhecido como cogumelo-do-sol, em escala comercial, ainda necessita do desenvolvimento de tecnologias mais adequadas, por se tratar de uma espécie com cultivo relativamente recente. A procura por informações que visem ao desenvolvimento e à melhoria de tecnologias modernas para a maximização da produção em um curto espaço de tempo, reduzindo os custos e proporcionando aumento da produção bem como a melhoria das propriedades nutricionais, medicinais e terapêuticas inerentes aos cogumelos *A. bisporus* e *A. subrufescens*. Foram estudadas variáveis físico-químicas, biológicas e ambientais que afetam o cultivo e a produtividade dos cogumelos *Agaricus bisporus* e *Agaricus subrufescens*, os quais estão descritos em três capítulos. No primeiro capítulo está apresentado o artigo “Cultivo do champignon em função da temperatura”, no qual foi avaliada a influência da temperatura na colonização do substrato de cultivo e na produtividade de linhagens de *A. bisporus*. Temperaturas de 21° e 25 °C foram testadas, durante a colonização do substrato de cultivo. A temperatura de 25 °C proporcionou maior produtividade e favoreceu ciclo de cultivo mais curto. No segundo capítulo é apresentado o artigo “The use of microbial additives during composting improves productivity of Sun Mushroom (*A. subrufescens* Peck)”, cujo objetivo foi avaliar a produtividade e a eficiência biológica (EB), em função da utilização de aditivos microbianos, durante a compostagem, visando ao cultivo do cogumelo *A. subrufescens* usando o sistema de compostagem e pasteurização a vapor. Aditivos microbianos foram adicionados, durante a compostagem, para promover maior seletividade e aumento da produção dos cogumelos. Espécies como *B. megaterium*, *B. cereus* e *S. termophilum* podem ser utilizadas como aditivos microbianos no cultivo de *A. subrufescens*, pois podem aumentar a produtividade no ciclo de cultivo de *A. subrufescens*. No terceiro capítulo apresenta-se o artigo “Application of Hazard Analysis and Critical Control Points (HACCP) to the cultivation line of mushroom and other cultivated edible fungi”, no qual foi implantado o sistema APPCC na linha de cultivo do champignon, com a finalidade de identificar as etapas com risco de contaminação e proporcionar segurança do produto final. As etapas de recepção

de material de cobertura, recepção do composto, indução da frutificação e colheita foram consideradas pontos críticos de controle. Os principais perigos encontrados foram a presença de produtos fitossanitários não autorizados ou acima da dose recomendada e a presença de bactérias patogênicas e metais pesados. Nas demais etapas, a aplicação dos planos de controle e limpeza minimiza ou elimina os pontos críticos no ciclo de cultivo.

Palavras-chave: *Agaricus bisporus*, *Agaricus subrufescens*. Aditivos microbianos. Compostagem. APPCC.

ABSTRACT

The mushroom cultivation has been practiced for several years in many countries due to its nutritional, therapeutic, economic and ecological attributes. Mushroom production in Brazil is still small compared with other countries as a result of factors such as technological level and *per capita* consumption. *Agaricus bisporus*, also known as Champignon mushroom is the most produced and consumed in the world. Some factors in the production stages can be critical to increasing production. In Brazil, the cultivation of *A. subrufescens*, known as Almond Portobelo or “Cogumelo do Sol” the commercial production still requires the development of technologies suitable, because it is a recent cultivation species. The search for information aimed at the development and improvement of modern technologies for maximizing production in a short time, reducing costs and providing increased production and the improvement of the nutritional, medicinal and therapeutic properties of the *A. bisporus* and *A. subrufescens* mushrooms. The physico-chemical, biological and environmental factors that affect growth and productivity of *A. bisporus* and *A. subrufescens* are described in the present study.. In the first chapter (“Champignon cultivation as a temperature function”), was evaluated the influence of temperature on the cultivation substrate colonization and *A. bisporus* strains productivities. Temperatures of 21° and 25° C were tested during the substrate colonization. Temperature of 25° C showed higher productivity and shorter crop cycle. In the second chapter (“The use of microbial additives during composting improves productivity of Sun Mushroom *A. subrufescens* Peck”). The aim of this study was evaluate the application of different microbial additives during composting on the *A. subrufescens* productivity and biological efficiency. Microbial additives were introduced during composting of two weeks to promote greater selectivity of the substrate cultivation. The additives (*B. megaterium*, *B. cereus* and *S. termophilum*) can be used as microbial additives in *A. subrufescens* cultivation because it can increase the productivity of the *A. subrufescens* cultivation. In the third chapter (“Application of Hazard Analysis and Critical Control Points (HACCP) to the cultivation line of mushroom and other cultivated edible fungi”), in which HACCP was implemented in line with the cultivation of mushrooms in order to identify the steps in risk of contamination and provide the security and safe food. Only the reception of covering materials and compost, the pre-fruiting and induction and the harvest have been considered as Critical Control Point. The main hazards found were the presence of unauthorized phytosanitary products or above the permitted dose, and the presence of pathogenic bacteria and/or heavy metals. The implementation of this

knowledge will allow the self-control of their productions based on the system HACCP to any plant dedicated to mushroom or other edible fungi cultivation.

Keywords: *Agaricus bisporus*. *Agaricus subrufescens*. Microbial additives. Composting. HACCP.

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE	13
1	INTRODUÇÃO	13
2	REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1	<i>Agaricus bisporus</i> (Lange) Imbach.....	16
2.2	<i>Agaricus subrufescens</i> Peck.....	17
2.3	Variáveis importantes para o crescimento dos cogumelos.....	18
2.4	Composto pós-cultivo	27
2.5	Produção de cogumelos.....	28
	REFERÊNCIAS	31
	SEGUNDA PARTE	36
	ARTIGO 1 Cultivo do cogumelo <i>Agaricus bisporus</i> em função da temperatura.....	36
	ARTIGO 2 The use of microbial additives during composting improves productivity of Sun Mushroom (<i>A. subrufescens</i> Peck) ...	51
	ARTIGO 3 Application of Hazard Analysis and Critical Control Points (HACCP) to the cultivation line of mushroom and other cultivated edible fungi	69

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

O cultivo e a exploração de cogumelos comestíveis têm tradição milenar, bem como o interesse humano por suas informações nutricionais e medicinais (CHANG; MILES, 1989). O cultivo de cogumelos é uma importante atividade econômica, uma vez que possibilita a conversão de resíduos agrícolas em alimentos. Muitos resíduos agrícolas podem ser utilizados como substrato para o cultivo de cogumelos comestíveis, entre eles folhas de bananeira, frutas e sementes de mangueira e uva, resíduos da cana-de-açúcar, palhas de arroz e trigo, entre outros (MANDEEL; AL-LAITH; MOHAMED, 2005).

Os cogumelos são apreciados na culinária, devido ao sabor, além de sua importância econômica, ecológica e medicinal. Além disso, podem ser cultivados com a finalidade de fornecer uma alternativa de fonte proteica para a dieta alimentar dos consumidores, pois algumas variedades têm elevada concentração de proteína de boa qualidade em sua composição (HENRIQUES; SIMEONE; AMAZONAS, 2008; OEI, 2003).

Por outro lado, o consumo *per capita* de cogumelos no Brasil é pequeno, quando comparado ao de países europeus. Esse fato deve-se, principalmente, a aspectos culturais de consumo e ao preço do produto (URBEN; OLIVEIRA, 1998). Dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE demonstram um crescimento, a partir de 1990, na produção de cogumelos no Brasil, com destaque para *A.bisporus*, *Lentinula edodes* e *A.brasiliensis* (DIAS et al., 2003).

As principais espécies de cogumelos mundialmente cultivadas são *A. bisporus*, *Pleurotus* sp. e *Lentinula edodes* (SÁNCHEZ, 2010). Espécies como

A. subrufescens, *P. ostreatus* e *P. pulmonarius* também são cultivadas e comercializadas.

Estudos são realizados com a finalidade de desenvolver novas tecnologias para a produção de cogumelos comestíveis e observa-se que uma das principais dificuldades é a qualidade do substrato de cultivo, tornando necessário testar diferentes substratos para diferentes espécies (ELHAMI; ANSARI, 2008). O sucesso da produção depende, na maioria das situações, da qualidade do substrato, o qual pode ser preparado sob condições estéreis, reduzindo a contaminação. Contudo, isto onera o custo de produção do substrato (SÁNCHEZ, 2010).

Diversas espécies de cogumelos são cultivadas no mundo inteiro, apresentando particularidades para a produção, a depender do local de cultivo. Muitos estudos demonstram que a produção de cogumelos é realizada utilizando-se substratos esterilizados ou pasteurizados. Contudo, esses processos são onerosos e aumentam a probabilidade de contaminação por outras espécies competidoras. Desse modo, em escala industrial e comercial, utiliza-se uma compostagem longa, seguida de uma pasteurização curta sem esterilização (VAJNA et al., 2010).

O substrato de cultivo, as condições de temperatura, de umidade, de concentração de dióxido de carbono e os materiais utilizados como camada de cobertura podem influenciar diretamente o ciclo de cultivo de cogumelos do gênero *Agaricus* e, conseqüentemente, afetar sua produtividade.

O trabalho foi realizado com o objetivo de estudar as principais variáveis físico-químicas, biológicas e ambientais que podem interferir no cultivo dos cogumelos *A. bisporus* e *A. subrufescens*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

A produção de cogumelos comestíveis é uma atividade econômica e, sobretudo, ecológica, pois possibilita a conversão de resíduos agrícolas, reduz a poluição do ar e diminui a utilização de pesticidas, uma vez que diversos resíduos de atividades agroindustriais são utilizados como substrato para cultivo de cogumelos comestíveis, entre eles folhas de bananeira, sementes, resíduos da cana-de-açúcar, palhas de arroz e trigo, entre outros (MANDEEL; AL-LAITH; MOHAMED, 2005).

Os cogumelos têm sido apreciados há muitos anos, devido às suas propriedades nutricionais e medicinais, além de aspectos econômicos e ecológicos. Seus valores nutricionais são superiores aos da maioria das hortaliças e podem ser produzidos em substratos à base de mais de 200 resíduos agrícolas, reduzindo o investimento financeiro (SÁNCHEZ, 2010).

Durante milhares de anos, os cogumelos têm sido consumidos, sendo seu sabor bastante apreciado. Eles apresentam composição química que é interessante, do ponto de vista nutricional. Em geral, os cogumelos contêm 90% de água e 10% de matéria seca. O teor de proteína da matéria seca varia entre 27% e 48%, o de carboidratos até 60% e o de lipídios, entre 2% a 8% (SANCHÉZ, 2004). O valor energético total do píleo é de 1,05 a 1,50 J/kg de cogumelo fresco.

Existem, pelo menos, 12.000 espécies de fungos que podem ser consideradas como cogumelos, com, pelo menos, 2.000 espécies comestíveis. Mais de 200 espécies já foram coletadas na natureza e utilizadas para diversos fins medicinais tradicionais, principalmente no Extremo Oriente. Cerca de 35 espécies de cogumelos foram cultivadas comercialmente e, destas, cerca de 20 são cultivadas em escala industrial. O cogumelo mais cultivado no mundo é A.

bisporus Lange (Imbach) (champignon), seguido de *L. edodes* (shiitake) e *Pleurotus* spp.

2.1 *Agaricus bisporus* (Lange) Imbach

Há relatos de que a espécie *A. bisporus*, também conhecida como champignon, tenha sido cultivada inicialmente, em torno do ano 1600, na França, especificamente em Paris. A partir daquela época, seu cultivo foi mundialmente difundido e, atualmente, a espécie tem elevada tecnologia de produção, sendo o cogumelo mais produzido e consumido no mundo. Suas linhagens apresentam rendimento elevado e exibem morfologia e textura bastante atrativas para o mercado consumidor (BRAGA et al., 1998; LARGETEAU; SAVOIE, 2010).

A. bisporus é um fungo pertencente ao grupo dos basidiomicetos, bastante cultivado em diferentes formulações de compostos pasteurizados (BONONI et al., 1999). O cogumelo tem a capacidade de secretar enzimas extracelulares, através de seu metabolismo, as quais degradam compostos para a obtenção, principalmente, de carbono e nitrogênio, essenciais para o seu desenvolvimento (DONINI et al., 2005).

Pesquisas têm sido realizadas com a finalidade de conseguir melhores rendimentos no cultivo, principalmente no que diz respeito ao preparo do composto, o qual pode ser obtido com algumas formulações, a depender da disponibilidade local. *A. bisporus* diferencia-se das demais espécies de *Agaricus*, pois produz, predominantemente, basídios com basidiósporos com dois núcleos, diferente de outros *Agaricus*, os quais produzem basidiósporos uninucleados. Os basidiósporos binucleados contêm um núcleo haplóide de cada um dos homocários parentais que são autoférteis e podem germinar formando um micélio heterocariótico (STOOP; MOOIBROEK, 1999).

2.2 *Agaricus subrufescens* Peck

Segundo Kerrigan (2004), *A. subrufescens* é um cogumelo com propriedades medicinais, nativo do Brasil. Esta espécie foi coletada na década de 1960, no município de Piedade, SP, sendo popularmente conhecido como cogumelo-do-sol, cogumelo-piedade ou cogumelo-medicinal.

Na literatura específica, é comum observar que alguns autores citam o cogumelo *A. blazei* bem como *A. brasiliensis*, entretanto, trata-se do mesmo fungo. O *A. subrufescens*, anteriormente denominado *A. blazei* Murrill sensu Heinemann, foi reclassificado como *A. brasiliensis*. Entretanto, a classificação foi contestada por Kerrigan (2004), sugerindo o nome *A. subrufescens* Peck. Por outro lado, *A. brasiliensis* e *A. subrufescens* são considerados como a mesma espécie (COLAUTO et al., 2010b). Portanto, atualmente, utiliza-se *A. subrufescens* Peck para identificar a espécie brasileira.

Apesar das discussões a respeito da nomenclatura científica, observa-se um aumento no consumo de cogumelos no mercado interno brasileiro, bem como as suas exportações internacionais. *A. subrufescens* Peck é um cogumelo nativo do Brasil, cultivado comercialmente desde 1990 e a maior parte da sua produção é destinada ao mercado japonês (ZAGHI; LINDE; COLAUTO, 2010).

A espécie é uma importante opção para os produtores de *Agaricus* sazonais, que podem produzir eficientemente no verão, devido às suas exigências maiores de temperatura, quando comparado ao champignon (*A. bisporus*). A produção no Brasil ainda é pequena, quando comparada à de outros países, entretanto, existe uma tendência de crescimento.

As técnicas de cultivo e de formulação de substrato são semelhantes às de *A. bisporus*, com algumas peculiaridades, por se tratar de um cogumelo de origem tropical, de modo que algumas práticas necessitam de adaptações,

principalmente em relação à temperatura de cultivo (ZAGHI; LINDE; COLAUTO, 2010).

O cultivo de *A. subrufescens* em escala comercial, no Brasil, é consideravelmente recente e, por isso, há uma necessidade crescente do desenvolvimento de tecnologias adequadas. Esta etapa consiste, principalmente, na adição de solo e/ou outros materiais sobre o substrato colonizado. No Brasil, materiais de cobertura local têm sido tradicionalmente utilizados.

