

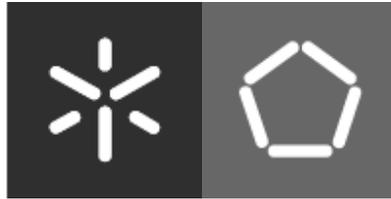
Universidade do Minho

Departamento de Engenharia Biológica

Cláudia Noémia Rocha Pereira

Produção de *Morchella esculenta* e de *Macrolepiota procera* e estudo de novos substratos para a produção de cogumelos saprófitas

Outubro de 2014



Universidade do Minho

Departamento de Engenharia Biológica

Cláudia Noémia Rocha Pereira

Produção de *Morchella esculenta* e de *Macrolepiota procera* e estudo de novos substratos para a produção de cogumelos saprófitas

Dissertação para obtenção do grau de Mestre
Mestrado Integrado em Engenharia Biológica

Trabalho efetuado sob a orientação
Professor Doutor Armando Venâncio
Engenheira Vânia Pinheiro

Outubro de 2014

Autor: Cláudia Noémia Rocha Pereira

e-mail: claudianoemiap@gmail.com

Telefone: +351 914102377

C.C.: 13654515

Título da dissertação: Produção de *Morchella esculenta* e de *Macrolepiota procera* e estudo de novos substratos para a produção de cogumelos saprófitas

Orientador: Professor Doutor Armando Venâncio

Coorientadora: Engenheira Vânia Pinheiro

Ano de conclusão: 2014

Mestrado Integrado em Engenharia Biológica

DE ACORDO COM A LEGISLAÇÃO EM VIGOR, É PERMITIDA A REPRODUÇÃO DE QUALQUER PARTE DESTA TESE/TRABALHO

Universidade do Minho, 15/12/2014

Assinatura: _____

Agradecimentos

A realização deste trabalho contou com o apoio e ajuda de um vasto grupo de pessoas, às quais gostaria de dedicar um sentido agradecimento:

À empresa Bioinvitro, por ter permitido a realização deste trabalho e por toda a experiência que me proporcionou, permitindo a integração nas mais variadas tarefas, resultando num diversificado conhecimento a nível empresarial.

Ao professor Venâncio por ter aceitado orientar a realização deste trabalho.

À Vânia Pinheiro, que permitiu que este estágio fosse possível, por todo o seu apoio incondicional e incansável, pela transmissão de conhecimentos, pelo seu voto de confiança e por todos os bons momentos.

A toda a equipa da Bioinvitro, que me recebeu de braços abertos e me ajudou sempre que necessário, permitindo ultrapassar todas as barreiras que ocorreram ao longo da realização deste estágio. Pelos bons momentos e por me acompanhar neste percurso. Um especial agradecimento à Elsa que me acompanhou na realização da parte prática e me transmitiu o seu conhecimento na realização das tarefas.

Ao meu Home, por todo o companheirismo, paciência e questões sempre pertinentes que impulsionaram o desenvolvimento deste trabalho; pelas horas de partilha e discussão de ideias e conhecimentos; e por todo o apoio incansável.

Ao Simão e à Cláudia pelos seus comentários sempre pertinentes e pelos momentos de boa disposição e descontração. Ao João pela sua sempre disposição em ajudar e à Diana pelo seu contributo incansável, amizade e persistência que só ela tem. Ao Luís pelas suas “peixotices”, imprescindíveis na conclusão deste trabalho. Um sentido obrigada pela vossa colaboração.

À minha família que permitiu a realização deste Mestrado e por todo o apoio. Um especial agradecimento à minha irmã Mariana, pelos seus comentários sempre filosóficos e pela paciência na correção desta dissertação.

A todos vocês, um muito obrigado.

Sumário

Os cogumelos fazem parte da alimentação humana desde tempos primordiais. De facto, aventa-se que assumiriam um papel preponderante na era pré-agrícola, como alimento facilmente disponível na prática recolectora. A produção de cogumelos é uma atividade em expansão que visa um futuro promissor devido à grande viabilidade de negócio, demonstrado pelo aumento da procura por parte dos consumidores, e por todas as suas qualidades nutracêuticas e organoléticas, sendo de todo o interesse o estudo de produção de novas espécies para o mercado.

Numa atualidade em que o *Agaricus bisporus* ocupa o topo da tabela de cogumelos mais comercializados, seguido do *Lentinus edodes* e *Pleurotus ostreatus*, com uma produção conhecida e otimizada, visa-se, com este trabalho, estudar a possibilidade de expandir o mercado destes macrofungos, através da produção de outras espécies de valor económico acrescido.

Os Estados Unidos são, de momento, o maior produtor de *Morchella esculenta*, possuindo a patente de produção deste cogumelo. A produção de *Macrolepiota procera* é, neste momento, desconhecida, sendo um cogumelo bastante comercializado em Portugal mas apenas obtido na forma silvestre. Neste sentido, pretende-se, com este estudo, aferir a produção de *Morchella esculenta* e *Macrolepiota procera*, na possibilidade de atingir a escala industrial.

Deste modo, realizaram-se todas as etapas inerentes à produção de cogumelos, nomeadamente o isolamento e multiplicação do micélio do cogumelo em meio de cultura, produção de *spawn mother*, produção de *spawn* e produção do substrato propriamente dito, visando a produção destas espécies. O crescimento miceliar foi bem-sucedido em todas as etapas, no entanto, o desenvolvimento dos primórdios e a frutificação cruzaram-se com obstáculos difíceis de solucionar, impossibilitando o corpo frutífero.

O presente trabalho teve também como objetivo a otimização da produção de substratos para a produção de outras espécies comercialmente ativas, como *Pleurotus djamor*, *Pleurotus cornucopiae* e *Pleurotus eryngii*. Aborda-se, assim, as condições industriais necessárias para a produção em grande escala de cogumelos saprófitas.

Abstract

Since primordial times mushrooms have been part of the human diet. In fact, they assumed a major role in pre-agricultural era, as food easily accessible by collecting practice. Mushroom production is a growing activity that aims to a promising future due to its business feasibility, constantly demonstrated by consumer's the increased of demand from, as well as all its nutraceutical and organoleptic qualities. Thus, the study of the production of new species, for the market, is of great interest.

Presently *Agaricus bisporus* occupies the top of the table on marketed mushrooms, followed by *Lentinus edodes* and *Pleurotus ostreatus*, with a known and optimized production. With this work this work aims at studying the possibility of expanding the market for these macrofungi, by producing other species of greater economic value.

The United States of America is currently the largest producer of *Morchella esculenta*, owning the patent for this mushroom production. *Macrolepiota procera* production is at present unknown, the mushrooms being commercialized in Portugal are obtained in the wild form. In this economic environment, it is intended with this study to assess the production of *Morchella esculenta* and *Macrolepiota procera*, and the possibility of reaching the industrial scale.

Thus, all steps involved in the production of mushrooms were performed, including the isolation of the mushroom mycelium in culture medium, the mycelium multiplication in culture medium, production of spawn mother, spawn production and production of the substrate itself in order to produce these species.

The mycelial growth was successful in all stages, however, the development of early fruiting found a series of barriers and difficult obstacles to solve, preventing the fruiting body.

This work also aims at optimizing the production of substrates for the production of other commercially active species such as *Pleurotus djamor*, *Pleurotus cornucopiae* and *Pleurotus eryngii*. Therefore, the conditions necessary for the industrial-scale production of saprophytic mushrooms are approached.

Índice

Sumário	ii
Abstract.....	iii
Índice de Figuras	viii
Índice de Tabelas	xii
1. Introdução	1
2. Objetivos do trabalho.....	5
3. Apresentação da empresa Bioinvitro	7
4. O Reino <i>Fungi</i>	9
4.1 Taxonomia	11
4.2 Crescimento e fisiologia.....	12
5. Cogumelos saprófitas	15
5.1 <i>Morchella esculenta</i>	16
5.1.1 Cultivo.....	18
5.2 <i>Macrolepiota procera</i>	21
5.2.1 Cultivo.....	22
5.2.2 Espécies venenosas semelhantes	22
5.3 <i>Pleurotus ostreatus</i>	24
5.4 <i>Pleurotus djamor</i> e <i>Pleurotus cornucopiae</i>	25
5.5 <i>Pleurotus eryngii</i>	27
6. Produção de cogumelos saprófitas	29
6.1 Produção do inóculo.....	30
6.1.1 Instalações: o fator chave para a produção de inóculos	32
6.1.2 Embalagem	34
6.2 Produção de substrato	36
6.2.1 A logística.....	36
6.2.2 Os ingredientes.....	36
6.2.3 Mistura dos ingredientes.....	39
6.2.4 Humidificação do substrato.....	40
6.2.5 Importância da autoclavagem	40
6.2.6 Arrefecimento	42

6.2.7	Inoculação.....	42
6.2.8	Incubação	43
6.2.8.1	Armazenamento dos substratos	43
6.2.8.2	Temperatura.....	44
6.2.8.3	Humidade	44
6.2.8.4	Dióxido de carbono	45
6.2.8.5	Luz	45
6.2.8.6	Limpeza	46
6.2.9	Frutificação.....	46
6.3	Produção em tronco.....	47
7.	Do laboratório à Industrialização.....	48
7.1	Técnicas de construção	49
7.2	Abastecimento de água	50
7.3	Águas residuais.....	50
7.4	Suportes e prateleiras.....	50
7.4.1	Incubação	51
7.4.2	Frutificação.....	52
7.5	Técnicas de frutificação	53
7.5.1	Sistemas de ventilação	53
7.5.2	Sistemas de humidificação	54
7.5.2.1	Pentes de humidificação	54
7.5.2.2	Sistema gota-a-gota	54
7.5.2.3	Sistema de nebulização.....	54
7.5.2.4	Vaporizador de ar comprimido	55
7.5.2.5	Vaporizador ultra sónico	55
7.5.2.6	Disco vaporizador de alta velocidade de rotação	55
7.5.2.7	Vapor para humidificação	56
7.5.2.8	Controlo de humidade	56
7.5.3	Regras de Higiene	56
8.	Pragas, contaminações e outros problemas: prevenção e soluções	58
8.1	Animais.....	60
8.2	Fungos e bolores.....	61
8.3	Bactérias.....	64

8.4	Problemas Químicos	65
8.5	Contaminações técnicas.....	66
9.	Materiais e Métodos.....	67
9.1	Preparação do inóculo.....	68
9.2	Produção do <i>spawn mother</i>	70
9.3	Produção do <i>spawn</i>	70
9.3.1	Qualidade do <i>spawn</i>	71
9.4	Produção de substrato de <i>Morchella esculenta</i>	73
9.5	Produção do substrato de <i>Macrolepiota procera</i>	77
9.6	Produção de substratos com lamas de ETAR	79
9.7	Produção de substratos com resíduos de algodão.....	82
9.8	Produção de outros substratos	83
9.8.1	<i>Pleurotus eryngii</i>	84
9.8.2	<i>Pleurotus djamor</i> e <i>Pleurotus cornucopiae</i>	85
9.9	. Inoculação em troncos de madeira	87
10.	Resultados e Discussão.....	89
10.1	<i>Morchella esculenta</i>	90
10.1.1	Placas	90
10.1.2	<i>Spawn mother</i> e <i>Spawn</i>	90
10.1.3	Substratos.....	92
10.1.4	Indução dos primórdios e Frutificação.....	94
10.1.4.1	Indução dos primórdios através de choque de humidade.....	95
10.1.4.2	Indução dos primórdios através de exposição ao ar.....	96
10.1.4.3	Indução dos primórdios através de choque térmico	96
10.1.4.4	Indução dos primórdios com camada de matéria orgânica.....	97
10.2	<i>Macrolepiota Procera</i>	98
10.2.1	Placas	98
10.2.2	<i>Spawn mother</i> e <i>Spawn</i>	98
10.2.2.1	Autólise.....	100
10.2.3	Substratos.....	100
10.2.4	Inoculação em troncos de madeira	107
10.3	Produção de substratos com lamas de ETAR	109
10.4	Produção de substratos com resíduos de algodão.....	111

10.5	Produção de novos substratos	112
10.5.1	Produção de <i>Pleurotus djamore</i> e <i>Pleurotus cornucopiae</i>	112
10.5.2	Produção de <i>Pleurotus eryngii</i>	115
11.	Conclusões	117
12.	Perspetivas	120
	Bibliografia	122
	Anexos	129
	Anexo I: Caracterização dos resíduos de algodão	i
	Anexo II: Caracterização das lamas de ETAR	iii

Índice de Figuras

Figura 1: Representação dos tipos de fungos existentes, de acordo com a sua alimentação.	2
Figura 2: Bioinvitro Biotecnologia, Lda.	8
Figura 3: Ciclo de reprodução de um cogumelo.	13
Figura 4: <i>Morchella esculenta</i>	16
Figura 5: Espécies semelhantes fisicamente. a) <i>Morchella esculenta</i> ; b) <i>Morchella cónica</i> ; c) <i>Morchella gigas</i> ; d) <i>Gyromitra esculenta</i> ; e) <i>Verpa bohemica</i>	18
Figura 6: Ciclo de vida da <i>Morchella esculenta</i>	19
Figura 7: <i>Macrolepiota procera</i>	21
Figura 8: Proporções da composição nutricional do <i>M. procera</i>	22
Figura 9: <i>Chlorophyllum molybdites</i>	23
Figura 10: <i>Macrolepiota venenata</i>	23
Figura 11: <i>Lepiota brunneoincarnata</i>	24
Figura 12: <i>Pleurotus ostreatus</i>	24
Figura 13: a) <i>Pleurotus djamor</i> ; b) <i>Pleurotus cornucopiae</i>	25
Figura 14: <i>Pleurotus eryngii</i> ; a) indução dos primórdios; b) desenvolvimento dos primórdios; c) Frutificação.	27
Figura 15: Ciclo de produção de inóculos de cogumelos saprófitas.	31
Figura 16: Representação esquemática do rendimento de cada etapa na obtenção de inóculo na produção de cogumelos em substrato.	32
Figura 17: Representação esquemática do rendimento de cada etapa na obtenção de inóculo na produção de cogumelos em tronco.	32
Figura 18: Exemplo de um plano de infraestruturas para um laboratório de produção de <i>spawn</i>	33
Figura 19: Antecâmaras para as salas limpas.	34
Figura 20: Evolução do recipiente de <i>spawn</i>	34
Figura 21: Sacos de <i>spawn</i>	35
Figura 22: Representação das trocas gasosas realizadas nos filtros dos sacos utilizados na produção de <i>spawn</i> e substratos.	35
Figura 23 – Exemplo de um fato para ser utilizado na inoculação de substratos.	43