2.3 Variáveis importantes para o crescimento dos cogumelos

O conhecimento da microbiologia é de fundamental importância para o cultivo de cogumelos comestíveis, uma vez que os mesmos são capazes de sintetizar compostos complexos, como celulose, hemicelulose e lignina, os quais são necessários para o seu desenvolvimento. Sendo assim, algumas variáveis durante o ciclo de cultivo são fundamentais para o cultivo de cogumelos comestíveis. Dentre elas, podem-se destacar: compostagem, inóculo (*spawn*), temperatura, umidade, concentração de CO₂, camada de cobertura, microrganismos presentes, colheita e pós-colheita.

Compostagem

O tipo do substrato é responsável por proporcionar um microambiente apropriado ao micélio e, posteriormente, a formação dos primórdios e a frutificação do cogumelo (GASPAR JÚNIOR et al., 2011). Geralmente, os materiais utilizados como substrato de cultivo dos cogumelos passam por um processo de compostagem, no qual são transformados em compostos solúveis, por meio da ação enzimática dos microrganismos presentes na compostagem, os quais transformam os resíduos em um material mais estável e que permitem aos cogumelos um melhor desenvolvimento. Estes compostos solúveis podem ser

transportados para o citoplasma do fungo (BRUNETTI et al., 2009; CHANG; MILLES, 2004).

No processo de compostagem, resíduos orgânicos são transformados (convertidos) em produtos estáveis, em condições aeróbias, por meio da decomposição por microrganismos. Em escala industrial e comercial, utiliza-se uma compostagem longa, seguida de uma pasteurização curta sem esterilização (VAJNA et al., 2010). A compostagem é um processo biotecnológico realizado por diferentes comunidades microbianas que atuam decompondo a matéria orgânica, transformando-a em nutrientes mais simples (BARRENA et al., 2006). Os componentes tradicionais dos compostos para cogumelos têm fontes de C e N para suprir as necessidades nutricionais da microbiota. Devido às dificuldades de disponibilidade e à variabilidade no material, formulações de compostagem com diferentes resíduos e várias fontes de N são desenvolvidas. O baixo custo, o alto teor de N e a facilidade de manuseio fazem com que os resíduos de aviário de frangos constituam a maioria da compostagens para cultivo dos cogumelos, em muitos países. No entanto, o esterco de galinha apresenta um problema com o odor exalado, principalmente devido ao enxofre (S), além de contém aminoácidos que são precursores de voláteis odoríferos (NOBLE et al., 2002).

O preparo do composto varia bastante nos países produtores de cogumelos, principalmente em relação à disponibilidade de resíduos agroindustriais. No entanto, a produção de composto envolve, basicamente, duas etapas, sendo a primeira realizada ao ar livre, na qual o material é empilhado e umedecido durante, aproximadamente, 12 a 15 dias. A matéria-prima é umedecida para assegurar que os diferentes componentes sejam misturados uniformemente e para auxiliar a atividade microbiana. No entanto, este sistema pode ser vulnerável a mudanças na temperatura ambiente, especialmente no lado externo da pilha. A segunda fase é realizada em estruturas, conhecidas como túneis de pasteurização, que são, geralmente, bem isolados, com piso ripado,

para a pasteurização do composto utilizando vapor úmido. O ambiente é controlado e nele a temperatura do composto é elevada para 57-60 °C, por até 12 horas e, posteriormente, reduzida pela entrada de ar na câmara na fase de condicionamento para 50-52 °C. Esta etapa de pasteurização é essencial para o controle de doenças e de organismos indesejáveis. Esta fase continua até que a temperatura diminua aproximadamente 30 °C (resfriamento do composto) e os níveis de amônio fiquem abaixo de 10 ppm, pois concentrações mais elevadas de amônio são tóxicas para o cogumelo.

Após alguns ciclos de cultivo dos cogumelos, o composto ainda apresenta uma variação nutricional e, desse modo, o composto pós-cultivo pode ser utilizado como uma alternativa para o fornecimento de nutrientes para espécies vegetais (CHANG; MILES, 1989, 2004; JORDAN; MULLEN; MURPHY, 2008; KULCU et al., 2008; OEI, 2003; SÁNCHEZ, 2004; SILVA et al., 2007; SIQUEIRA et al., 2011).

A população microbiana atuante no composto também é fundamental para o desenvolvimento dos cogumelos, uma vez que apresenta atividade essencial para a compostagem, fator importante para a eficácia do processo. Atualmente, existem cerca de 100 tipos de aditivos comerciais microbiológicos, utilizados para desodorização e aceleração do processo de compostagem para tratamentos de estrume animal, no Japão. No entanto, apenas um número limitado de fabricantes revela os microrganismos presentes nestes aditivos. Além disso, funções dos aditivos e características bioquímicas no processo de compostagem ainda necessitam de estudos (SASAKI et al., 2006).

Os principais fatores no controle do processo de compostagem incluem temperatura ambiente, umidade, pH, aeração e os parâmetros do material (relação C:N, granulometria, teor de nutrientes, espaço e ar livre). Esse processo é dependente das características da mistura (resíduos) e as proporções dessa mistura devem ser determinadas. Em alguns casos, grandes volumes de resíduos

produzidos podem ser compostados, mas, por causa de propriedades físicas e químicas, eles não são adequados para a compostagem, quando utilizados sozinhos (KULCU et al., 2008). Quando o teor de N é excessivo, existe uma rápida degradação do substrato (ZAGHI et al., 2010).

Os cultivos de *A. bisporus* e *A. subrufescens* adotam metodologias de compostagem semelhantes, embora técnicas específicas ainda estejam em desenvolvimento. Diferentes parâmetros, como as condições nas distintas fases do ciclo de cultivo (umidade, temperatura, concentração de dióxido de carbono e, luminosidade), os materiais, o processo de elaboração do composto e os diferentes aspectos relativos às camadas de cobertura utilizadas e à frutificação, devem ser estudados para incrementar o rendimento e adaptar o cultivo às condições específicas nos diferentes locais de produção.

Inóculo (*spawn*)

A utilização de um inóculo sadio (*spawn*), isento de contaminantes, é primordial para o início do cultivo. O *spawn*, em geral, é caracterizado por grãos de trigo ou de arroz impregnados com o micélio do fungo, obtido de uma cultura pura, o qual é utilizado para a colonização do substrato de cultivo e a posterior formação dos carpóforos (CHANG; MILLES, 2004).

Temperatura

Condições ideais de temperatura estão em torno de 25 °C, para o cultivo de *A. subrufescens*, enquanto, para *A. bisporus*, valores ideais estão entre 23-25 °C, com a necessidade de uma redução entre 7-9 °C, na temperatura, para permitir o início da frutificação. Contudo, é importante mencionar que determinadas variedades comerciais podem requerer condições específicas de cultivo.

Umidade

Elevados níveis de umidade são requeridos para o cultivo dos cogumelos, sendo necessário entre 90% e 95%. Geralmente, para a frutificação, a umidade deve ser elevada, enquanto, para a fase de desenvolvimento dos carpóforos, a umidade deverá estar entre 80% e 85%.

Concentração de CO₂

Durante o crescimento de *A. bisporus*, a concentração de CO₂ deverá estar entre 340 e 1.000 ppm, pois concentrações mais elevadas podem atrasar a frutificação e reduzir o número de cogumelos produzidos. Carpóforos de *A. subrufescens* requerem maiores trocas de ar fresco para as fases de crescimento e frutificação (CHANG; MILES, 2004). Na fase de formação dos carpóforos, os níveis de CO₂ devem ser inferiores a 1.000 ppm e, para uma máxima produção, inferiores a 500 ppm. Em geral, para o crescimento de *A. subrufescens*, os parâmetros estabelecidos são inferiores a 5.000 ppm, para o crescimento do micélio no substrato; entre 400-800 ppm, para a formação dos carpóforos, depois de adicionar a camada de cobertura e inferiores a 2.000 ppm, para o desenvolvimento dos cogumelos (LARGETEAU et al., 2011; STAMETS, 2000).

Camada de cobertura

A frutificação dos cogumelos em cultivo comercial desenvolve-se sobre a camada de cobertura, material empregado sobre o substrato de cultivo, com o objetivo de induzir a passagem da fase de crescimento vegetativo para a fase de crescimento reprodutivo do cogumelo. A adição de camadas de cobertura nos substratos tem sido tradicionalmente utilizada para o cultivo, bem como a adição

de calcário e de carvão vegetal para correção do pH e melhoria da porosidade, respectivamente. Contudo, são necessárias informações mais detalhadas sobre os tipos adequados de solos a serem utilizados como materiais de cobertura (SILVA et al., 2009).

A aplicação de uma camada de cobertura sobre o composto colonizado de micélio é uma operação imprescindível na produção comercial, para as espécies *A. bisporus* e *A. subrufescens*. No caso de *A. bisporus*, numerosos materiais são utilizados com essa finalidade, sendo diferentes tipos de turfas os mais expandidos em todo o mundo, devido, principalmente, às suas propriedades estruturais e de retenção de água (YEO; HAYES, 1979). No caso de *A. subrufescens*, os materiais utilizados têm sido condicionados, na maioria dos casos, pela disponibilidade nos países produtores. Assim, são utilizados, habitualmente, coberturas baseadas em solos minerais e diferentes tipos de turfas locais, embora se possam encontrar, entre seus componentes, outros materiais, como carvão vegetal, areia, vermiculita, casca de *Pinus* e fibra de coco, entre outros (CAVALCANTE et al., 2008; COLAUTO et al., 2010a; SILVA et al., 2007; ZIED et al., 2009).

Vários aspectos sobre camadas de cobertura são considerados relevantes, mas não há um consenso. Alguns parâmetros podem ser citados, como a espessura, a porosidade, a água e as trocas gasosas da camada de cobertura, com efeitos sobre o aparecimento, o desenvolvimento, a qualidade e a quantidade de basidiocarpos de *A. bisporus*. Materiais com níveis de compactação nas camadas dificultam o crescimento micelial, devido à baixa disponibilidade de ar, tornando o sistema anaeróbio, principalmente após a adição de água, tornando o crescimento rápido de microrganismos contaminantes (COLAUTO et al., 2010a).

Microorganismos presentes no cultivo

Os microrganismos desempenham papel importante, tanto na fase de crescimento vegetativo quanto no crescimento reprodutivo do micélio do cogumelo, principalmente bactérias, actinobactérias e fungos termofílicos. Na produção do composto, pode ocorrer a presença de altas populações benéficas de actinobactérias que auxiliam na degradação do composto, além de promover a seletividade e a proteção contra microrganismos competidores (ALTIERI et al., 2009). Na fase de condicionamento do composto, conhecida como fase II da compostagem, microrganismos termofílicos (especialmente as actinobactérias), multiplicam-se e convertem amônia livre em proteína microbiana. Estes microrganismos desempenham papel crucial na preparação de um composto adequado para os cogumelos, pois a amônia residual é altamente tóxica e impede o crescimento micelial das espécies de *Agaricus*, enquanto a proteína sintetizada é importante para a nutrição dos fungos cultivados, especialmente em compostos com bagaço de cana-de-açúcar, pois, após a pasteurização, a biomassa do composto contém altas concentrações de nutrientes orgânicos e inorgânicos que favorecem a colonização de cogumelos comestíveis. O composto com base no bagaço de cana e capim *coast-cross* apresentou diversificada população microbiana, composta, principalmente, de *Bacillus* spp, *Streptomyces* sp. e *Aspergillus fumigatus*, que são responsáveis pela degradação das fibras e pelas características físicas e químicas do composto final. Estas espécies foram mais persistentes durante a fase I da compostagem e mais termoestáveis durante a pasteurização (SILVA et al., 2009).

Testes realizados por meio da inoculação de *Scytalidium thermophilum*, no composto de cultivo de *A. bisporus*, demonstraram que foi possível reduzir o tempo de compostagem ou, até mesmo, eliminá-lo, desenvolvendo, assim, um método mais simples de cultivo, somente com a fase I. O experimento permitiu preparar o substrato com somente três dias, tempo necessário de

desenvolvimento do *Scytalidium thermophilum*, obtendo-se rendimentos próximos aos obtidos com a metodologia convencional (COELLO-CASTILLO; SÁNCHEZ; ROYSE, 2009).

O objetivo da compostagem é promover, por meio da atividade microbiana, um meio seletivo para a produção de cogumelos. Contudo, mudanças microbiológicas ocorrem durante o processo e, desse modo, pragas e doenças podem promover uma fonte de contaminação durante as etapas seguintes da compostagem.

A maioria dos insetos pragas na produção de cogumelos na Irlanda do Norte é de Sciaridae (Diptera) e Phoridae (Diptera). *Lycoriella castanescens* (Sciaridae) pode infestar, inicialmente, o composto após a fase II da compostagem, enquanto a fêmea *Megaselia halterata* (Phoridae) pode ser atraída por compostos voláteis. Adultos de Phoridae são vetores de patógenos fúngicos, como *Verticillium* sp. O controle de pragas tem sido claramente demonstrado em estudos realizados na América do Norte (JESS; MURCHIE; BIRGHAM, 2007).

O fungo *Lecanicillium fungicola* é o agente causal da doença da bolha seca, que é um dos maiores problemas na produção comercial do cogumelo *A. bisporus*, pois sua infecção pode causar sintomas que variam desde pequenas lesões necróticas nos basidiocarpos até o rompimento parcial do tecido na estipe e no píleo, causando deformidade na estipe, e massas indiferenciadas do tecido do cogumelo. Para que haja um controle eficiente de *L. fungicola*, são necessárias práticas rigorosas de higiene, bem como o uso de fungicidas, contudo, são raros os produtos químicos que podem ser utilizados no controle, uma vez que a legislação específica é bastante criteriosa. A infecção de *L. fungicola*, provavelmente, ocorre na camada de cobertura, pois se suspeita que o patógeno não consiga infectar o micélio vegetativo de *A. bisporus* no composto. A elucidação dos mecanismos por meio dos quais o patógeno exerce o efeito

patogênico também pode levar à manipulação do desenvolvimento do cogumelo, de maneira benéfica para o produtor (BERENDSEN et al., 2010).

A doença da bolha úmida, provocada pelo patógeno *Mycogone micoparasita*, causa danos em diversos fungos Agaricales, como *A. bisporus*. O micoparasita afeta a morfogênese dos basidiocarpos de *A. bisporus*, levando à deformação do tecido, sem sinais de diferenciação.

Na Espanha, a doença mais importante em cultivos de cogumelos é a bolha seca. A disponibilidade de fungicidas úteis na indústria de cogumelo é limitada não só por uma regulamentação mais rigorosa, mas também pelo fato de o patógeno e a cultura serem dois fungos. Uma revisão das substâncias ativas realizadas na União Europeia levou ao desaparecimento de praticamente todos os fungicidas utilizados anteriormente para o controle de doenças de cogumelos. Carbendazim, tiofanato-metil e tiabendazol são alguns dos fungicidas incluídos, embora nenhum seja autorizado para uso em cultivo de cogumelos (GEA, 2010).

Colheita e pós-colheita

A colheita dos cogumelos pode ser efetuada em épocas distintas, a depender da espécie cultivada. Após o desenvolvimento micelial sob a terra de cobertura, que ocorre em aproximadamente 17 a 20 dias, inicia-se a formação dos primórdios. Para o gênero *Agaricus*, como o cogumelo-do-sol e o champignon, a colheita deve ser realizada no estágio de botão, ou seja, antes de iniciar a abertura do píleo (ROYSE, 2010).

Apesar dos enormes avanços na produção, *A. bisporus* e *A. subrufescens* têm vida útil limitada, devido à senescência pós-colheita, e um grande problema para os produtores é a manutenção da qualidade pós-colheita de seus produtos, especialmente nos casos em que eles têm de ser transportados por longas distâncias, antes de chegar ao mercado. A vida útil na prateleira é bastante curta,

tornando-se um dos principais obstáculos ao desenvolvimento da indústria de cogumelos (DUAN et al., 2010).