Figura 24: Temperatura ao longo do tempo num processo de autoclavagem.....	41
Figura 25: Cavilhas.....	47
Figura 26: a) Carrinho dinamarquês; b) Caixas empilháveis; c) Prateleiras de madeira; d) construções individuais de prateleiras com rodas.....	52
Figura 27: Prateleiras e suportes utilizados na frutificação. a) Prateleiras de tubos metálicos, utilizados na frutificação; b) Prateleiras de madeira; c) Prateleiras holandesas de botão branco; d) Prateleiras de aço usados no sistema de frascos.....	53
Figura 28: Vaporizador ultra sónico.	55
Figura 29: Disco vaporizador de alta velocidade de rotação.	55
Figura 30: Limpeza do chão.....	57
Figura 31: <i>Neurospora crassa</i>	63
Figura 32: Diferentes fungos que contaminam os substratos.	64
Figura 33: Exemplos de cogumelos contaminados com bactérias. a) <i>Pleurotus eryngii</i> ; b) <i>Pleurotus ostreatus</i> ; c) <i>Lentinus edodes</i>	64
Figura 34: <i>Lentinus edodes</i> com problemas químicos.....	65
Figura 35: Preparação do meio de cultura para a preparação do inóculo.....	69
Figura 36: Isolamento do cogumelo. a) <i>Macrolepiota procera</i> silvestre; b) Abertura do cogumelo em meio de assepsia; c) Corte da parte interior do chapéu; d) Colocação da porção retirada numa placa de Petri.....	69
Figura 37: a) Trigo humedecido; b) <i>Spawn mother</i> antes de esterilização.....	70
Figura 38: Representação esquemática das várias etapas inerentes à produção de <i>spawn</i>	71
Figura 39: Contaminações. a) Bactéria; b) Fungo.....	72
Figura 40: Representação dos substratos realizados de <i>Morchella esculenta</i> . a) Sem barreira; b) com barreira de alumínio.....	74
Figura 41: Substratos de <i>Morchella esculenta</i>	77
Figura 42: Seis substratos distintos, realizados em duplicado, inoculados com <i>Macrolepiota procera</i>	79
Figura 43: Preparação de substratos com lamas de ETAR.	81
Figura 44: Substratos de <i>Pleurotus eryngii</i>	85
Figura 45: Isolamento de <i>pellets</i> de <i>Macrolepiota procera</i> em placa de Petri com meio PDA.	87
Figura 46: Perfuração e Inoculação dos troncos.	88

Figura 47: Micélio de <i>Morchella esculenta</i>	90
Figura 48: <i>Spawn mother</i> de <i>Morchella esculenta</i>	91
Figura 49: <i>Spawn</i> de <i>Morchella esculenta</i>	91
Figura 50: Substratos de <i>Morchella esculenta</i>	92
Figura 51: Esclerócios.	93
Figura 52: Substrato de <i>Morchella esculenta</i> contaminado.	95
Figura 53: Substrato de <i>Morchella esculenta</i>	96
Figura 54: Isolamento do cogumelo <i>Macrolepiota Procera</i> . a) Tempo 0; b) 1 semana; c) 3 semanas; d) 4 semanas.....	98
Figura 55: Multiplicação em placa do cogumelo <i>Macrolepiota procera</i>	98
Figura 56: <i>Spawn mother</i> de <i>M. procera</i> ; a) tempo 0; b) 3 semanas; c) 6 semanas.....	99
Figura 57: Desenvolvimento do <i>spawn</i> ao longo do tempo. a) 1 semana; b) 2 semanas; c) 3 semanas; d) 4 semanas.....	99
Figura 58: <i>Spawn</i> de <i>Macrolepiota procera</i> envelhecido.....	100
Figura 59: Substrato 1.1 de <i>Macrolepiota procera</i> . a) 1 semana; b) 2 semanas; c) 4 semanas.....	101
Figura 60: Substrato 1.2 de <i>Macrolepiota procera</i> . a) 1 semana; b) 2 semanas; c) 4 semanas.....	101
Figura 61: Proliferação do micélio em contorno do <i>spawn</i>	101
Figura 62: Substrato 2.2 de <i>Macrolepiota procera</i> . a) 1 semana; b) 2 semanas; c) 4 semanas.....	101
Figura 63: Substrato 2.1 de <i>Macrolepiota procera</i> . a) 1 semana; b) 2 semanas.	101
Figura 64: Substrato 3.1 de <i>Macrolepiota procera</i> . a) 1 semana; b) 2 semanas; c) 4 semanas.....	102
Figura 65: Substrato 3.2 de <i>Macrolepiota procera</i> . a) 1 semana; b) 2 semanas; c) 4 semanas.....	102
Figura 66: Substrato 4.1 de <i>Macrolepiota procera</i> . a) 1 semana; b) 2 semanas; c) 4 semanas.....	103
Figura 67: Substrato 4.2 de <i>Macrolepiota procera</i> . a) 1 semana; b) 2 semanas; c) 4 semanas.....	103
Figura 68: Substrato 5.1 de <i>Macrolepiota procera</i> . a) 1 semana; b) 2 semanas; c) 4 semanas.....	103

Figura 69: Substrato 5.2 de <i>Macrolepiota procera</i> . a) 1 semana; b) 2 semanas; c) 4 semanas.....	103
Figura 70: Substrato 6.1 de <i>Macrolepiota procera</i> . a) 1 semana; b) 2 semanas; c) 4 semanas.....	104
Figura 71: Substrato 6.2 de <i>Macrolepiota procera</i> . a) 1 semana; b) 2 semanas; c) 4 semanas.....	104
Figura 72: Substrato exposto de <i>Macrolepiota procera</i>	104
Figura 73: Comportamento do fungo <i>Macrolepiota procera</i> ao fim de 6 semanas. ...	105
Figura 74: Micélio de <i>Macrolepiota procera</i> perfeitamente desenvolvido, com o aparecimento de massas miceliares.	105
Figura 75: Representação esquemática resumindo as ações e resultados dos substratos de <i>Macrolepiota procera</i>	106
Figura 76: <i>Pellets</i> inoculados com <i>Macrolepiota procera</i>	107
Figura 77: Cavilhas inoculadas com <i>spawn mother</i> de <i>Macrolepiota procera</i> . a) Sem encharcamento de água no momento de esterilização e arrefecimento; b) Com encharcamento.....	108
Figura 78: Crescimento micelial do isolamento de <i>pellets</i> de <i>Macrolepiota procera</i> em placa de Petri com meio PDA.	109
Figura 79: Substratos de lamas de ETAR para a produção de <i>Pleurotus ostreatus</i>	110
Figura 80: Crescimento micelial do <i>Pleurotus djamor</i>	112
Figura 81: Substratos inoculados com <i>Pleurotus</i> . a) e b) <i>Pleurotus djamor</i> ; c) d) <i>Pleurotus cornucopiae</i>	113
Figura 82: Substratos realizados à base de palha. a) <i>Pleurotus djamor</i> , com filtros em contacto com o substrato b) <i>Pleurotus djamor</i> com os filtros na parte superior do saco; c) <i>Pleurotus cornucopiae</i>	114
Figura 83: Frutificação do <i>Pleurotus cornucopiae</i>	114
Figura 84: Produção de <i>Pleurotus eryngii</i> . a) Placa de micélio; b) <i>Spawn mother</i> ; c) <i>Spawn</i> ; d) Frutificação.	115