Por se tratar de um alimento altamente perecível, os cogumelos comestíveis necessitam de métodos para a sua preservação. Um dos mais utilizados é a preservação em conservas ou em salmoura. Como os cogumelos escurecem rapidamente durante o processamento e o posterior armazenamento, eles estão sujeitos a uma forma adequada de pré-tratamento, antes de conservá-los. Os mais comuns são lavagem, imersão, desidratação, liofilização, branqueamento ou impregnação a vácuo em soluções que contenham substâncias que inibem o escurecimento dos tecidos, tais como sal, ácido cítrico, ácido ascórbico, peróxido de hidrogênio, EDTA, isoascorbato de sódio, cloridrato de cisteína e metabissulfitos (JAWORSKA et al., 2010).

2.4 Composto pós-cultivo

Apesar de ser uma alternativa econômica viável, o cultivo de cogumelos, semelhante às demais atividades agrícolas, produz resíduos, os quais estão se tornando disponíveis em quantidade cada vez maiores. Esse resíduo é conhecido como composto exaurido ou pós-cultivo, sendo gerado em todos os países produtores de cogumelos. Na Irlanda, a indústria de produção do cogumelo gera em torno de 295.000 toneladas de composto exaurido por ano, representando um grande desafio de gestão ambiental.

O composto exaurido é reconhecido como um material valioso, pois melhora a estrutura do solo, devido à sua natureza altamente orgânica, à presença de nutrientes e de microrganismos, e por proporcionar um aumento na produção de matéria seca. Aproximadamente 72% do composto exaurido na Irlanda são aplicados ao solo e, portanto, é necessária uma análise sistemática em sua composição, a fim de avaliar a sua aplicação como fertilizante, de modo

que possa ser aplicado no solo de forma racional (JORDAN; MULLEN; MURPHY, 2008).

Resultados obtidos com a utilização de substratos pós-cultivo de *A. bisporus* como camadas de cobertura mostraram a viabilidade da reintrodução em novos ciclos de cultivo, tanto como material de base único (após submeter-se a um processo de lavagem para eliminar sais solúveis) como, ainda, misturado com outros materiais de baixa condutividade elétrica, como a fibra de coco. A utilização de substratos pós-cultivo caracteriza-se por uma alternativa ao uso de terras e de outros substratos orgânicos tradicionalmente utilizados como camadas de cobertura em ciclos de cultivos de *Agaricus*, diminuindo os custos e reduzindo o impacto ambiental (PARDO; ZIED; PARDO-GONZÁLEZ, 2010).

2.5 Produção de cogumelos

No Brasil, a baixa produção de cogumelos comestíveis, aliada à ineficaz tecnologia de coleta de informações referentes à produção, não representa os valores reais de produção e, sendo assim, é bastante complexa a estimativa da produção brasileira de cogumelos. Em 2005, a China destacou-se como o principal país produtor de cogumelos comestíveis (Gráfico 1) adaptado de Sánchez (2010).

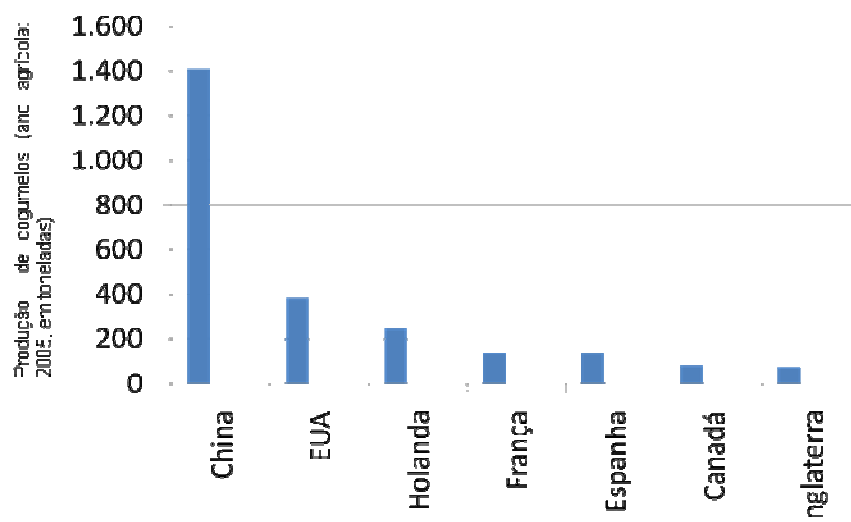


Gráfico 1 Países produtores de cogumelos comestíveis

Dados da Organização para a Alimentação e Agricultura das Nações Unidas, a respeito da produção mundial de cogumelos, demonstram que a China é o maior produtor mundial, com a produção de 1,6 milhão de toneladas, no ano de 2007, ou seja, houve um aumento na produção de, aproximadamente, 65% desde 1997. Estados Unidos, Canadá, Índia e Indonésia aparecem a seguir, com 390; 81,5; 48 e 30 milhões de toneladas produzidas, respectivamente, também em 2007. Já Brasil e Cazaquistão podem ser considerados principiantes na produção de cogumelos, pelo menos desde 1997.

A produção de cogumelos parece aumentar continuamente ao longo do tempo. Isso pode ser devido ao aumento da demanda do consumidor e ao crescimento da conscientização sobre os benefícios que traz à saúde, principalmente quanto às propriedades antioxidantes (AIDA et al., 2009). A produção do basidiocarpo tem proporcionado geração de lucro pela Europa, Estados Unidos e China, alcançando valores da ordem de US\$ 3,6 bilhões, em 1994 (STOOP; MOOIBROEK, 1999).

O consumo de cogumelos aumenta ano após ano, principalmente nos países ocidentais, em função da divulgação de seus valores nutritivos e terapêuticos, bem como pela diminuição dos preços de venda ao consumidor. O grande consumo dos cogumelos pode ser comprovado pelo crescimento na produção mundial, que superou os 40%, comparando-se os dados entre 2005 e 2010, superando o limite dos 7,3 milhões de toneladas, com destaque para os países mais produtores, que são China, Itália, Estados Unidos, Holanda, Polônia e Espanha (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO, 2012).

No Brasil, a produção de cogumelos atingiu, em 2006, 5.863 toneladas, destacando-se a região sudeste, na qual foram produzidas 5.627 toneladas, demonstrando que ela está bastante concentrada, principalmente nos estados de São Paulo e Minas Gerais (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE, 2013).

REFERÊNCIAS

AIDA, F. et al. Mushroom as a potential source of prebiotics: a review. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 20, n. 11/12, p. 567-575, Dec. 2009.

ALTIERI, R. et al. Performance of olive mill solid waste as a constituent of the substrate in commercial cultivation of *Agaricus bisporus*. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Birmingham, v. 63, n. 8, p. 993-997, Dec. 2009.

BARRENA, R. et al. Effect of inoculation dosing on the composting of source-selected organic fraction of municipal solid wastes. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, London, v. 81, n. 3, p. 420-425, Mar. 2006.

BERENDSEN, R. L. et al. *Lecanicillium fungicola*: causal agent of dry bubble disease in white-button mushroom. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 11, n. 5, p. 585-595, Sept. 2010.

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

BRAGA, G. C. et al. **Manual de Cultivo de *Agaricus blazei* Murrill “Cogumelo do Sol”**. Botucatu: FEDAP, 1998. 44 p.

BRUNETTI, G. et al. Composition and structural characteristics of humified fractions during the co-composting process of spent mushroom substrate and wheat straw. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 57, n. 22, p. 10859-10865, Nov. 2009.

CAVALCANTE, J. L. R. et al. Cultivation of *Agaricus blazei* in the environmental protection area of the Baturité region under three types of casing soils. **Acta Scientiarum - Agronomy**, Maringá, v. 30, n. 4, p. 513-517, 2008.

CHANG, S. T.; MILES, P. G. **Edible mushrooms and their cultivation**. Boca Raton: CRC, 1989. 345 p.

_____. **Mushrooms: cultivation, nutritional values, medicinal effect and environmental impact**. 2nd ed. Boca Raton: CRC, 2004. 451 p.

COELLO-CASTILLO, M. M.; SÁNCHEZ, J. E.; ROYSE, D. J. Production of *Agaricus bisporus* on substrates pre-colonized by *Scytalidium thermophilum* and supplemented at casing with protein-rich supplements. **Bioresource Technology**, Essex, v. 100, n. 19, p. 4488-4492, Oct. 2009.

COLAUTO, N. B. et al. Alternative to peat for *Agaricus brasiliensis* yield. **Bioresource Technology**, Essex, v. 101, n. 2, p. 712-716, 2010a.

_____. Production flush of *Agaricus blazei* on Brazilian casing layers. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 42, n. 2, p. 616-623, Nov. 2010b.

DIAS, E. S. et al. Cultivo do Cogumelo *Pleurotus sajor-caju* em diferentes resíduos agrícolas. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 6, p. 1363-1369, nov./dez. 2003.

DONINI, L. P. et al. Desenvolvimento in vitro de *Pleurotus* spp. sob a influência de diferentes substratos e dextrose. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 72, n. 3, p. 331-338, 2005.

DUAN, Z. F. et al. Effect of electron beam irradiation on postharvest quality and selected enzyme activities of the white button mushroom, *Agaricus bisporus*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 58, n. 17, p. 9617-9621, Sept. 2010.

ELHAMI, B.; ANSARI, N. A. Effect of substrate of spawn on médium growth of oyster mushroom species. **Journal of Biological Science**, Philadelphia, v. 2, n. 8, p. 474-477, Sept. 2008.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Preliminary 2011 data now available**. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567>>. Acesso em: 5 set. 2012.

GASPAR JÚNIOR, P. J. et al. Nutritional requirements for growth of *Agaricus brasiliensis*. **Acta Scientiarum - Biological Sciences**, Maringá, v. 33, n. 1, p. 93-97, 2011.

GEA, F. J. Efficacy and effects on yield of different fungicides for control of wet bubble disease of mushroom caused by the mycoparasite *Mycogone pemiciosa*. **Crop Protection**, Guildford, v. 29, n. 9, p. 1021-1025, Sept. 2010.

HENRIQUES, G. S.; SIMEONE, M. L. F.; AMAZONAS, M. A. L. A. Avaliação in vivo da qualidade protéica do champignon do Brasil (*Agaricus brasiliensis* Wasser et al.) In vivo protein quality evaluation of champignon do Brasil (*Agaricus brasiliensis* Wasser et al.). **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 21, n. 5, p. 535-543, set./out. 2008.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção de cogumelos**. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl.asp?c=2856&z=p&o=2&i=P>>. Acesso em: 28 jan. 2013.

JAWORSKA, G. et al. Comparison of the texture of fresh and preserved *Agaricus bisporus* and *Boletus edulis* mushrooms. **International Journal of Food Science and Technology**, Cambridge, v. 45, n. 8, p. 1659-1665, Aug. 2010.

JESS, S.; MURCHIE, A. K.; BIRGHAM, J. F. W. Potential sources of sciarid and phorid infestations and implications for centralised phases I and II mushroom compost production. **Crop Protection**, Guildford, v. 26, n. 4, p. 455-464, Apr. 2007.

JORDAN, S. N.; MULLEN, G. J.; MURPHY, M. C. Composition variability of spent mushroom compost in Ireland. **Bioresource Technology**, Essex, v. 99, n. 2, p. 411-418, Jan. 2008.

KERRIGAN, R. W. *Agaricus subrufescens*, a cultivated edible and medicinal mushroom, and its synonyms. **Mycologia**, New York, v. 97, n. 1, p. 12-24, Oct. 2004.

KULCU, R. et al. Composting of spent mushroom compost, carnation wastes, chicken and cattle manures. **Bioresource Technology**, Essex, v. 99, n. 17, p. 8259-8264, Nov. 2008.

LARGETEAU, M. L. et al. The medicinal *Agaricus* mushroom cultivated in Brazil: biology, cultivation and non-medicinal valorization. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 5, n. 92, p. 897-907, Oct. 2011.

LARGETEAU, M. L.; SAVOIE, J. M. Microbially induced diseases of *Agaricus bisporus*: biochemical mechanisms and impact on commercial mushroom production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 86, n. 1, p. 63-73, Mar. 2010.

MANDEEL, Q. A.; AL-LAITH, A. A.; MOHAMED, S. A. Cultivation of oyster mushrooms (*Pleurotus* spp.) on various lignocellulosic wastes Department of Biology, College of Science, University of Bahrain, P.O. Box 32038, Isa Town Campus, Kingdom of Bahrain. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 21, n. 4, p. 601-607, June 2005.

NOBLE, R. et al. Influence of straw types and nitrogen sources on mushroom composting emissions and compost productivity. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Washington, v. 29, n. 3, p. 99-110, Sept. 2002.

OEI, P. **Manual on mushroom cultivation: techniques species and opportunities for commercial application in developing countries**. Amsterdam: TOOL, 2003. 274 p.

PARDO, A.; ZIED, D. C.; PARDO-GONZÁLEZ, J. E. Utilización de compost agotado de champiñón como capa de coberturas en nuevos ciclos de producción. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 45, n. 10, p. 1164-1171, out. 2010.

ROYSE, D. J. Effects of fragmentation, supplementation and the addition of phase II compost to 2nd break compost on mushroom (*Agaricus bisporus*) yield. **Bioresource Technology**, Essex, v. 101, n. 1, p. 188-192, Jan. 2010.

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

_____. Modern aspects of mushroom culture technology. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 64, n. 6, p. 756-762, June 2004.

SASAKI, H. et al. Effect of a commercial microbiological additive on beef manure compost in the composting process. **Animal Science Journal**, Edinburgh, v. 77, n. 5, p. 545-548, Oct. 2006.

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

SILVA, V. A. et al. Isolamento e identificação de bactérias presentes nos solos de cobertura utilizados no cultivo do cogumelo *Agaricus blazei* Murril. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 5, p. 1374-1379, set./out. 2007.

SIQUEIRA, F. G. et al. Biological efficiency of *Agaricus brasiliensis* cultivated in compost with nitrogen concentrations. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 2, p. 157-161, jun. 2011.

STAMETS, P. Growth parameters for gourmet and medicinal mushroom species and the gilled mushroom. In: _____. **Growing gourmet and medicinal mushroom**. Berkeley: Ten Speed, 2000. p. 201-216.

STOOP, J. M. H.; MOOIBROEK, H. Advances in genetic analysis and biotechnology of the cultivated button mushroom, *Agaricus bisporus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 52, n. 4, p. 474-483, Oct. 1999.

URBEN, A. F.; OLIVEIRA, C. Cogumelos comestíveis: utilização e fontes energéticas. In: REVISÃO ANUAL DE PATOLOGIA DE PLANTAS, 6., 1998, Passo Fundo. **Anais...** Passo Fundo: UPF, 1998. p. 173-196.

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

YEO, S. G.; HAYES, W. A. A new medium for casing mushroom beds. **Mushroom Science**, Washington, v. 10, n. 2, p. 217-229, 1979.

ZAGHI, L. L.; LINDE, G. A.; COLAUTO, N. B. Carbon-to-nitrogen ratios for *Agaricus brasiliensis* on the axenic method. **Acta Scientiarum - Agronomy**, Maringá, v. 32, n. 1, p. 55-60, Jan./Mar. 2010.

ZIED, D. C. et al. Produção de *Agaricus blazei* ss. Heinemann (*A. brasiliensis*) em função de diferentes camadas de cobertura e substratos de cultivo. **Interciencia**, Catanduva, v. 34, n. 6, p. 437-442, 2009.

SEGUNDA PARTE

ARTIGO 1

Cultivo do cogumelo *Agaricus bisporus* em função da temperatura

Artigo redigido conforme norma da Revista Ciência Rural

Vinícius Reis de Figueirêdo, Eustáquio Souza Dias

Resumo

O cogumelo *A. bisporus* é um cogumelo que requer baixa temperatura para a indução da frutificação. Essa exigência limita o seu cultivo no Brasil em meses mais frios do ano ou exige a utilização de ambiente controlado, onerando muito a produção. Este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar a produtividade de diferentes linhagens em função da temperatura de cultivo após a indução da frutificação. Diferentes linhagens de *A. bisporus* foram avaliadas quanto ao efeito da temperatura sobre a colonização do composto e a produtividade do cogumelo. As temperaturas de 21 °C e 25 °C foram utilizadas durante a colonização do composto e, após a indução da frutificação, durante o ciclo de cultivo. Para todas as linhagens testadas, a temperatura de 25° C proporcionou maior velocidade de colonização do composto, favorecendo ciclos de cultivo mais curtos. Após a indução da frutificação a 18 °C, a manutenção do ambiente de cultivo a 25 °C proporcionou maior produtividade, quando comparada ao cultivo a 21 °C. Observando a linhagem mais produtiva (ABI-7), os três primeiros fluxos foram responsáveis por mais de 50% da produção total. Em um cultivo comercial, no qual é necessário manter volumes constantes de produção, os ciclos de cultivo poderiam ser limitados a três fluxos de produção, reduzindo os custos.

Palavras-chave: champignon, crescimento micelial, fluxos de produção

***Agaricus bisporus* cultivation in function of temperature**

Abstract

The *Agaricus bisporus* is a button mushroom that requires low temperature to induce fruiting. This requirement limits our cultivation in Brazil during the coldest months of the year and requires the use of controlled environment. This study aimed to assess the productivity of different strains depending on the growth temperature after induction of fruiting. *A. bisporus* strains were evaluated for the effect of temperature on the colonization of compost and mushroom productivity. Temperatures of 21 and 25°C were used for the substrate colonization and after induction of fruiting crop cycle. All strains tested, temperature 25°C gave a quickly colonization of the compound, favoring shorter production cycles. After induction of fruiting at 18°C, maintaining the culture environment at 25°C gave a higher productivity to contrast with culture at 21°C. The most productive strain (ABI-7), the first three streams were responsible for over 50% of total production. For a cash crop where it is necessary to maintain constant volumes of production, crop cycles could be limited to three productions flows, reducing the production flow.

Key-words: button mushroom, micelial growth, production flow

INTRODUÇÃO

O *A. bisporus* (Lange) Imbach, também conhecido como “champignon”, lidera o ranking mundial de produção e de consumo de cogumelos, com elevados índices de produtividade (Sánchez, 2010). Segundo Choudhary (2011), o cultivo de *A. bisporus* contribui com 31,8% da produção mundial de cogumelos.

No Brasil, a produção ainda necessita de mais pesquisas para se expandir (Dias, 2010). O sucesso para a produção necessita aliar conhecimento científico com a experiência prática (Choudhary, 2011).

A capacidade do fungo de crescer e produzir cogumelos em substratos lignocelulósicos está relacionada com o vigor do micélio e com a capacidade de ativar mecanismos fisiológicos, os quais secretam enzimas extracelulares (Mata et al., 2001). Após a colonização do substrato, o fungo precisa de um fator de estresse para frutificar, como ocorre com os cogumelos de modo geral. Para o “champignon”, um dos principais fatores para indução da frutificação é a redução da temperatura, para imitar as condições naturais, uma vez que, na natureza, em países de clima temperado, a frutificação dos cogumelos normalmente ocorre quando se inicia a primavera, após um longo período de frio.

Foi estabelecida temperatura entre 17 °C e 19 °C para a indução da frutificação do champignon (Dias et al., 2004), a qual é mantida durante todo o ciclo de produção. A manutenção da temperatura abaixo de 20 °C não é necessária para o desenvolvimento dos cogumelos, entretanto, permite determinado controle sobre o desenvolvimento de pragas e doenças. Nos países desenvolvidos, o ambiente de cultivo é possível com a utilização de uma infraestrutura de custo bastante elevado. Nesses países, o elevado custo de produção é compensado por uma produção contínua e elevada do cogumelo, sendo, por isso, considerada uma atividade industrial.

Entretanto, essas instalações são inviáveis, principalmente para as condições do pequeno produtor no Brasil. Estruturas de cultivo são, geralmente, bastante rústicas, contando com condições ambientais mais favoráveis, tais como elevada umidade relativa do ar e temperaturas amenas nas regiões de cultivo. Implica dizer que o cultivo de champignon no Brasil tem se limitado a áreas de clima ameno na região sudeste (São Paulo), de preferência, próximas a áreas de preservação ambiental, com matas nativas ou reflorestadas.

Apesar de essas condições favorecerem um baixo custo de produção, o produtor tem pouquíssimo controle sobre o seu ambiente de cultivo. Como exemplo, podem-se citar produtores que, durante o período de colonização do composto, têm dificuldades de elevar a temperatura ambiente para favorecer uma colonização mais rápida. Como consequência, o tempo de colonização demora muito mais do que seria necessário, caso ele possa elevar a temperatura do ambiente.

É importante que o pequeno produtor brasileiro utilize um pouco de tecnologia para a sua atividade, sem elevar sobremaneira o seu custo de produção. Neste aspecto, o investimento numa infraestrutura simples que permita o acúmulo do calor (instalações de isolantes térmicos) e a redução da temperatura, quando necessário, poderia permitir ao produtor um melhor controle da sua atividade.

Neste contexto, o estudo das linhagens de *A. bisporus* mais adaptadas a essas condições, bem como a resposta das mesmas às variações de temperatura, é importante para dar ao pequeno produtor o suporte tecnológico necessário para melhorar a sua produção. Este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar a influência da temperatura na velocidade de colonização do substrato de cultivo e na produtividade de diferentes linhagens de *A. bisporus*.

MATERIAL E MÉTODOS

Linhagens, meio de cultivo e produção do inoculante

Foram utilizadas cinco linhagens de *A. bisporus*, denominadas ABI-2, ABI-3, ABI-5, ABI-6 e ABI-7, disponíveis na Micoteca do Laboratório de Cogumelos Comestíveis da Universidade Federal de Lavras. As linhagens foram reativadas em meio ágar arroz/extrato de levedura (AAE). Para o preparo do meio, utilizou-se 1 kg de arroz sem casca, o qual foi cozido durante 15 minutos em água fervente. A seguir, 1 L do caldo foi utilizado, ao qual adicionaram-se 15 g de ágar e 15 g de extrato de levedura. O meio foi autoclavado a 121 °C/30 minutos. Após o resfriamento, o meio foi vertido em placas de Petri (10 mL placa⁻¹). Em seguida, as linhagens foram inoculadas nas placas e incubadas, a 25±1 °C/14 dias, para a obtenção do inóculo inicial. Após o período de incubação, o inóculo primário foi incubado em frascos de vidro com capacidade de 500 mL, contendo grãos de trigo adicionado de 3% de carbonato de cálcio e incubado, a 25 ±1 °C /30 dias, obtendo-se o *spawn*.

Em teste preliminar, avaliou-se o crescimento micelial de *A. bisporus* em meio de cultura, sob diferentes temperaturas de incubação.

Substrato de cultivo e camada de cobertura

O composto foi preparado conforme procedimentos padrões para a espécie e acondicionado em sacos de polipropileno com capacidade de 15 kg (Tabela 1). Após o acondicionamento, o composto foi inoculado na parte superior e incubado em dois ambientes, às temperaturas de 25±1 °C e 21±1 °C. O crescimento micelial foi avaliado a cada 48 horas, até a colonização completa do substrato de cultivo.

Tabela 1 Formulação do substrato de cultivo de *A. bisporus*
 Table 1 *Formula of the button mushroom compost cultivation*

Substrato	Massa (kg)
Bagaço de cana	1.599,00
Cama de frango	130,00
Esterco de cavalo	139,00
Palha de arroz	200,00
Farelo de soja	45,00
Ureia	2,50
Cloreto de potássio	2,50
Superfosfato simples	2,50
Gesso agrícola	32,00
TOTAL	2.152,50

Na fase de indução da frutificação dos basidiocarpos, foi utilizada uma camada de cobertura contendo Gleissolo húmico, Latossolo vermelho distroférico e calcário calcítico (v:v), a qual foi adicionada após 14 dias, quando o micélio já tinha colonizado totalmente o substrato de cultivo. Sete dias após a adição da camada de cobertura, os tratamentos foram incubados a 18 ± 1 °C, durante 10 semanas. Para o cultivo, foram analisados dez fluxos de produção, os quais se dividiram em dez semanas ininterruptas.

Eficiência biológica e produtividade

As avaliações da eficiência biológica e produtividade foram obtidas em percentagem por meio das fórmulas:

Eficiência biológica = (massa dos cogumelos frescos/massa do composto desidratado) x 100

Produtividade = (massa dos cogumelos frescos/massa do composto úmido) x 100

Delineamento experimental

Utilizou-se o programa SISVAR, com delineamento em blocos casualizados, em esquema fatorial 5 x 2, em que os tratamentos corresponderam às variações das cinco linhagens com as duas temperaturas testadas, totalizando dez tratamentos. Para cada tratamento, foram utilizadas seis repetições. Um total de 60 sacos (15 kg) foi utilizado, representando os diferentes tratamentos. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott (5%) (Andrade et al., 2010).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi verificado, em teste preliminar, que o melhor crescimento micelial em placas de Petri foi obtido em temperaturas superiores a 23 °C (Tabela 2). Esses resultados já indicavam que, apesar de o *A. bisporus* requerer temperatura abaixo de 20 °C para a frutificação, o seu crescimento vegetativo é favorecido por temperaturas acima dos 20 °C.

Tabela 2 Crescimento micelial de *A. bisporus* em função de diferentes temperaturas em placas de Petri.

Table 2 Mycelial growth of *A. bisporus* in function of different temperatures in Petri dishes

Temperatura (°C)	Crescimento micelial (mm/dia)**
17	1,77 d
20	1,97 c
TA* (21,5)	2,23 b
23	2,38 a
28	2,43 a

Médias seguidas de letras distintas na coluna são diferentes entre si, pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$)

*TA: temperatura ambiente; **média de crescimento das linhagens testadas

Posteriormente, foi avaliado o crescimento micelial de diferentes linhagens do fungo no substrato de cultivo, em duas temperaturas (21 e 25 °C). Novamente, observou-se que o crescimento micelial foi superior em temperatura mais elevada (25 °C), para todas as linhagens testadas. Para as linhagens de crescimento mais lento, o aumento na velocidade de crescimento micelial variou de 66,3% a 80%, enquanto, para a linhagem de maior velocidade de colonização (ABI-7), o ganho na velocidade de crescimento micelial foi de 62%. Esses resultados mostram que, se o produtor utilizar uma linhagem adequada e puder controlar a temperatura do seu ambiente de cultivo, o composto de cultivo do cogumelo será colonizado em período menor de tempo, permitindo maior número de ciclos de cultivo ao longo do período. A 25 °C, a colonização completa do composto ocorreu em 13 dias, enquanto, a 21 °C, a colonização completou-se em 24 dias, ou seja, 11 dias a mais, para a linhagem com maior velocidade de colonização (ABI-7). Além da colonização do substrato de cultivo mais acelerada, observou-se, ainda, uma maior precocidade na colheita em função da colonização mais rápida da camada de cobertura para as linhagens que foram submetidas à temperatura de 25 °C, na fase de colonização do substrato, o que demonstra a importância do controle da temperatura na fase de crescimento vegetativo do fungo, proporcionando o lançamento de primórdios precocemente e, assim, reduzindo o ciclo de produção (Tabela 3).

Tabela 3 Velocidade de crescimento micelial em placa de Petri (CM), crescimento no substrato de cultivo (CSC), colonização da camada de cobertura (CCC), e precocidade (PRE), quando o cogumelo *A. bisporus* foi cultivado em diferentes temperaturas

Table 3 Micelial growth speed in Petri dishes, Spawn-run compost, Spawn-run casing layer and earliness of *A. bisporus* at different temperatures

Linhagens	CM (cm)		CSC*		(CCC)**		PRE*	
	21±1°C	25±1°C	21°C	25°C	21°C	25°C	21°C	25°C
ABI-2	0,400Cb	0,720Da	31 Da	20 Db	20 Ca	18 Cb	51 Da	38 Db
ABI-3	0,415Cb	0,710Da	30 Ca	19 Cb	20 Ca	18 Cb	50 Ca	37 Cb
ABI-5	0,445Cb	0,760Ca	30 Ca	19 Cb	20 Ca	18 Cb	50 Ca	37 Cb
ABI-6	0,490Bb	0,815Ba	28 Ba	17 Bb	18 Ba	17 Bb	46 Ba	34 Bb
ABI-7	0,950Ab	1,540Aa	24 Aa	13 Ab	17 Aa	16 Ab	41 Aa	29 Ab

Médias seguidas de letras maiúsculas distintas nas colunas são diferentes entre si, pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$)

Médias seguidas de letras minúsculas distintas nas linhas, para cada parâmetro analisado (CM, CSC, CCC e, PRE), são diferentes entre si, pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$)

*tempo, em dias, desde a inoculação; **tempo, em dias, desde a adição da camada de cobertura

De acordo com Pardo-Gimenéz et al. (2010), há indícios de que, para a maioria das linhagens de *A. bisporus*, o melhor crescimento vegetativo ocorre quando a temperatura do ar é mantida em torno de 24 °C. Segundo os mesmos autores, para a indução da frutificação, a temperatura deve ser reduzida para 18 °C. Largeteau et al (2011) utilizaram isolados selvagens de *A. bisporus*, os quais têm potencial para a frutificação, mesmo a 25 °C. Isto permitiria manter as câmaras de cultivo com a temperatura estável a 25 °C, durante todo o ciclo de produção, entretanto, esses isolados não são tão produtivos quanto as linhagens comerciais atualmente utilizadas. Para as condições brasileiras, talvez o ideal fosse utilizar duas temperaturas, sendo uma para a indução da frutificação (18 °C) e outra para o crescimento dos cogumelos, durante o restante do ciclo de cultivo (25 °C).

As mesmas temperaturas utilizadas para avaliar a colonização do composto pelas linhagens de *A. bisporus* foram também utilizadas para a produção dos cogumelos, após induzir a frutificação a 18 °C. O composto que foi mantido a 25 °C lançou primórdios com 29 dias após a inoculação, enquanto o composto cultivado a 21 °C apresentou os primeiros primórdios após 41 dias da inoculação, considerando a linhagem com maior velocidade de colonização (ABI-7). É possível afirmar que os primórdios dos cogumelos são mais tardios quando o substrato é mantido à temperatura de 21 °C, na fase de colonização do substrato de cultivo.

Da mesma forma observada para a velocidade de colonização do composto de cultivo, a temperatura de 25 °C também favoreceu maior produtividade e eficiência biológica, para todas as linhagens testadas, com ganhos de produtividade que variaram de 7,7% a 51,4% (ABI-2 e ABI-6, respectivamente) (Tabela 4). A linhagem ABI-7, que apresentou maior velocidade de colonização do composto, apresentou também os melhores resultados de produtividade e EB, nas duas temperaturas testadas, com 14,7% e 17,8%, respectivamente. Para esta linhagem, o ganho de produtividade, na temperatura de 25 °C, foi de 20,7%.