Índice de Tabelas

Tabela 1: Valor nutricional, de <i>Morchella esculenta</i> , numa base de 100 g. Energia, <i>E</i> , e massa, <i>m</i> , dos diversos componentes.....	17
Tabela 2: Características dos primórdios e do cogumelo <i>Pleurotus ostreatus</i> , <i>P. cornucopiae</i> e <i>P. djamor</i> . Temperatura (<i>T</i>) tempo (<i>t</i>), humidade (<i>H</i>), necessidade de luz, e concentração de CO ₂	25
Tabela 3: Condições para o desenvolvimento do cogumelo <i>Pleurotus eryngii</i>	28
Tabela 4: Capacidade de retenção de água, <i>R</i> , de algumas matérias-primas.....	38
Tabela 5: Período de incubação de <i>Lentinus edodes</i> e frutificação de acordo com o tipo de madeira Tempo de incubação (<i>ti</i>), tempo de frutificação (<i>tf</i>).....	47
Tabela 6: Pragas, contaminações e outros problemas: prevenção e soluções.....	59
Tabela 7: Produção de substrato do Ensaio 1 de <i>Morchella esculenta</i> . Caracterização do solo rico e do solo pobre Composição, <i>C</i> , em percentagem, de volume do constituinte face ao volume do substrato total. Indicação do pH de cada substrato e da humidade relativa, <i>HR</i> , em percentagem.....	74
Tabela 8: Composição dos 4 ensaios 1 dos substratos de <i>Morchella esculenta</i> . Composição, <i>C</i> , em percentagem, de volume do constituinte face ao volume do substrato total	75
Tabela 9: Produção de substrato do Ensaio 2 de <i>Morchella esculenta</i> . Caracterização do solo rico e do solo pobre. Composição, <i>C</i> , em percentagem, de volume do constituinte face ao volume do substrato total. Indicação do pH de cada substrato e da humidade relativa, <i>HR</i> , em percentagem.....	75
Tabela 10: Composição do ensaio 2 dos substratos de <i>Morchella esculenta</i> . Composição, <i>C</i> , em percentagem, de volume do constituinte face ao volume do substrato total	76
Tabela 11: Produção de substrato do Ensaio 3 de <i>Morchella esculenta</i> . Caracterização do solo rico e do solo pobre. Composição, <i>C</i> , em percentagem, de volume do constituinte face ao volume do substrato total	76
Tabela 12: Composição ensaios 3 dos substratos de <i>Morchella esculenta</i> . Composição, <i>C</i> , em percentagem, de volume do constituinte face ao volume do substrato total	77
Tabela 13: Composição, <i>C</i> , em percentagem do volume do constituinte face ao volume total do substrato, dos 6 substratos de <i>Macrolepiota procera</i> com indicação do pH e da humidade relativa, <i>HR</i> , em percentagem	78

Tabela 14: Composição, C, em percentagem do volume do constituinte face ao volume total do substrato, dos 4 substratos com lamas de ETAR inoculados com <i>Pleurotus ostreatus</i>	80
Tabela 15: Composição, C, em percentagem do volume do constituinte face ao volume total do substrato, dos 7 substratos com resíduos de algodão inoculados com <i>Macrolepiota procera</i> , com indicação do pH e humidade relativa, HR, de cada um dos substratos realizados.....	83
Tabela 16: Constituição de substratos para várias espécies de cogumelos (PO: <i>Pleurotus ostreatus</i> ; LE: <i>Lentinus edodes</i> ; PE: <i>Pleurotus eryngii</i> ; PN: <i>Pholiota nameko</i> ; FV: <i>Flammulina velutipes</i> ; HT: <i>Hipsyzigus tessulatus</i> ; HE: <i>Hericium erinaceus</i> ; GF: <i>Griffola frondosa</i> ; AG: <i>Agrocybe aegerita</i>), disponibilizada pela empresa Mycelia	84
Tabela 17: Constituição de substratos para a produção de <i>Pleurotus eryngii</i>	85
Tabela 18: Substratos de <i>Pleurotus djamor</i> e <i>Pleurotus cornucopiae</i>	86
Tabela 19: Resumo do procedimento efetuado na produção de substratos de <i>Morchella esculenta</i> , indicando o modo de indução dos primórdios e a respetiva frutificação.....	94
Tabela 20: Resultados obtidos na produção de substratos de <i>Macrolepiota procera</i> com resíduos de algodão.....	111
Tabela 21: Peso dos cogumelos obtidos, kg, e indicação do rendimento do peso dos cogumelos face ao peso do substrato	115

1. Introdução

No decorrer dos anos, a apanha dos cogumelos silvestres sempre ocupou um lugar de destaque na forma de obtenção de cogumelos. Os cogumelos silvestres são bastante procurados nas matas e florestas, principalmente no Outono e Primavera, uma vez que as condições ambientais são mais abundantes. No entanto, a procura de cogumelos por parte dos consumidores surge todo o ano. Assim, os cogumelos obtidos de forma silvestre não são suficientes para satisfazer as necessidades comerciais [1].

Os fungos primam na natureza pelo seu papel essencial na decomposição da matéria orgânica e nas trocas e ciclos de nutrientes [2]. São conhecidas cerca de 100 000 espécies, mas possivelmente existem 1 500 000 espécies de fungos, o que corresponde a cerca de um quarto da biomassa terrestre e são encontrados em praticamente todos os lugares [1].

Os fungos são constituídos por hifas, que são estruturas longas, filamentosas e ramificadas e ao conjunto destas estruturas dá-se o nome de micélio. O micélio desenvolve-se num substrato específico, pois cada micélio tem necessidades diferentes de nutrientes. De acordo com a sua alimentação, os fungos podem ser caracterizados tal como indicado na Figura 1.

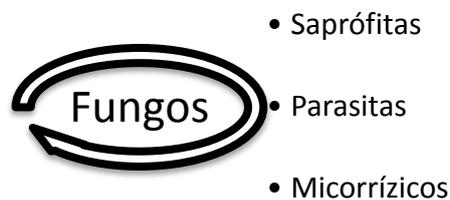


Figura 1: Representação dos tipos de fungos existentes, de acordo com a sua alimentação.

Os fungos saprófitas alimentam-se de matéria orgânica morta. Os parasitas, por sua vez, alimentam-se de organismos vivos, danificando-os, pelo que, normalmente, não são desejáveis. Relativamente aos fungos micorrízicos, estes estabelecem uma relação de simbiose com outro organismo para benefício mútuo. Assim, auxiliam as raízes das plantas na absorção da água e minerais do solo, aumentando a sua superfície de absorção e, em troca, absorvem da planta compostos que não têm capacidade de sintetizar. Esta relação de simbiose é benéfica na Natureza, mas dificulta a produção industrial destas espécies de cogumelos, como o *Boletus edulis* e o *Lactarius deliciosus*, espécies apreciadas e procuradas, com valor económico elevado comparativamente a outras espécies comercializadas, mas que são obtidas apenas sazonalmente, pois encontram-se diretamente dependentes das condições atmosféricas. Assim,

apenas é possível intensificar o seu aparecimento nos povoamentos adultos, onde as características de conformação já estejam definidas e orientadas. Deste modo, a produção industrial de cogumelos apenas é possível para os cogumelos saprófitas, visto alimentarem-se de matéria orgânica morta [1].

Através da presença de enzimas extracelulares, os fungos saprófitas têm a capacidade de crescer em praticamente qualquer tipo de substrato, tais como combustíveis, ácidos, tintas, têxteis, rochas, entre outros. No entanto, a grande maioria dos substratos são geralmente fibras naturais e tecidos, como madeira, graminha, estrume, grão, tecido animal, fruta, entre outros. Cada espécie de cogumelo tem um rendimento maior num substrato adequado ao seu crescimento, sendo, assim, essencial aferir qual o substrato de cada espécie, de modo a obter o máximo de rentabilidade neste tipo de produção [3].

A produção de cogumelos a nível mundial encontra-se maioritariamente na China e incide-se mais na espécie *Agaricus bisporus* [4]. Em Portugal, a produção de cogumelos é uma atividade em expansão, e tal como na China, a espécie mais produzida é a *A. bisporus*, mercado este que é monopolizado. A produção por pequenos produtores centra-se nas espécies *Pleurotus ostreatus* e *Lentinus edodes*. A procura de cogumelos, assim como a procura de espécies diferentes por parte dos consumidores, aumentou devido às suas qualidades nutracêuticas e organolépticas. Para acompanhar o aumento da procura, nomeadamente de espécies diferenciadas, é necessário a criação de novas unidades de produção de cogumelos organizadas, bem estruturadas, com técnicas, instalações e condições ambientais adequadas [5].

Muito importante, ainda, será a criação de associações de produtores, plataformas de entrega e recolha de cogumelos, organização e controlo da produção, sendo necessário torná-la uniforme a nível geográfico e haver uma regulamentação de preços. Existe unicamente um regulamento (CE) n° 982/2002 de 7 de Junho de 2002, que estabelece a norma de comercialização aplicável aos cogumelos, mas este diz respeito unicamente à espécie *A. bisporus*. A 24 de Setembro de 2009, saiu o Decreto de Lei n°254/2009, relativo ao uso da autorização concedida pela Lei n°36/2009 de 20 de Julho, aprovando o Código Florestal, onde se pode ler “ (...) da importância ecológica, social e cultural, impõe normas e medidas especiais de planeamento (...) florestais, a colheita e transporte de cogumelos silvestres para consumo humano, bem como o armazenamento (...)” regulamentando minimamente os cogumelos silvestres. No entanto, foi

revogada pela Lei nº12/2012 de 13 de Março de 2012, eliminando assim qualquer legislação que abrange qualquer outra espécie à exceção do *A. bisporus*. Neste momento, os cogumelos são classificados como produtos hortícolas, causando, conseqüentemente, o mau manuseamento destes por parte dos comerciantes.

Para a produção de cogumelos ser possível é necessário seguir uma série de etapas, desde a produção do inóculo, que inicia a cadeia produtiva até à produção de cogumelos propriamente dita, passando pelas exigências necessárias nas instalações.

2. Objetivos do trabalho

O presente trabalho tem como objetivo o desenvolvimento de todas as etapas inerentes à produção de cogumelos, tendo como alvo principal as espécies *Morchella esculenta* e *Macrolepiota procera*. Pretende-se que este estudo abranja todo o processo geral de produção de cogumelos, tendo como objetivo final a produção em grande escala das espécies em questão.

Em simultâneo, pretende-se um estudo de otimização da produção de substratos para outras espécies, nomeadamente *Pleurotus djamor*, *Pleurotus cornucopiae* e *Pleurotus eryngii* de forma a permitir a sua produção à escala industrial.

3. Apresentação da empresa Bioinvitro

O presente trabalho foi desenvolvido na empresa Bioinvitro Biotecnologia, Lda. A empresa iniciou a sua atividade em Setembro de 2010, estando sediada no norte de Portugal na Travessa D. Afonso Henriques, n.º 59/75, 4585-322 Gandra, Paredes. Atualmente encontra-se na Rua do Pindelo, em Árvore, Vila do Conde.



Figura 2: Bioinvitro Biotecnologia, Lda.

A Bioinvitro é uma empresa pioneira na área da micologia, intervindo em diferentes áreas de negócio, desde o apoio técnico personalizado aos produtores, à transformação de cogumelos em produtos de valor acrescentado.

Na atualidade, é uma referência no mercado nacional em 4 vertentes distintas de negócio, nomeadamente, na vertente de produção de plantas, realizando a multiplicação de espécies e variedades selecionadas; dos inóculos de cogumelos, produzindo e comercializando inóculos e substratos de cogumelos saprófitas e silvestres de elevada rentabilidade; dos transformados, com a produção e comercialização de cogumelos frescos, desidratados e transformados em produtos de valor acrescentado; assim como na prestação de serviços personalizados, conforme as necessidades dos produtores agroflorestais, como todo o apoio técnico e consultoria prestados aos produtores de cogumelos.

A empresa tem preparado o lançamento dos seus produtos noutros mercados europeus, nomeadamente, em Espanha, Itália e Alemanha, assim como nos mercados da América latina.

Detém como objetivo obter o melhor para os seus produtos e, por conseguinte, para os seus clientes, possuindo assim diversas parcerias com diferentes universidades e institutos. Para além disso, os seus administradores têm intenção de implementar brevemente a NPEN ISO 9001:2008, estando também em fase de inicial as certificações biológica dos produtos e segurança e higiene alimentar (HACCP).

De acordo com a filosofia base da Bioinvitro, todos os produtos são analisados por entidades externas certificadas. O desenvolvimento de novos produtos passa por uma estreita colaboração da equipa de I&D, tendo sempre como preocupação o seu aperfeiçoamento, de acordo com os resultados obtidos em inquéritos. Deste modo e mantendo a filosofia, a empresa desenvolve produtos de acordo com as necessidades dos seus clientes.

4. O Reino *Fungi*

No século XX houve um grande aumento de população mundial, passando de 1,6 para 6 mil milhões de pessoas. Esta rápida e contínua expansão da população humana no planeta traduziu-se num aumento de cerca de 80 milhões de pessoas por ano, encontrando-se atualmente cerca de 800 milhões de pessoas em situação de pobreza. Por conseguinte, constatou-se que mais de 70 % das explorações agrícolas e florestais não estão na sua produtividade máxima, e grande parte dos alimentos são desperdiçados no seu processamento. [6].

Apesar da tecnologia moderna permitir ao Homem expandir o seu conhecimento, o rápido aumento da população expõe problemas graves, tais como a escassez de alimentos, a poluição do meio ambiente e a diminuição da qualidade da saúde pública [6]. Desta forma, surge uma resposta de apoio aos problemas apresentados: os macrofungos. Estes produzem estruturas reprodutoras macroscópicas como os cogumelos e são visíveis a “olho nu”, ou seja, possuem dimensões superiores a 1 mm [7].

Os macrofungos, mais especificamente os cogumelos, surgem naturalmente nas matas, florestas, quintais, caminhos, desde que possuam boas condições ambientais específicas para cada espécie, assim como o respetivo alimento. Os cogumelos alimentam-se por absorção e acabam por ser os grandes recicladores do nosso planeta, tornando moléculas orgânicas em moléculas mais simples. Sendo assim, podem converter os enormes desperdícios de biomassa lignocelulósica em alimento, numa área relativamente pequena, normalmente num curto espaço de tempo e em épocas sazonais. Devido às suas propriedades medicinais, os cogumelos também podem ser utilizados na indústria farmacêutica, para a produção de compostos que beneficiam o sistema imunitário [7] [1].

Desta forma, os cogumelos assumem um papel fundamental ao nível do equilíbrio dos ecossistemas, contribuindo para a reciclagem da matéria orgânica, eliminando as espécies vegetais menos saudáveis e favorecendo o estabelecimento das espécies vegetais em condições adversas, através de relações de simbiose [8]. Estas relações que se estabelecem entre os fungos e as raízes das plantas são igualmente importantes na manutenção da fitossanidade do sistema, protegendo as espécies vegetais de agentes patogénicos [1].