Tabela 4 Valores de produtividade e eficiência biológica de diferentes linhagens de *A. bisporus* incubado em diferentes temperaturas

Table 4 Productivity values and biological efficiency of some A. bisporus strains incubated at different temperatures

Linhagens	Produtividade		Eficiência biológica	
	(21±1 °C)	(25±1 °C)	(21±1 °C)	(25±1 °C)
ABI-2	7,80 Cb	8,40 Ca	24,68 Cb	26,58 Ca
ABI-3	5,55 Db	7,08 Da	17,55 Db	22,42 Da
ABI-5	8,15 Bb	10,78 Ba	25,78 Bb	34,11 Ba
ABI-6	1,83 Eb	2,77 Ea	5,80 Eb	8,76 Ea
ABI-7	14,74 Ab	17,80 Aa	46,65 Ab	56,32 Aa

Médias seguidas de letras maiúsculas distintas nas colunas são diferentes entre si, pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$)

Médias seguidas de letras minúsculas distintas nas linhas, para cada parâmetro analisado (produtividade e eficiência biológica), são diferentes entre si, pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$)

A linhagem ABI-6 apresentou o segundo melhor desempenho na colonização do composto de cultivo, entretanto, a produtividade alcançada foi a menor dentre todas as linhagens, tanto a 21 °C como a 25 °C. Esses resultados permitem inferir que nem sempre uma linhagem agressiva na colonização do composto de cultivo apresentará também o melhor desempenho na produtividade. Coincidentemente, a linhagem com o melhor desempenho de colonização apresentou também a melhor produtividade (linhagem ABI-7). Entretanto, os resultados demonstraram que não há correlação direta entre os dois parâmetros avaliados.

Apesar dos melhores resultados obtidos com a temperatura de 25 °C, isso não significa que temperaturas mais elevadas sejam também favoráveis à produção de cogumelos. Esta inferência poderia ser feita, uma vez que o aumento da temperatura proporciona aumento da atividade enzimática, a qual, por sua vez, auxilia na degradação dos compostos presentes no substrato. Temperaturas muito extremas podem comprometer o desenvolvimento do

micélio por meio da inativação de enzimas e ainda podem provocar deformações no cogumelo (Mata et al., 2001).

Considerando que os melhores resultados foram obtidos com a temperatura de 25 °C, esses dados foram utilizados para se fazer o cálculo de produção por fluxo durante o ciclo de cultivo. Foram analisados 10 fluxos de produção para todas as linhagens, as quais atingiram mais de 50% de produção ainda no terceiro fluxo (Figura 1). Em cultivos no Canadá e na Europa, com três fluxos de produção, os dois primeiros fluxos de produção foram responsáveis por cerca de 70% a 80% do total de cogumelos colhidos. Condições mais rústicas utilizadas no Brasil ainda não permitem ciclos de cultivo tão curtos. Provavelmente, a utilização de turfa de alta qualidade e o controle rigoroso do ambiente de cultivo favorecem uma resposta tão rápida do cogumelo, permitindo o cultivo em escala industrial.

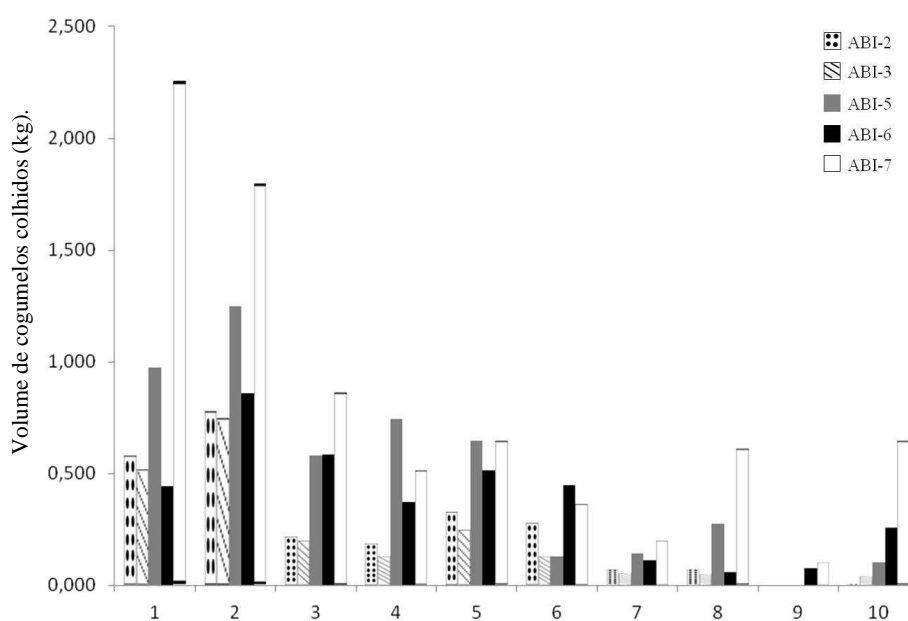


Gráfico 1 Produção das linhagens de *A. bisporus* nos diferentes fluxos

A linhagem ABI-7 alcançou 61,49% da produção total nos três fluxos iniciais. Esta linhagem, portanto, além dos melhores resultados de colonização e produtividade, apresenta também maior potencial para utilização em ciclos mais curtos de produção, os quais são muito importantes para manter o escalonamento da produção para manter a demanda do mercado e para prevenir a incidência de pragas e doenças (Peñaranda et al., 2009). A utilização de ciclos com três fluxos de produção poderá ser muito importante, não apenas para manter as metas de produção, como também para permitir a redução ou a eliminação do uso de pesticidas, os quais são comuns nos cultivos longos, como os observados no Brasil. Por isso, a linhagem ABI-7 será utilizada em estudos futuros, visando o desenvolvimento de novas técnicas de manejo que permitam picos maiores de produção nos três primeiros fluxos. Estudos futuros deverão ser conduzidos, com o objetivo de se alcançar os níveis de produção desejados nos três fluxos iniciais.

CONCLUSÕES

A temperatura de 25 °C proporcionou maior velocidade de colonização e maior produtividade do cogumelo *A. bisporus*.

Dentre as linhagens testadas, a ABI-7 é a mais produtiva, sendo, portanto, selecionada para os experimentos futuros.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras, à Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES processo 5083/11-7) e ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Baiano, pela infraestrutura concedida e pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Andrade, M.C.N.; Chavari, J.L.; Minhoni, M.T.A.; Zied, D.C. Crescimento micelial in vitro de cinco linhagens de *A. bisporus* submetidas a diferentes condições de temperatura. *Acta Scientiarum Agronomy*, v.32, n.1, p.69-72, 2010. <<http://www.scielo.br/pdf/asagr/v32n1/v32n1a10.pdf>> 28 Nov 2011

doi: 10.4025/actasciagron.v32i1.333

Choudhary, D.K. First preliminary report on isolation and characterization of novel *Acinetobacter* spp. in casing soil used for cultivation of button mushroom, *Agaricus bisporus* (Lange) Imbach. *International Journal of Microbiology*, v.2011, p.6, 2011. <<http://www.hindawi.com/journals/ijmb/2011/790285/cta/>> 14 Set 2011. doi: 10.1155/2011/790285

Dias, E.S.; Abe, C.; Schwan R.F. Truths and myths about the mushroom *Agaricus blazei*. *Scientia Agricola*, v.61, p.545-549, 2004. http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-90162004000500014&lng=en&nrm=iso. 29 Nov. 2012. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-90162004000500014>.

Dias, E. S. Mushroom cultivation in Brazil: Challenges and potential for growth. *Ciência e Agrotecnologia* [s.i.], v.34, n.4, p.795-803, 2010. <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-70542010000400001&lng=en&nrm=iso>. 29 Nov. 2012. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542010000400001>.

Largeteau, M.L.; Callac, P.; Navarro-Rodriguez, A.M.; Savoie, J.M. Diversity in the ability of *Agaricus bisporus* wild isolates to fruit at high temperature (25°C).

Fungal Biology, v.115, Issue 11, p.1186-1195, 2011. <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1878614611001565>> 04 Feb 2012. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.funbio.2011.08.004>

Mata, G.; Delpech, P.; Savoie, J.M. Selection of strains of *Lentinula edodes* and *Lentinula boryana* adapted for efficient mycelial growth on wheat straw. Revista Iberoamericana de Micología, v.18, n.1, p.118-122, 2001. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15487920>> 11 Jan 2012

Pardo, A.; Zied, D.C.; Pardo, J.E. Utilización de compost agotado de champiñón como capa de coberturas en nuevos ciclos de producción. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v.45, p.1164-1171, 2010. <<http://www.scielo.br/pdf/pab/v45n10/16.pdf>> 13 Abr 2012.

Peñaranda, J.A.P.; Pardo, J.E.; Pardo, A. Guía de implantación del sistema de análisis de peligros y puntos de control crítico (APPCC) en la producción, transformación y comercialización del champiñón y otros hongos comestibles cultivados. 1st ed. Cuenca: Patronato de Desarrollo Provincial, 2009. 522p.

Sánchez, C. Cultivation of *Pleurotus ostreatus* and other edible mushrooms. Applied Microbiology and Biotechnology [S.I.], v.85, n.5, p.1321-1337, 2010. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19956947>> 22 Mai 2012.

Wang, Z.S.; Chen, L.F.; Chen, M.Y. Thermotolerance – related genes in *Agaricus bisporus*. Mushroom Science. v.16. p.133–137, 2004. <http://www.pubhort.org/isms/16/1/v16_p1_a17.htm> 08 Jul 2012.

ARTIGO 2**The use of microbial additives during composting improves productivity of Sun Mushroom (*A. subrufescens* Peck)**

Artigo submetido conforme normas da Revista African Journal of
Biotechnology

Vinícius Reis de Figueirêdo¹; Emerson Tokuda Martos²; Félix Gonçalves de Siqueira³; William Pereira Maciel²; Romildo da Silva²; Danny Lee Rinker⁴; Eustáquio Souza Dias^{*2}

Abstract

The aim of this research was to evaluate the application of different microbial additives during composting, on some parameters of the production of *A. subrufescens*. Compost was prepared over two weeks with ammonia assimilating bacterial and a thermophilic fungus as microbiological additives. In this work were used microbial additives (*B. megaterium*, *B. cereus* and *S. termophilum*), isolated directly from a composting process, which were also introduced during composting of two weeks to promote greater selectivity of the substrate cultivation and provide increased productivity of mushrooms. The data showed that the microbial additives used in composting were significantly higher with respect to productivity, when compared to treatments without additives. The species used can be used as microbial additives in *A. subrufescens* cultivation.

Keywords: *Agaricus subrufescens*; microbial additives; productivity; composting; Mushroom Sun.

¹Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Baiano – IF BAIANO, Km 2,5 da BR 420, Rod. Santa Inês - Ubaíra, Zona Rural – Santa Inês/BA, Brazil. CEP. 45320-000. vinicius.figueiredo@si.ifbaiano.edu.br.

²Department of Biology; Universidade Federal de Lavras – UFLA, Caixa Postal, 3037, CEP. 37200-000, Lavras/MG, Brazil. Phone: +55 35 3829-1613. *corresponding author.

³Laboratory of Industrial Microbiology & Enzymology, Department of Biotechnology, Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista/BA, Brazil.

⁴University of Guelph - Vineland Campus, 4890 Victoria Avenue North, P.O. Box 7000, Vineland Station, Ontario, Canada L0R 2E0.

1. Introduction

The conventional composting process for *A. subrufescens* mushroom cultivation is derived from the process used for cultivation of *A. bisporus*, according to the method developed by Sinden and Hauser (1950). This method constitutes two stages, the first called “*outdoor*”, in which the raw materials are pre-moistened and mounted in piles or stacks, that are turned over a few times, for approximately two weeks. In the second stage, “*indoor*”, the composting material passes through pasteurization for approximately 6 hours at around 60°C. Soon afterwards, the compost remains under forced ventilation, reaching 45°C. That process is called physical-chemical-biological conditioning, and occurs for 14 days on average (Straatsma et al., 2000; Eira, 2003; Oei, 2003). In Phase II of the composting (pasteurization and conditioning) the elimination of ammonia occurs, promoting higher substrate selectivity through the elimination of microorganisms that could compete with *Agaricus*, besides eliminating pests and diseases (Eira 2003; Oei, 2003; Chang and Miles, 2004; Salar and Aneja, 2007).

In spite of using the same strategy for the compost production, it deals with two different species (*A. subrufescens* and *A. bisporus*), which obviously present different requirements regarding the compost quality, covering layer, temperature, etc (Dias, 2010).

Siqueira et al. (2011), reported that the nitrogen concentration at the beginning of the composting can also influence the productivity, because the high initial ammonia concentration, at the end of Phase I, is favorable for the thermophilic microorganism nutrition, which aid in the degradation of the substrate. But, on the other hand, at the end of Phase II, it is desirable that the ammonia content is reduced, because the ammonia is toxic to the micelial growth of mushrooms of the *Agaricus* genus. In this context, the evidence points

to different behaviors between the two species for the initial C/N ratio (Matute et al., 2011; Dias, 2010).

In the composting process, the microbial activity that occurs during pasteurization is capable of producing heat, which is essential to eliminate pests, pathogens and competitor microorganisms. Soon afterwards, in the compost conditioning phase, thermophilic microorganisms convert the free ammonia into microbial protein. In this manner, the performance of those microorganisms play a crucial role in the preparation of the compost, making it more appropriate for the micelial growth, in function of a better balance of nutrient availability (Chang and Miles, 2004; Bechara, 2007).

Silva et al. (2009) observed a higher thermophilic fungus density at the end of the composting process, even after the pasteurization, evidencing their thermo-resistant potential. Such fungi colonize the substrate and degrade the lignocellulose, reducing the amount of fiber and, consequently, increasing the bioavailability of the substrate for the production of the mushroom.

Among the different species of thermophilic fungi found in the cultivation compost of the *A. bisporus* mushroom, the fungus *Scytalidium thermophilum* is reported as being the dominant species during Phase II of the composting (Straatsma et al., 1994), although alterations occur in the population dynamics during the process (Vajna et al., 2010).

Besides the thermophilic fungi, prokaryotes are present and probably play an important role during composting. The actinobacteria stand out for producing a white-grayish mass throughout the compost, at the end of Phase II, evidencing its colonization on the compost. However, the thermophilic bacteria are also present in the process in high numbers (Silva et al., 2009). In agreement with Ahlawat and Vijay (2010), *Staphylococcus* and *Bacillus* species can be used as microbial inoculants in the composting process seeking the cultivation of *A. bisporus*. According to the authors, the use of those bacteria in the compost

production provided an earlier harvest and a productivity increase. According to the same authors, the extracellular enzymes produced by the bacteria can convert agroindustrial residues into a compost more selective and appropriate for the mushroom development.

Phase II of the composting requests a tunnel in which the temperature is properly controlled for the pasteurization and conditioning stages of the compost. Considering the investment and cost of the process, the small producers pay a high price to purchase the compost and this makes the activity practically unviable for small producers in countries such as Brazil. An alternative could be the production of the compost by the small producers, using a simpler, less expensive process which is the long composting, followed by steam pasteurization. However, that strategy has a great disadvantage of low compost quality obtained without Phase II.

Based on the above, the objectives of this work were to evaluate the productivity and biological efficiency (BE) in function of the use of microbial additives during composting seeking the cultivation of the *A. subrufescens* mushroom, using the composting system and steam pasteurization.

2. Materials and Methods

In this work, the species of microorganisms isolated directly from the *A. subrufescens* cultivation compost during Phase II of the composting were used as microbial additives.

2.1. Isolates, culture media and microbial additives

The CS10 (*A. subrufescens*) strain was used, belonging to the mycological collection of the Laboratório de Cogumelos Comestíveis da Universidade Federal de Lavras. The strain was reactivated and maintained in WA medium (Wheat Agar) until the production of the *spawn*. For the medium

preparation, 1 Kg of wheat grain was used, which was cooked in boiling water for 15 minutes. Subsequently, 1 L of the broth was used, to which 15 g of Agar and 15 g of Yeast Extract were added. The medium was autoclaved at 121°C/30 minutes. After cooling, the medium was poured into Petri dishes (20 mL plate⁻¹). Soon afterwards, the strains were inoculated on the plates and incubated at the 25°C ±1/10 days to obtain the initial inoculate. After the incubation period, the primary inoculate was incubated in 500 mL glass flasks containing wheat grains and 2% added calcium carbonate and 1% gypsum and maintained at 25°C ±1 /30 days, obtaining the *spawn*.

The microbial additives were divided in two groups: Additive 1 - *Scytalidium thermophilum* (isolate CBS 619.91, originating from the Departamento de Biologia, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil) and, Additive 2 – *Bacillus megaterium* (isolate 84i4 A3.5), *Bacillus cereus* (isolate 83i4 A4.4), from the Laboratório de Cogumelos Comestíveis, Departamento de Biologia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil)

For the cultivation of the *Scytalidium thermophilum*, Oat meal Agar was used, enriched with Sorbose at 40° C for 7 days. After the incubation period, the spores were resuspended in saline solution (0.9%) and counted with the aid of a Neubauer camera. For the cultivation of the bacteria, the isolates were reactivated in pH 7.5 nutrient broth, (0.2% Na₂HPO₄; 0.3%NaCl; 0.3% Meat Extract; 0.5% Peptone) and later cultivated in the same medium at 45° C/2 days.

2.1.2. Composting

The compost was prepared according to the methodology described by Siqueira et al. (2009) with modifications, using as ingredients: sugarcane bagasse (45 kg), Coastcross grass (45 kg), wheat straw (10 kg), lime (2 kg), gypsum (2 kg) and ammonium sulfate (1 kg). The treatments were divided into

five groups: Treatment 1 - without microorganism addition (control); Treatment 2 – *B. megaterium*, Treatment 3 – *B. cereus*, Treatment 4 – *S. termophyllum*, Treatment 5 – *B. megaterium*, *B. cereus* and *S. termophyllum*. The additives were used at a concentration of 10^6 CFU g^{-1} of moist compost for each microbial species. The cultures were initially diluted in 10 L of water and soon afterwards were added to the compost on the 8th day of the composting process.

At the end of the composting, the substrate was pasteurized at $60^\circ C/12$ hours of continuous steam. After cooling to room temperature, the compost was inoculated (10 g spawn kg^{-1}), conditioned in polypropylene bags (2 kg/bag) and incubated at $25^\circ \pm 3^\circ C$ until the complete colonization. The addition of the covering layer followed the same procedures described by Siqueira et al. (2009) with modifications.

The first harvest took place 29 days after the induction of fructification and the total duration of the cultivation cycle was 117 days, 4 harvest cycles taking place. On the day of maxim production, in the first flow, samples were collected for determination of the of protein content of the mushrooms for each treatment. The protein content was calculated from the total concentration of nitrogen, using a conversion factor of 4.38. For the calculation of the total nitrogen content the Kjeldahl method was used (Pardo et al., 2004; MAPA, 1994).

The production cycle, from the inoculation to the end of the harvest, was conducted under the temperature, relative humidity and carbon dioxide concentration conditions recommended for the selected species, maintaining the temperature at $25^\circ C \pm 3$ and the relative humidity at $80\% \pm 4$. The carbon dioxide concentration was reduced from 5000 ppm during the compost colonization phase to 700 ppm for induction of the fructification, maintaining these conditions until the end of the cycle.

2.1.3. Productivity and biological efficiency

The productivity was calculated through the formula: (weight of fresh mushrooms/weight of moist compost) x 100, while the biological efficiency was calculated through the formula: (weight of fresh mushrooms / weight of dry compost) x 100, both expressed in percentage.

2.1.4. Harvest and production analysis

The mushrooms were picked daily according to their optimum state of commercial development, when the veil was stretched, but before the lamellae were exposed.

2.3. Experimental design

A completely randomized design - CRD was used, in which the treatments corresponded to the variations of the microbial additives with the strain CS10, (Table 3). For each treatment 10 repetitions were used. Thus, a total of 50 bags (2 Kg) were used, which represented each treatment.

The statistical program SISVAR®UFLA (Ferreira, 2000) was used, to which the data were submitted for variance analysis and the averages were compared by the Scott-Knott (5%) test (Andrade et al., 2010).

3. Results and Discussion

It was observed that the choice of the additive and the inoculate concentration can interfere in the preparation and obtaining of an appropriate substrate for the development of the mushroom. The biological efficiency as well as the productivity of *A. subrufescens* were appraised in different treatments using microbial additives inoculated to the composting process (Table 2).

Table 2 Quantitative and qualitative data for different *A. subrufescens* (CS10) cultivation treatments

Treatments*	Quantitative data				Qualitative data		
	Total mushrooms	Weight (kg)	Unit weight**	BE (%)	Productivity (%)	Dry Matter (%)	Protein (%)
1	8d	0.135e	16.88c	25.78e	8.25e	87.33e	22.53e
2	11c	0.205d	18.63b	32.03d	10.25d	88.05d	23.38d
3	14b	0.290b	20.71a	45.31b	14.50b	89.29b	27.22b
4	13b	0.240c	18.46b	37.50c	12.00c	88.80c	25.80c
5	20a	0.375a	18.75b	58.59a	18.75a	89.78a	29.64a
Mean	13.2	0.249	18.69	39.84	12.75	88.65	25.71
C.V.	28.19%						

Means with the same letters in the same column do not differ statistically by the Scott-Knott test (5% of probability). *1- Without microorganism addition; 2- *B. megaterium*; 3- *B. cereus*; 4- *S. termophyllum*; *B. megaterium*, *B.cereus* and *S. termophyllum*.

**Average weight of mushrooms harvested from each treatment (g).

The biological efficiency varied from 25.78 to 58.59% while the productivity reached values between 8.25 and 18.75%. Colauto et al. (2010), affirm that environmental characteristics, such as the type of covering layer, can influence the production of varieties of *A. subrufescens*, suggesting suitable conditions depend on the variety used in the cultivation cycle.

The biological efficiency of *A. subrufescens* can vary from 33.8% to 58.7%, depending on the cultivation conditions, when the compost is prepared according to the phases of the Conventional System I and II (Eira, 2003). The data obtained in this work demonstrated compatible biological efficiency values in relation to the author's results, suggesting that the quality of the compost is directly related to its composition and microbial community succession during the composting (Peters et al., 2000).

With regard to the analyses of the quantitative parameters, different values were observed for total mushrooms produced in all of the treatments, with the highest value being found in Treatment 5 and lowest value in Treatment 1, although Treatments 3 and 4 did not present significantly different data. All of the treatments presented statistically different differences for the analyzed parameters: Weight, Biological Efficiency and Productivity, with highest values for Treatment 5 and lowest observed in Treatment 1. The unit weight of the picked mushrooms presented an average of 18.69 g, Treatments 2, 4 and 5 being statistically equal. The lowest value was observed in Treatment 1, while Treatment 5 presented the highest result (Table 2).

Significant differences were also observed among the different treatments regarding the dry matter and protein content. The highest dry matter content was obtained in Treatment 1 (12.67%). It is important that the edible mushrooms present high dry matter content, because, the higher the dry matter content, the lower the water content, and consequently the nutrient values, such as vitamins, minerals, carbohydrates, fibers, fats and amino acids will be higher

(Chang and Miles, 2004). By other hand, the lowest content dry matter was observed in the treatment 5 (10.22%) but in this treatment we can observe higher protein content (29.64%). Considering the tested conditions, we can suggest that the studied microbial additives influence in the quantitative and qualitative parameters.

It is possible to observe statistical differences in the Treatments 2 and 3, for all of the analyzed parameters, although the additives belong to the same genus (*Bacillus*), thus demonstrating the particularity and specificity that the microorganisms can carry out in the composting process of edible mushroom cultivation substrate. This statement is even more clear when we compared Treatments 2, 3 and 5 that present species of *Bacillus* as microbial additives, because they present different behavior when they act together with other microorganisms when compared to their isolated activity. This means that higher microbial activity during composting provided a cultivation substrate more favorable to the development of the basidiocarps, obtaining higher quantitative and qualitative data values in relation to the treatments with only one microbial additive.

Treatment 5, characterized by the addition of the microorganisms *B. megaterium*, *B. cereus* and *S. termophilum* to the composting process, presented the highest total amount of harvested mushrooms, total weight, biological efficiency, productivity and dry matter and protein content when compared to the other treatments. In contrast, Treatment 1, characterized by the absence of microbial additives, presented the lowest amount and total weight of the harvested mushrooms, as well as the lowest biological efficiency, dry matter, protein and, above all productivity values. The use of microbial additives in the composting process contributed to the observation of superior quantitative and qualitative data values studied in the work, when compared with the values obtained in the treatment that did not present microbial additives. As such, this

suggests that a higher microbial activity, especially of thermophilic microorganisms in the cultivation substrate, can be beneficial to the productivity of *A. subrufescens*.

Microbial additives, besides the microbial activity existent in the substrate, can provide higher selectivity for the mushroom growth in the cultivation substrate. That information can be proven with the results obtained in this work, because, in the treatment without microorganism addition (Treatment 1) biological efficiency and productivity of 25.78 and 8.25%, respectively, was obtained. While in Treatment 5, with fungal and bacterial additives, besides the native microflora, we obtained much superior biological efficiency (58.59%) and productivity (18.75%) values.

According to Coello-Castillo et al. (2009), the presence of the thermophilic fungus *S. thermophyllum* aids in the colonization of species of the genus *Agaricus* because it helps to produce a selective substrate, however, the productivity decreased when the thermophilic fungus colonizes the substrate for more than 3 days. That assertion still remains without explanation, but it can be in function of competitor microorganism growth that inhibit the mushroom growth. More detailed studies are necessary to explain what the role of microbial additives is, in the selectivity of the cultivation substrate and production of *A. subrufescens*.

The obtained results demonstrated that the native microbiota of the substrate, as well as microbial additives, can promote higher biological efficiency and productivity when compared with substrate that present low microbial activity, because the microbial activity contributed to the degradation of the substrate and metabolite formation that stimulate *A. subrufescens* growth.

The productivity data obtained in the treatments with microbial additives presented values between 10.25% and 18.75%. While the productivity reached in the treatments without additives was 8.52%. Siqueira et al., (2011), found

productivity values for *A. subrufescens* commercial strains between 10.36 and 13.28% in function of the initial content of Nitrogen in the compost. Zied et al., (2010), obtained an average of 15.5% researching different covering layers, while Colauto et al., (2010), in their investigations with alternatives to peat covering layers, found average productivity values of 11.8%. As such, the viability of microbial additive use to stimulate productivity increases of *A. subrufescens* is proven, because the data obtained in the research were superior to the results confirmed in previously conducted experiments.

The use of different species as microbial additives, during the composting for two weeks, provided a more selective substrate and with better results in all of the treatments that used additives when compared with the substrate without microbial additives. By other hand, the use of microbial additives presents standardization difficulties, because, up to now researchers do not know the role of the microbiologic activity of the introduced organisms.

Reddy and Patrick (1990) reported studies (Sinden; Hauser, 1950) in which they demonstrated that some of the bacteria that were associated with the composting and the covering layer materials had significant effects on the growth and fructification of the mushroom.

Gill et al., (2005) developed a new automated system of *A. bisporus* production in three phases, conducted inside of a container. The total growth cycle was reduced to 69 days in relation to the 109 days under the conventional system. According to the same authors, among other factors, these results were only possible because a mixture of bacteria and *S. thermophilum* were added, however, the names of the bacteria were not revealed.

Data from previous research has demonstrated that the inoculation of *S. thermophilum* during Phase II of the composting can provide higher productivity, with *A. bisporus* yields of up to three times higher in relation to the control (Vijay et al., 1999; Straatsma et al., 1994). Information available in the

literature confirms results of research with isolation of microorganisms during the composting, colonization, covering layer and basidiocarp fructification stages, especially in cultivation of *A. bisporus*, however, few reports are observed on the use of microbial additives during the composting, and in some cases the species used as additives are not mentioned (Gill et al., 2005; Oei, 2003).

In the present work, the data obtained suggest that certain species act in a quite specific way. Therefore, it is fundamental to know the species that occur naturally in the compost, which can be used as microbial additives in compost used for commercial cultivation of edible mushrooms, especially *A. subrufescens*.

4. Conclusions

Different species can be used as microbial additives, for the conditions tested in the cultivation of *A. subrufescens*, among them: *B. megaterium*, *B. cereus* and, *S. termophilum*, because they provide higher yields when compared to the treatments without additives.

Higher values of the quantitative and qualitative data were observed when a microbial additive with more diversity of microorganisms was used in the compost, demonstrating an increase of the microbial activity in the cultivation substrate and its influence on the mushroom productivity.

Detailed studies are fundamental to identify the microbiota active in the compost and its role in the selectivity of the cultivation substrate to stimulate *A. subrufescens* growth.

5. Acknowledgments

To the Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), to IF Baiano and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES processo: 5083/11-7), for financial support.

6. References

ANDRADE, M.C.N.; CHAVARI, J.L.; MINHONI, M.T.A.; ZIED, D.C. (2010). Crescimento micelial in vitro de cinco linhagens de *Agaricus bisporus* submetidas a diferentes condições de temperatura. *Acta Scientiarum Agronomy*. 32(1), 69-72.

AHLAWAT, O.P.; VIJAY, B. (2010). Potential of thermophilic bacteria as microbial inoculant for commercial scale white button mushroom (*Agaricus bisporus*) compost production. *Journal of Scientific & Industrial Research*. 69 (12), 948-955.

BECHARA, M.A. (2007). Alternative mushroom production systems using noncomposted grain-based substrates. Thesis in Agricultural and Biological Engineering, Pennsylvania State University, Department of Agricultural and Biological Engineering.

CHANG, S.T.; MILES, P.G. (2004). *Mushrooms: Cultivation, Nutritional Value, Medicinal Effect, and Environmental Impact*. CRC Press, Boca Raton, FL. 2, 95-100.

COELLO-CASTILLO, M.M.; SÁNCHEZ, J.E.; ROYSE, D.J. (2009). Production of *Agaricus bisporus* on substrates pre-colonized by *Scytalidium thermophilum* and supplemented at casing with protein-rich supplements. *Bioresource Technology*. 100 (19), 4488–4492.

COLAUTO, N.B.; SILVEIRA, A.R.; EIRA, A.F.; LINDE, G.A. (2010). Alternative to peat for *Agaricus brasiliensis* yield. *Bioresource Technology*. 101, 712–716.

DIAS, E. S. (2010). Mushroom cultivation in Brazil: challenges and potential for growth. *Ciencia & Agrotecnologia*. 34, 795-803.

EIRA, A. F. (2003). Cultivo do cogumelo Medicinal *Agaricus blazei* (Murrill) ss Heinemann ou *Agaricus brasiliensis* (Wasser et al). 1, 398.

FERREIRA, D.F. (2000). SISVAR - Sistema de análise estatística - Lavras, Programa computacional. DCE, UFLA.