Os cogumelos lenhosos alimentam-se de substratos à base de madeira. Os fungos convertem ingredientes naturais, como a celulose, em outros tecidos, como, por exemplo, a quitina. A matéria orgânica ideal para o aparecimento de cogumelos lenhosos é composta por azoto e

hidratos de carbono suficientes para o rápido crescimento dos cogumelos. Estes macrofungos são um pouco mais seletivos do que os outros fungos, na medida em que o tamanho do corpo de frutificação exige a disponibilidade de outros nutrientes, que não são necessários para a produção assexuada de esporos por microfungos [9].

Em lugares húmidos, como florestas tropicais, a humidade abundante resulta numa alta formação de cogumelos, podendo desta forma, ser recolhidos na maioria das épocas do ano. Em regiões mais secas, o crescimento destes fungos ocorrem somente após chuvas sazonais. Nestes ecossistemas o surgimento dos cogumelos está normalmente associado às estações do ano do outono, verão e primavera. São poucos os cogumelos que são produzidos durante os meses frios do inverno, embora existam corpos de frutificação que resistem durante este período, tal como a espécie *Lepista nuda*, conhecido como o pé azul [1].

A formação de corpos de frutificação do cogumelo depende muito do padrão das chuvas e, em alguns anos, a frutificação do cogumelo pode ser praticamente ausente [10]. [9].

4.1 Taxonomia

Todos os seres vivos existentes na Terra estão organizados por reinos, nomeadamente o reino *Animalia*, *Plantae*, *Monera*, *Protista* e *Fungi*. O reino *Animalia* engloba organismos pluricelulares, compostos por diversas células e heterotróficos, em que dependem de outros seres vivos ou matéria orgânica para obter a energia e os nutrientes que necessitam. O reino *Plantae* inclui seres pluricelulares que possuem células revestidas por uma membrana de celulose e são autotróficos, sendo capazes de produzir o seu próprio alimento. O Reino *Monera*, por sua vez, aglomera os seres unicelulares e procariontes, em que as células não possuem uma membrana nuclear individualizadas, como as bactérias. O reino *Protista* diz respeito aos seres unicelulares, compostos por apenas uma célula e eucariontes com uma membrana nuclear individualizada, englobando os protozoários. Por fim, o reino *Fungi*, por sua vez, resume-se num grupo de organismos eucariotas e heterotróficos, englobando as leveduras, os bolores, assim como os cogumelos [11].

Inicialmente, os fungos encontravam-se inseridos no reino das plantas, no entanto, estes diferenciam-se essencialmente por não possuírem clorofila, pela presença de quitina (polímero da N-acetil-D-glicosamina) e ausência de celulose nas suas paredes celulares. Os fungos não

armazenam amido como substância de reserva, não se movimentam e a sua digestão da matéria orgânica é extracelular, propagando-se através de esporos [12].

No entanto, a evolução das plantas está tão profundamente relacionada com a dos fungos, que de certa forma pode dizer-se que estes grupos evoluíram em conjunto. Por este motivo, algumas espécies de fungos podem ser exclusivas de determinado habitat e/ou associarem-se apenas a uma espécie vegetal, enquanto outras podem ser menos exigentes quanto a requisitos de habitat ou espécies hospedeiras [13].

Comparativamente ao reino animal, os fungos não possuem os sistemas nem os órgãos especializados característicos e não partilham da sua mobilidade estando geralmente limitados num substrato (por exemplo no solo, em troncos, restos vegetais e animais). Para se sustentarem adotaram diversas estratégias nutricionais podendo alimentar-se dos nutrientes que extraem da decomposição dos substratos que colonizam, parasitar animais e/ou plantas para conseguirem retirar os nutrientes essenciais para o seu metabolismo, ou estabelecer relações de simbiose com as plantas, facilitando a absorção de água e nutrientes para a planta e recebendo em troca os nutrientes de que necessitam [13].

As estruturas reprodutoras, diferenciadas no ciclo de vida dos cogumelos, assim como o tipo de hifas, permitem classificar os fungos em diferentes agrupamentos. O cogumelo diferencia-se fisicamente de acordo com o grupo taxonómico a que pertence, no entanto, há algumas características que geralmente são comuns, nomeadamente o chapéu que consiste na parte superior do cogumelo, que apresenta a parte fértil, ou seja, a estrutura onde se produzem os esporos. Esta estrutura está, normalmente, voltada para baixo, para facilitar a libertação e dispersão dos esporos, quando estão maduros. O pé, que pode ser fibroso ou carnudo, encontra-se parcialmente enterrado no substrato e suporta o chapéu [9].

4.2 Crescimento e fisiologia

Um dos parâmetros que encaminham os fungos para o seu próprio reino é a reprodução. O fungo passa por uma série de transformações que asseguram a sua continuidade através de métodos de reprodução que podem ser sexuais ou assexuais.

O crescimento dos fungos inicia-se quando há a libertação dos esporos por parte do cogumelo na fase adulta. Perante um ambiente apropriado, os esporos colonizam os substratos através da

extração eficiente de nutrientes, através do desenvolvimento de hifas ao longo de todo o substrato, que consistem em estruturas longas, filamentosas e ramificadas. São células longas cilíndricas com vários núcleos ou septadas, onde cada célula pode ter vários núcleos. Além da fixação ao substrato, as hifas têm a função de reprodução e digestão extracelular. O crescimento total do micélio pode exceder um quilómetro por dia, podendo resultar num corpo de frutificação. As hifas iniciam-se como formações tubulares que, a partir de esporos, se ramificam continuamente formando uma rede mais ou menos densa de filamentos que se domina de micélio. O aspeto filamentososo do micélio confere-lhe uma grande superfície, através da qual se realiza a absorção de nutrientes. Esta rede de filamentos estende-se rapidamente em todas as direções através da fonte de alimento. Por vezes as hifas organizam-se formando corpos compactos como, por exemplo, os cogumelos [14].

Na Figura 3 pode-se observar que, após o desenvolvimento do micélio segue-se o aparecimento dos primórdios, que consiste numa biomassa, um aglomerado de micélio que inicia o seu desenvolvimento macroscópico, que é a fase de pré frutificação. Normalmente, o surgimento desta fase está inerente à frutificação, pelo que, obtendo-se os primórdios é uma ótima indicação para o sucesso da fase seguinte: a obtenção do cogumelo propriamente dito.



Figura 3: Ciclo de reprodução de um cogumelo.

O desenvolvimento do fungo está diretamente relacionado com a atividade enzimática, que necessita de requisitos específicos para um bom funcionamento. Quando as condições são ótimas, o crescimento será máximo e quando não o são, o crescimento vai sendo cada vez mais lento acabando por parar e eventualmente o ser vivo não sobrevive. Diferentes tipos de enzimas têm diferentes necessidades, sendo a temperatura um dos fatores principais na produção de

cogumelos, assim como o pH, a humidade do substrato, a concentração dos diferentes gases disponíveis, entre outros [14].

O aumento de temperatura pode ser benéfico para o crescimento do organismo, contudo a uma determinada temperatura, as proteínas desnaturam. Cada enzima tem uma temperatura e pH ótimos de funcionamento. Para a maioria das enzimas presentes nos fungos, o pH ótimo situa-se entre 6 e 7 [14].

Os organismos também necessitam de água para o seu metabolismo, logo, na ausência de água, a maioria dos organismos não sobrevive, apesar das necessidades de cada um serem distintas. No que diz respeito aos cogumelos, tanto a humidade do substrato como do ar são importantes, sendo que num substrato que contenha menos de 40 % e mais de 75 % de água, o crescimento de micélio é difícil [14].

Relativamente ao oxigénio, quando é escasso, alguns organismos trocam a respiração, que é um processo aeróbio, pela fermentação, que consiste num processo anaeróbio. A fermentação é menos benéfica para o organismo quando este normalmente necessita de oxigénio para sobreviver. Por exemplo, a molécula de glucose em condições aeróbias rende 38 unidades de energia, enquanto a mesma molécula em condições de anaerobiose, rende apenas duas unidades de energia. Alguns organismos, incluindo as leveduras e algumas bactérias, conseguem sobreviver tanto em condições aeróbias como anaeróbias. Quando a concentração de oxigénio é baixa, estes organismos desenvolvem-se com um bom rendimento. No caso dos micélios produtores de cogumelos, o crescimento é impossível quando a concentração de oxigénio no substrato é demasiado baixa e a concentração de dióxido de carbono é demasiado alta, variando estes valores conforme a espécie [15].

5. Cogumelos saprófitas

Os fungos saprófitas podem ser benéficos para o meio ambiente, pois, como referido, têm a capacidade de converter a matéria orgânica em matéria mais fácil de metabolizar por outros organismos. Podem também reutilizar matéria morta e inutilizável, dando origem a produtos benéficos e de valor comercial [1].

A designação de fungos saprófitas está associada ao cultivo de fungos em substratos e em troncos de madeira. Dentro deste grupo, existem espécies que têm necessidades nutricionais diferentes e apenas sobrevivem em determinadas condições [16].

Esta é, assim, uma área de grande interesse, tratando-se dum processo de tornar matérias-primas com pouco ou nenhum valor comercial em produtos de interesse e valor comercial, associado a todas os benefícios que tem para a saúde.

De seguida, incidir-se-á na produção de algumas das espécies saprófitas com interesse comercial, nomeadamente a espécie *Morchella esculenta*, cuja produção é conhecida, mas não alcançada por todos, a espécie *Macrolepiota procera* cuja produção é desconhecida, surgindo apenas de forma silvestre e das espécies *Pleurotus eryngii*, *Pleurotus djamor* e *Pleurotus cornucopiae*, cuja produção é dominada, tendo-se como objetivo a obtenção do cogumelo. Abordar-se-á também o *Pleurotus ostreatus* devido à sua rápida proliferação, na tentativa deste crescer em substratos sem valor comercial, nomeadamente em lamas de ETAR e em resíduos de algodão.

5.1 *Morchella esculenta*

Diferenciada pela sua aparência altamente polimórfica, tal como visualizado na Figura 4, e pelo seu característico sabor, a *Morchella esculenta* é uma das espécies economicamente relevantes. Localmente conhecida como Pantorra, esta pode ser encontrada, comumente, nas florestas com 1800 m a 3600 m de altitude, em lugares bem iluminados, florestas folhosas e florestas que tenham sido recentemente ardidas, surgindo sazonalmente entre Março e Junho [17] [18].

A espécie *M. esculenta* pode ter uma coloração variável, assim como o seu tamanho que pode variar entre os 3 cm e os 15 cm. A parte superior do fungo aparenta semelhanças a uma colmeia, com a



Figura 4: *Morchella esculenta*. Adaptado de [48].

presença de alvéolos irregulares [17].

Na Tabela 1 podem ser visualizados os valores nutricionais desta espécie, que impulsionam o interesse do seu consumo, sendo muito apreciada pelo seu valor culinário, com muita reputação na gastronomia internacional. Com todas as suas características, pode ser usada na indústria farmacêutica e na medicina tradicional [19]. Desta forma, é desejável conseguir alcançar métodos para o seu cultivo, no entanto, é muito difícil obter os corpos frutíferos em cultura [20]. A sua vasta composição nutricional, associada à dificuldade da sua obtenção, faz desta espécie um produto de alto valor económico.

Tabela 1: Valor nutricional, de *Morchella esculenta*, numa base de 100 g. Energia, E , e massa, m , dos diversos componentes

Valor nutricional					
	E/kJ	129,000		Vitamina B6	0,136
m/g	Hidratos de carbono	5,100	m/mg	Cálcio	43,000
	Açúcares	0,600		Ferro	12,180
	Fibras	2,800		Magnésio	19,000
	Gorduras	0,570		Manganésio	0,587
	Proteínas	3,12		Fósforo	194,000
					Potássio
m/mg	Tiamina (vit. B1)	0,069	$m/\mu g$	Zinco	2,030
	Riboflavina (vit. B2)	0,205		Ác. Fólico (vit. B9)	9,000
	Niacina (vit. B3)	2,252		Vitamina D	5,100
	Ác. Pantoténico (vit. B5)	0,440			

Experiências feitas em roedores indicam que os polissacarídeos do corpo frutífero da *M. esculenta* têm várias propriedades medicinais, tais como efeitos anti-tumorais, propriedades imonreguladoras, resistência à fadiga, efeitos antivirais e propriedades antioxidantes [21] [22] [23]. A *Morchella esculenta* também é usada na medicina tradicional chinesa para tratar a indigestão e falta de ar [24].

Pode ser confundida com a espécie *Morchella cónica* ou *Morchella gigas* que não são espécies tóxicas, pelo que não aparenta um perigo elevado de confusão com espécies venenosas. A espécie tóxica que poderá criar alguma confusão na sua identificação é a *Gyromitra esculenta*, que é ligeiramente diferente da *Morchella esculenta*, como visualizado na Figura 5. No entanto, por vezes, as condições ambientais como excessos de chuva e frio podem variar a forma física dos cogumelos, aumentando o risco de confusão entre espécies.

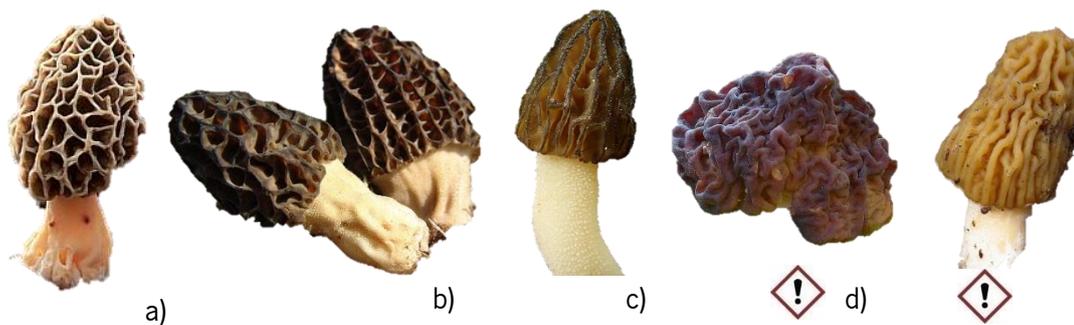


Figura 5: Espécies semelhantes fisicamente. a) *Morchella esculenta*; b) *Morchella cónica*; c) *Morchella gigas*; d) *Gyromitra esculenta*; e) *Verpa bohemica*. Adaptado de [17].

Outra espécie morfológicamente semelhante é a *Verpa bohemica*, cuja comestibilidade é questionável, pois embora seja consumido por muitos, existem relatos de que a ingestão de quantidades elevadas numa só refeição, ou em dias sucessivos, pode causar intoxicação em indivíduos suscetíveis [25].