GILL, P.; ELMEKKAWY, T.; STRONG, D. (2005). Productivity improvement in mushroom plants. *The Canadian Society for Engineering in Agricultural, Food, and Biological Systems*. 5, 101.

MATUTE, R. G.; FIGLAS, D.; CURVETTO, N. (2011). *Agaricus blazei* production on non-composted substrates based on sunflower seed hulls and spent oyster mushroom substrate. *World J Microbiol Biotechnol*. 27, 1331–1339.

MINISTERIO DE AGRICULTURA, PESCA Y ALIMENTACIÓN. (1994). *Métodos Oficiales de Análisis*. Madrid: MAPA. 1, 532.

OEI, P. (2003). Mushroom cultivation - Appropriate technology for mushroom growers. 3, 429.

PARDO, A.; DE JUAN, A. J.; PARDO, J.; PARDO, J. E. (2004). Assessment of different casing materials for use as peat alternatives in mushroom cultivation. Evaluation of quantitative and qualitative production parameters *Spanish Journal of Agricultural Research*. 2(2), 267-272.

PETERS, S.; KOSCHINSKY, S.; SCHWIEGER, F.; TEBBE, C. C. (2000). Succession of microbial communities during hot composting as detected by PCR–single-strand-conformation polymorphism-based genetic profiles of small-subunit rRNA genes. *Applied and Environmental Microbiology*. 66(3), 930-936.

REDDY, M. S.; PATRICK, Z. A. (1990). Effect of bacteria associated with mushroom compost and casing materials on basidiomata formation in *Agaricus bisporus*. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 12(3), 236-242.

SALAR, R.K.; ANEJA, K.R. (2007). Significance of thermophilic fungi in mushroom compost preparation: effect on growth and yield of *Agaricus bisporus* (Lange) Sing. *Journal of Agricultural Technology*. 3(2), 241-253.

SILVA, C.F.; AZEVEDO, R.S.; BRAGA, C.; SILVA, R.; DIAS, E.S.; SCHWAN, R.F. (2009). Microbial diversity in a bagasse-based compost prepared for the production of *Agaricus brasiliensis*. *Braz. J. Microbiol.* [online]. 40 (3) 590-600.

SINDEN, J.W.; HAUSER, E. (1950). The short method of mushroom composting. *Mushroom Science*. 1, 52-59.

SIQUEIRA, F.G.; MARTOS, E.T.; SILVA, E.G.; SILVA, R.; DIAS, E.S. (2011). Biological efficiency of *Agaricus brasiliensis* cultivated in compost with nitrogen concentrations. *Horticultura Brasileira* 29, 157-161.

SIQUEIRA, F.G.; DIAS, E.S.; SILVA, R.; MARTOS, E.T.; RINKER, D.L. (2009). Cultivation of *Agaricus blazei* ss. Heinemann using different soils as source of casing materials. *Scientia Agricola*. 66 (6), 827-830.

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

VAJNA, B.; NAGY, A.; SAJBEN, E.; MANCZINGER, L.; SZIJARTÓ, N. KÁDÁR, S.; BORDÁS, D.; MARIALIGETI, K. (2010). Microbial community structure changes during oyster mushroom substrate preparation. Appl Microbiol Biotechnol. 86, 367–375.

VIJAY, B.; SHARMA, S.R.; VERMA, R. N.; LAKHANPAL, T.N. (1999). Role of thermophilic fungi in compost production for White Button mushroom (*Agaricus bisporus*). In: INTERNATIONAL CONFERENCE OF MUSHROOM BIOLOGY AND MUSHROOM PRODUCTS. 3, 23.

ZIED, D.C.; MINHONI, M.T.A.; KOPYTOWSKI-FILHO, J.; ANDRADE, M.C.N. (2010). Production of *Agaricus blazei* ss. Heinemann (*A. brasiliensis*) on different casing layers and environments. World J Microbiol Biotechnol. 26, 1857–1863.

ARTIGO 3

Application of Hazard Analysis and Critical Control Points (HACCP) to the cultivation line of mushroom and other cultivated edible fungi

Artigo publicado no periódico Indian Journal of Microbiology

José E. Pardo, Vinícius Reis de Figueirêdo, Manuel Álvarez-Ortí, Diego C.

Zied, Jesús A. Peñaranda, Eustáquio Souza Dias, Arturo Pardo-Giménez

Abstract

The Hazard Analysis and Critical Control Points (HACCP) is a preventive system which seeks to ensure food safety and security. It allows product protection and correction of errors, improves the costs derived from quality defects and reduces the final overcontrol. In this paper, the system is applied to the line of cultivation of mushrooms and other edible cultivated fungi. From all stages of the process, only the reception of covering materials (stage 1) and compost (stage 3), the pre-fruiting and induction (step 6) and the harvest (stage 7) have been considered as Critical Control Point (CCP). The main hazards found were the presence of unauthorized phytosanitary products or above the permitted dose (stages 6 and 7), and the presence of pathogenic bacteria (stages 1 and 3) and/or heavy metals (stage 3). The implementation of this knowledge will allow the self-control of their productions based on the system HACCP to any plant dedicated to mushroom or other edible fungi cultivation.

Keywords: *cultivated mushroom, hygiene, quality, security, self-control*

Introduction

The Hazard Analysis and Critical Control Points (HACCP) is a preventive system which seeks to ensure the security and safety of food, identifies specific hazards associated with food or drinks and establish control systems that focus on prevention and not on the final product analysis [1-3]. It is a dynamic system that can cope with new dangers arising from the appearance of emerging pathogens and food poisoning, due to changes in habits and consumption patterns [4].

Apart of improving food safety, the application of the HACCP system can provide other significant benefits such as the ease of inspection by regulatory authorities, the reduction of final product losses (reducing the causes of product alteration) and the promotion of international trade by increasing the confidence in food safety. All of sanitary supranational institutions consider this system in their programs, recommending its use, not only for industry, but throughout the food chain, from the primary producer to the final consumer.

In 2003, the cultivation of mushrooms in the main European producing countries (Netherlands, France and Spain) began a drastic decline in production. The main reason of this decline in production is the fierce competition with third countries, especially China, with lower costs production due to the lower cost of manpower and less sanitary control from the local authorities. In this sense, the implementation of HACCP in the different production and processing lines of mushroom and other cultivated edible fungi aims to significantly improve the product quality [5], to increase the consumer satisfaction and safety, and to improve the image and competitiveness of mushrooms producing companies.

The main objective of this work is the implementation of HACCP system in the cultivation line of mushroom and other cultivated edible fungi. This will allow the growing companies to design and establish a self-control system to ensure the quality of their productions. In addition it will facilitate the

official control tasks, providing a much more complete and objective vision of the processes in the cultivation line of mushrooms.

Material and Methods

In order to establish the HACCP system in the cultivation lines of mushroom and other edible fungi, different cultivation plants located in the area of Manchuela (Castilla-La Mancha, Spain) were visited. This region produces 45 % of mushroom total production in Spain. The first step consisted in the collection of information related to the process and the physical, chemical and biological properties of the raw materials used (previously inoculated compost and substrate coverage).

An important step in the methodology to establish the HACCP system is the development of a flow chart of the entire production process (Fig. 1). Once defined, reviewed and verified this diagram, a revision of the process is done in order to determine potential physical, chemical or biological hazards that could be detrimental to food safety [6,7].

A set of preventive measures are defined to be applied in order to reduce or nullify the hazards identified in the previous step. After that, the critical control points (CCP) are determined using a tree or sequence of decisions [8,9], which indicates a logic reasoning approach, as recommended by various international organizations [10,11].

Critical limits are defined for each stage considered as CCP. Above or below these limits, the process is considered unacceptable in order to ensure food safety. A monitoring system is established in order to enable to detect the potential alterations and to measure or schedule observations of the CCP according to its critical limits.

Subsequently, the corrective measures specific to each CCP are formulated to deal with deviations when they occur.

Finally, a system of documentation and recording is established to document all procedures of the HACCP system and all records that were necessary to carry out the correct implementation of the HACCP system.

Results and Discussion

Table 1 summarizes the main hazards that may be found for each stage of the mushroom cultivation process. The type of hazard (physical, chemical or biological) is indicated, as well as the preventive measures to be considered to minimize or eliminate the hazard. The stages that are considered CCP after applying the decision tree are also indicated, with their critical limits, the monitoring necessary to demonstrate that the CCP is under control, the specific corrective actions, and the documentary evidences to be recorded [12].

Only stages 1 (receipt of casing materials), 3 (fill-receipt of compost), 6 (pre fruiting-induction), and 7 (harvest) can be considered as CCP in the process. In the rest of stages, the correct application of the prerequisites of the HACCP system [13] (water control plan, cleaning and disinfection plan, training plan and control of manipulators, maintenance plan, insect and rodent control plan, suppliers control plan, traceability control plan, and waste control plan) will prevent or minimize the potential hazards to acceptable levels. The hazards, preventive measures, critical limits, monitoring, corrective measures and the records associated to each stage considered as CCP are described below.

Stage 1 – Reception of casing materials

The casing layer provides an optimal medium for mushroom fruiting due to its characteristics of porosity, water retention, pH, etc [14]. Currently, in the region of Manchuela the casing layers are based on the use of mineral soil from different origins (topsoil, subsoil, etc.), with the addition of other materials to

correct the structure and water retention such as sphagnum peat that must be imported, or black peat from national origin [15].

The casing materials are subjected to controls in the reception to ensure that they arrive in perfect conditions and without signs of microbial contamination or alteration, as their characteristics have a determining influence on productivity and quality of the final product. A room intended specifically for this purpose is available at the mushroom industries, where appropriate hygienic conditions are kept to prevent microbial contamination or alteration.

Hazards - The main hazard of this stage is the presence of pathogenic microorganisms in the casing material [16]. These microorganisms may remain in the ground along the whole crop cycle, contaminating the mushroom before harvesting and therefore, they can be ingested by the consumer. The other hazards of this stage will be eliminated or minimized to acceptable levels after the proper application of the plans included in the prerequisites of the HACCP system.

Preventive measures - The analysis of the casing material at the reception will be essential. The reception must be done at a location with good sanitary conditions. With this purpose, an adequate cleaning and disinfection program must be applied.

Critical limit – The critical limit will be established according to the type of pathogenic microorganism present in the casing material.

Monitoring – The casing material will be analyzed from the microbiological point of view before the beginning of the cultivation cycle.

Corrective measures – When high levels of pathogenic microorganisms are detected, the casing material should be discarded and substituted by other with higher microbiological quality.

Records – The analysis done to the casing material will be registered. In addition, the incidences occurred during this stage and the corrective measures applied will be annotated.

Stage 3 – Fill-receipt of compost

At this stage, the previously inoculated compost bags are placed on the shelves of the cultivation plant, separated by corridors of sufficient width to allow the realization of the cultivation works. In addition, the cultivation plants must have a series of mandatory aspects: they must be isolated from the outside environment; with a paved floor, polished and with slope to drain the wash water; with heating and ventilation systems, etc. Other recommended aspects include the automatic climate control.

Hazards – In a similar way as mentioned with casing materials, the main hazard of this stage consists in the use of compost contaminated with pathogenic microorganisms [17]. The contamination may originate from the inadequate production processes of compost or it may be produced in the cultivation plant when the compost arrives or by direct contact with the compost that is being removed from a nearby plant. In addition, the compost can be contaminated due to the movement of personnel without the proper hygienic conditions in hands, clothes or footwear, or due to the opening of the cultivation plant for too long periods. The correct application of the prerequisites prevents contamination of compost in the cultivation plant or through the personnel, but will not prevent the previous contamination of the compost, before entering into the cultivation plant. A chemical hazard to consider consists of the possible presence of high levels of heavy metals (cadmium, lead, copper, etc.) in the compost. The heavy metals may be present in some of the ingredients used to prepare the compost, like straw, manure, etc.

Preventive measures – The compost must be analyzed in the reception to detect the presence of pathogens and heavy metals. To ensure the optimal hygienic conditions at the beginning of the cultivation, the plant must be subjected to a complete sweeping, washing and disinfection prior to the filling. In addition, the strict hygienic conditions must be maintained throughout the cultivation cycle. The filling of the shelves must be done with care and in the shortest time possible, ensuring that the compost bags do not suffer breakage. It must be avoided to fill the cultivation plant coinciding with the emptying of a crop done to less than 150 meters away. This way, the contamination of the newly inoculated compost with the removed one is prevented. The contamination levels will decrease significantly when the personnel that is in direct contact with the material in process is concerned about keeping their conditions of cleanliness. The use of clean clothes and footwear will be a preventive measure. The installation of insect traps will prevent the occurrence of pests and will help in their detection. The adequate control of air and compost temperature, humidity and CO₂ is essential immediately after the filling of the cultivation plant.

Critical limit – The critical limit will be established according to the type of pathogenic microorganism and the heavy metal present in the compost. The recording of the operations of filling and emptying will establish the synchronization of these operations to avoid the overlap in nearby plants.

Monitoring – The compost will be analyzed from the microbiological and chemical points of view before the beginning of the cultivation cycle. On the other hand, the filling and emptying of nearby plants will be considered to avoid the overlap of these operations.

Corrective measures – When high levels of pathogenic microorganisms or heavy metals are detected, the compost will be discarded and substituted by other with higher microbiological and chemical quality. The traceability of the

substrates quality from the supplier companies of compost and their internal controls can be useful tools to consider. When an overlap of the operations of filling and emptying in nearby plants are produced, the filling will be stopped, and it will be done when the emptying of the other plant is completely finished.

Records – The analysis provided by the compost suppliers or the analysis done to the compost will be registered. The dates of filling and emptying of the cultivation plants will also be recorded. In addition, the incidences occurred during this stage and the corrective measures applied will be annotated.

Stage 6 – Pre fruiting-Induction

At this stage, the mycelium continues the casing layer colonization. The initiation and development of carpophores take place at the end. The vegetative growth conditions are maintained for about 8 days, with limited ventilation. After that, a sudden decrease in the temperature to 12-20°C is done, accompanied by strong aeration ($\text{CO}_2 \leq 0.08\%$). The relative humidity is also reduced, remaining at 85-90 %. It is recommended not to water when the primordia size is lower than a pea. The presence of certain bacteria (*Pseudomonas putida*, among others) in the casing layer can help to develop fruiting [18]. The vegetative growth is favored by a high C/N ratio while the fruiting needs a lower ratio. At this stage, preventive treatments with fungicides and insecticides are usually carried out to prevent fungal and insect proliferation.

Hazards – The main hazards in this stage may result from different sources, in particular the hygienic and sanitary conditions of the casing layer applied in the previous stage. The use of unauthorized fungicides and insecticides, or in higher doses than recommended, or without respecting the security period will become the main hazards at this stage. The inadequate quality of irrigation water can also represent a hazard for the cultivation.

Preventive measures – The application of authorized phytosanitary treatments is the main preventive measure. The most widely used fungicide after application of the casing layer in the case of mushroom cultivation is the Prochloraz (45 % SC and 46 % WP), while the most common insecticide is the Diflubenzuron (25 % WP). In addition, the analysis of the irrigation water must be done to ensure the adequate quality.

Critical limit – The critical limit is defined by the use of authorized phytosanitary products, applied in the correct dose, and respecting the security periods established for the use. This information must appear in detail on the labels of these products and must be taken into account previously to their use.

Monitoring – The use of authorized phytosanitary products, the doses applied and the fulfillment of the security periods established for their use will be monitored. Tracking plans in the collected mushrooms will be done to verify the possible presence and levels of phytosanitary products residues.

Corrective measures – When the application of fungicides and insecticides are not effective, the treatment schedule will be corrected. If the problem persists, the product will be replaced by a similar and authorized one. When the presence of pesticide residues are detected in mushrooms at levels above those permitted, the mushroom harvested will be destroyed according to the monitoring plans for pesticide residues in crops implemented by the corresponding authorities.

Records – The programming of phytosanitary treatments will be recorded. The records will include the annotation of the products used, their active ingredients, the type of treatment, and the moment of application, doses, security periods and toxicology. In addition, the incidences occurred during this stage and the corrective measures applied will be annotated.

Stage 7 – Harvesting

The harvesting of the mushrooms of the first flush begins about 16-20 days after the application of the casing layer, depending on the species, the cultivation method, the thickness of the casing layer, etc. The collection of the successive flushes is done with intervals of 7-10 days (up to five flushes, although it is not usual to exceed three to avoid the incidence of pests and diseases that are produced at the end of large cultivation cycles.). The containers in which the mushrooms are collected must be as practical as possible, and with smooth walls to avoid the damage in the mushrooms [19]. The application of phytosanitary treatments may be necessary between consecutive flushes, thus the main hazard of this stage is the use of unauthorized products, with higher doses than allowed, or without respecting the recommended security periods. Therefore, the preventive measures, the critical limits, the monitoring, the corrective measures and the records to be applied will be similar to those of the previous stage (pre fruiting-induction).

References

1. EEC (1993) Council Directive 93/43/CEE on the hygiene of foodstuffs. Official Journal of the European Union L175, 19.7.93, S.1
2. Leaper S (1992) HACCP: A practical guide. Technical Manual No. 38. Campden Food and Drink Research Association, Chipping Campden, Gloucestershire, UK
3. Ehiri JE, Morris GP, McEwen J (1995) Implementation of HACCP in food businesses: the way ahead. Food Control 6: 341-345
4. Pardo JE, Peñaranda JA, Alvarez-Ortí M, Zied DC, Pardo A (2011) Application of the Hazard Analysis and Critical Control Point (HACCP) system on the mushroom processing line for fresh consumption. Ital J Food Sci 23: 126-135

5. Yunsheng W, Shipu X, ChangZhao W, Jihong C, Qian G, Juan Y, Jingying Z (2011) Towards Developing an Edible Fungi Factory HACCP MIS Base on RFID Technology. *IFIP Advances in Information and Communication Technology* 346 (3): 222-230
6. Untermann F (1998) Microbial hazards in food. *Food Control* 9: 119-126
7. Ropkins K, Beck AJ (2002) Application of hazard analysis critical control points (HACCP) to organic chemical contaminants in food (Review). *Crit Rev Food Sci* 42 (2): 123-149
8. Cerf O, Donnat E (2011) Application of hazard analysis – Critical control point (HACCP) principles to primary production: What is feasible and desirable?. *Food Control* 22: 1839-1843
9. Toregeani-Mendes KA, Arroiteia CC, Kemmelmeier C, Dalpasquale VA, Bando E, Alves AF, Maarques OJ, Nishiyama P, Mossini SAG, Machinski Jr M (2011) Application of hazard analysis critical control points system for the control of aflatoxins in the Brazilian groundnut-based food industry. *Int J Food Sci Tech* 46: 2611-2618
10. ICMSF (1991) El sistema de análisis de riesgos y puntos críticos. Su aplicación a las industrias de los alimentos. Acribia, Zaragoza
11. FAO (2003) Manual sobre la aplicación del sistema de Análisis de Peligros y de Puntos Críticos de Control (APPCC) en la prevención y control de las micotoxinas. FAO
12. CAC, Codex Alimentarius Commission (1993) Guidelines for the application of the hazard analysis critical control point (HACCP) system. FAO, Rome, Italy
13. Ropkins K, Beck AJ (2003) Using HACCP to control organic chemical hazards in food wholesale, distribution, storage and retail. *Trends Food Sci Tech* 14: 374-389

14. Pardo A, de Juan A, Alvarez-Ortí M, Pardo JE (2010) Screening of *Agaricus bisporus* (Lange, Imbach) Strains and the Casing Variables for Quality Mushroom Production in Spain. *Hortscience* 45 (2): 231-235
15. Pardo J (1999) Compostaje para cultivo de champiñón: una revisión de su ámbito de variabilidad y su repercusión en la calidad y costes del compost. In: *Avances en la tecnología de la producción comercial del champiñón y otros hongos cultivados*. Patronato de Promoción Económica y Turismo de Cuenca, pp 49-99
16. Fletcher JT, Gaze RH (2008) Mushroom pest and disease control. Manson Publishing, London, UK
17. Oseni TO, Dlamini SO, Earnshaw DM, Masarirambi MT (2012) Effect of substrate pre-treatment methods on oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) production. *Int J Agric Biol* 14 (2): 251-255
18. Rainey PB (1991) Effect of *Pseudomonas putida* on hyphal growth of *Agaricus bisporus*. *Mycol Res* 95: 699–704
19. Chen X, Jin W, Dong Y, Meng L, Wei Q (2012) Research progress in preservation of postharvest edible fungi. *Advanced Materials Research* 476-478: 614-619

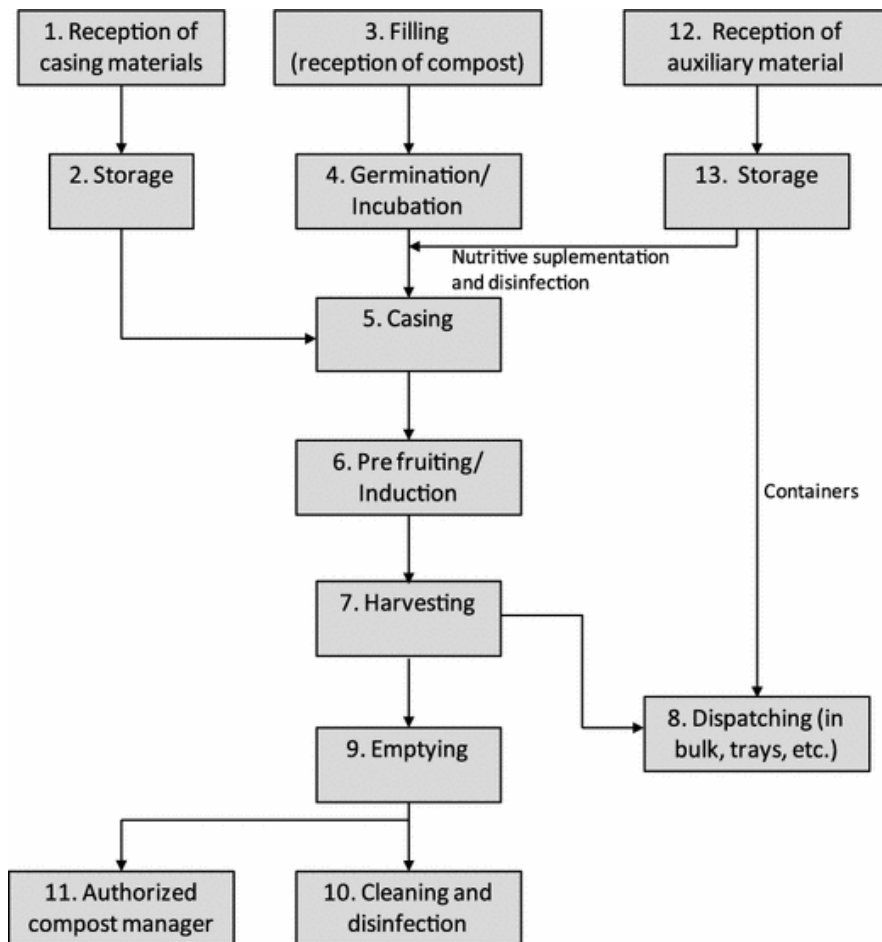


Figure 1 Flow chart of the mushroom cultivation line

Table 1 Synoptic of application of the mushroom cultivation line

Stage	Type of hazard			Hazards	Preventive measures	CCP	Critical limit	Monitoring/ frequency	Corrective measures	Records
	Physical	Chemical	Biological							
1. Reception of casing materials			X	Presence of pathogenic microorganisms in the casing materials	Analysis of the casing materials	Yes	According to the type of pathogenic microorganism	Microbiological analysis of the casing materials	Replacement of casing	Analysis done
2. Storage of casing materials	X	X	X	Poor hygienic and sanitary conditions of the reception room	Application of the cleaning and disinfection plan	No				Incidences and corrective measures
			X	Dirtiness (insects, dust, etc.)	Application of the cleaning and disinfection plan					
3. Filling (reception of compost)			X	Contamination with parasites and pathogenic microorganisms	Analysis of the compost used	Yes	According to the type of pathogenic microorganism and heavy metals	Microbiological and chemical analysis of the compost	Replacement of the compost	Analysis done
			X	Presence of pathogenic microorganisms in the compost	Application of the cleaning and disinfection plan					
4. Germination/ Incubation	X	X	X	High levels of heavy metals in some ingredients of the compost	Application of the cleaning and disinfection plan	No				Incidences and corrective measures
			X	Poor hygienic conditions of the installations and transport	Quick and careful transport					
			X	Contamination with the removed compost from nearby plants	Avoid overlapping of filling and emptying in plants closer than 150 m Temperature, humidity and air control					
			X	Appearance of pests	Installation of insect traps					
			X	Appearance of pests and diseases	Application of the cleaning and disinfection plan					

Table 1, continue

Stage	Type of hazard			Hazards	Preventive measures	CCP	Critical limit	Monitoring/ frequency	Corrective measures	Records
	Physical	Chemical	Biological							
5. Casing			X	Contamination by the inadequate quality of irrigation water	Preventive maintenance of refrigeration system Control of air, environment and substrate temperature, humidity, CO ₂ and aeration Installation of mosquitoes traps Application of insecticide treatments Ensure the quality of irrigation water					
			X	Poor hygienic and sanitary conditions	Application of the cleaning and disinfection plan	No				
			X	Contamination due to lack of hygiene in the casing tools	Adequate disinfection of tools and machinery					
			X	Contamination with chemical residues from the tools cleaning	Preventive maintenance of refrigeration system					
			X	Appearance of pests and diseases	Control of air, environment and substrate temperature, humidity, CO ₂ and aeration					
6. Pre fruiting/Induction			X	Contamination with nematodes, bacteria and fungi from casing layer	Installation of mosquitoes traps					
	X		X	Contamination by the inadequate quality of irrigation water	Ensure the quality of irrigation water					
		X		Use of unauthorized phytosanitary products, or in higher doses than allowed or without respecting the security period	Application of authorized phytosanitary products, in adequate doses and respecting the security period	Yes	Use of authorized phytosanitary products, in adequate doses and respecting the security period	Phytosanitary products, doses and security periods	Correction of treatments program	Phytosanitary application (products, doses, security period, active ingredients, etc.)

Table 1, continue

Stage	Type of hazard			Hazards	Preventive measures	CCP	Critical limit	Monitoring/ frequency	Corrective measures	Records
	Physical	Chemical	Biological							
7. Harvesting		X	X	Poor hygienic conditions inside the plant	Application of cleaning and disinfection plan				Replacement of phytosanitary products	Incidences and corrective measures
			X	Lack of hygiene in the personnel	Minimize the transit of personnel inside the cultivation plant, and disinfection of the footwear at the entrance				Destruction of the crop when it exceeds the phytosanitary residues allowed for mushroom	
		X	X	Appearance of pests and diseases Contamination by the inadequate quality of irrigation water	Installation of mosquitoes traps Ensure the adequate environment conditions inside the plant Application of granulated chlorine to avoid staining of mushrooms at the beginning of each flush Stop the production at the third flush Ensure the quality of irrigation water					
			X	Use of unauthorized phytosanitary products, or in higher doses than allowed or without respecting the security period	Application of authorized phytosanitary products, in adequate doses and respecting the security period	Yes	Use of authorized phytosanitary products, in adequate doses and respecting the security period	Phytosanitary products, doses and security periods	Correction of treatments program	Phytosanitary application (products, doses, security period, active ingredients, etc.)
			X	Microbiological contamination due to lack of hygiene of manipulators	Application of good hygiene and food manipulation practices				Replacement of phytosanitary products	

Table 1, continue

Stage	Type of hazard			Hazards	Preventive measures	CCP	Critical limit	Monitoring/ frequency	Corrective measures	Records
	Physical	Chemical	Biological							
8. Dispatching			X	Microbiological contamination by poor hygienic and sanitary conditions inside the plant	Minimize the transit of personnel inside the cultivation plant				Destruction of the crop when it exceeds the phytosanitary residues allowed for mushroom	Incidences and corrective measures
		X	X	Microbiological and chemical contamination due to lack of hygiene or presence of residues of cleaning products in the harvesting containers	Application of cleaning and disinfection plan Installation of mosquitoes traps					
				Contamination by consecutive flushes	Post harvesting cleaning After each flush Use of clean containers or disinfected in case they are reused					
8. Dispatching			X	Microbiological contamination of the product	Application of cleaning and disinfection plan Application of good hygiene and food manipulation practices		No			
9. Emptying	X		X	Contamination from other buildings	Quick, careful and refrigerated transport Previous treatment of non empty installations with steam Avoid the transit by nearby buildings Immediate removing after the harvesting of the last flush		No			

Table 1, continue

Stage	Type of hazard			Hazards	Preventive measures	CCP	Critical limit	Monitoring/ frequency	Corrective measures	Records
	Physical	Chemical	Biological							
10. Cleaning and disinfection	X	X	X	Unadequate cleaning of the installations and use of non recommended products (permanence of chemical residues)	Application of an adequate cleaning and disinfection plan Approval of suppliers	No				
11. Authorized compost manager	X	X	X	Contamination of nearby installations	Prohibition of unauthorized products Cubrir con una lona durante su transporte Separated and distant location of cultivation and food manipulation premises Easy acces for loading and unloading Periodic review to prevent leakage or deterioration of containers	No				
12. Reception of auxiliary material (phytosanitary products, containers, supplements, etc.)		X	X	Poor hygienic and sanitary conditions of reception installations	Application of cleaning and disinfection plan	No				
		X	X	Contaminated containers and/or additives Containers breakage and possible leakage of chemicals	Approval of suppliers (demand characteristics and specifications)					
13. Storage of auxiliary material	X	X	X	Poor hygienic and sanitary conditions of installations	Application of cleaning and disinfection plan Fulfill the manufacturer's indications Installations protected from the external environment Adequate stacking	No				

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A identificação das principais variáveis que interferem na produção dos cogumelos *A. bisporus* e *A. subrufescens* é de fundamental importância para compreender as etapas do ciclo de cultivo das espécies, tornando possível a redução do ciclo de produção.

Novas metodologias podem promover maior produtividade, com redução no ciclo de cultivo, viabilizando a realização de um maior número de fluxos de produção ao longo do ano. Tais metodologias permitem a formulação mais adequada para o preparo de camadas de cobertura, a recomendação de melhores condições de cultivo e, conseqüentemente, permitem identificar as principais etapas que podem interferir no ciclo de cultivo e na qualidade do produto final.

O estudo das diferentes variáveis físico-químicas, biológicas e ambientais no ciclo de cultivo de *A. bisporus* e *A. subrufescens* permitiu gerar publicações científicas, participações em eventos científicos nacionais e internacionais, intercâmbio com pesquisadores de instituições de ensino e pesquisa nacionais e internacionais, e o estímulo à pesquisa, à produção, à comercialização e ao consumo dos cogumelos *A. bisporus* e *A. subrufescens*.