5.1.1 Cultivo

A espécie *Morchella esculenta* apresenta-se como um dos cogumelos mais apreciados do mundo [26]. Deste modo, há vários estudos acerca da sua morfologia, citologia, germinação de esporos, anatomia e fisiologia, no entanto, poucos são os que abordam a sua produção, reprodução e ciclo de vida [27]. Assim, os esforços feitos até ao momento para cultivar estes cogumelos são raramente bem-sucedidos e a sua comercialização está centralizada na apanha de cogumelos silvestres [28].

A *M. esculenta* germina esporos e apresenta extensas formas de micélio num tempo relativamente curto. No entanto, quando o micélio se depara com uma fronteira física, uma região não-nutritiva ou outros seres concorrentes, este interrompe a sua expansão, entra em colapso e forma uma estrutura subterrânea designada de esclerócios [29].

O que difere a *M. esculenta* de outros cogumelos quanto à sua produção e o que cria o misticismo popular à volta desta espécie encontra-se explicado no ciclo de vida deste cogumelo, que se encontra esquematizado na Figura 6.

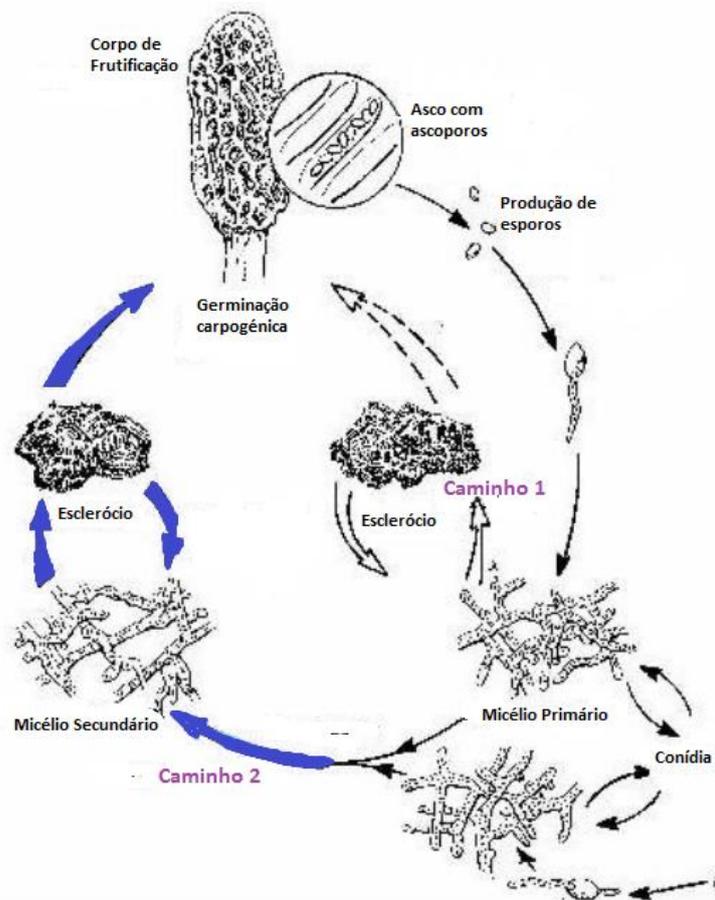


Figura 6: Ciclo de vida da *Morchella esculenta*. Adaptado de [79].

Ao observar a Figura 6 pode-se constatar a existência de uma fase incomum nos restantes cogumelos: a formação de esclerócios, que consistem numa massa com cerca de 5 cm de diâmetro composto por células de grandes dimensões e paredes espessas que permitem ao fungo sobreviver em condições mais adversas. Após a formação do esclerócio, este tem duas opções: ou forma um novo micélio ou produz um corpo de frutificação. A tendência natural é a simplicidade da formação de um novo micélio, dificultando a obtenção do corpo frutífero deste cogumelo [30].

São necessárias condições muito específicas e invariáveis de níveis de dióxido de carbono, temperatura, humidade e nutrientes para formar os primórdios. No entanto, mesmo realizada esta etapa, o processo de frutificação é ainda mais complicado, pois as condições climáticas são diferentes das iniciais, pelo que o surgimento dos primórdios não indicará necessariamente o surgimento do corpo frutífero [30].

Ao longo do tempo, foi-se estudando algumas otimizações do crescimento da *Morchella esculenta*. A primeira tentativa para a sua domesticação foi em 1901 por Repin, que afirmava ter

obtido uma produção dos corpos frutíferos numa cave na qual as culturas se tinham estabelecido em vasos de flores em 1892. Também obteve estes corpos frutíferos num leito composto por folhas secas alcalinizadas com carbonato de sódio e num local constituído por resíduos de maçã. Como inóculo, utilizou micélio que esteve em crescimento em longos e estreitos tubos durante alguns meses e que, posteriormente transferiu para os vários tipos de solo. Estabeleceu no seu trabalho que a *Morchella sp.* não cresce necessariamente de forma parasítica nas raízes das plantas, mas que também pode crescer de forma saprófita. Deste modo, permitiu afirmar que poderá ser possível estabelecer as condições necessárias para a produção comercial da *Morchella spp.* [31].

Outro dos primeiros trabalhos feitos na tentativa de cultivar cogumelos foi o de Molliard (1904, 1905) que reportou os estágios conidiais de várias espécies da *Morchella*, onde adicionou várias substâncias orgânicas, que não divulgou nos seus trabalhos, aos conídios formados no composto. Noutro trabalho (1905), Molliard divulga a formação de esclerócios de *Morchella* em pão, esterilizado e húmido. Estes esclerócios cresceram em algumas das experiências e ele descreveu-os tendo um aspeto semelhante aos corpos frutíferos, apesar de nunca ter observado a formação dos ascos. Ele conseguiu obter verdadeiros corpos frutíferos em “compota de maçãs”. O estágio conidial também se desenvolveu neste meio. No entanto, Molliard não referiu se os corpos frutíferos ocorreram num meio estéril ou não. Ele sugeriu o cultivo deste fungo enterrando frutos em fase de podridão no solo e introduzindo o micélio da espécie desejada durante o Outono, retornando ao local no início da primavera para recolher os cogumelos. Esta técnica não foi, de uma forma geral, usada. O trabalho de Molliard foi revisto em 1936, por Constantin, que conseguiu publicar duas fotos de corpos frutíferos obtidos em cultura por Molliard [31].

Ao longo deste tempo, pouca informação foi publicada acerca da fisiologia da *Morchella sp.* Fron (1905) reportou resumidamente a utilização de compostos carbonados e o efeito da alcalinidade e acidez no cultivo da *Morchella*. Ele afirmou que a inulina era a melhor fonte de carbono e que uma reação neutra ou ligeiramente alcalina favorecia o crescimento [31].

Estes foram alguns dos primeiros estudos feitos no sentido da produção deste fungo. Outros autores continuaram estes estudos, como por exemplo Foster (1949) e Melin (1941) [31] [31].

5.2 *Macrolepiota procera*

A espécie *Macrolepiota procera* é um dos cogumelos silvestres comestíveis mais comuns em Portugal, encontrando-se também distribuído nas áreas do norte da Ásia, como Coreia, China e Japão, norte da América. Popularmente conhecido como Púcara, Frade, Gasalho, Cogordo, Marifusa, Róculo ou Parasol, o *M. procera* apresenta-se com diferentes dimensões, com chapéus de 5 cm a 50 cm de diâmetro, de forma oval ou esférica, que vão abrindo gradualmente conforme o seu amadurecimento, sendo primeiramente de forma esférica, depois convexo, seguida duma expansão abrindo amplamente, até ficar plano, tal como visualizado na Figura 7. O chapéu fechado que apresenta, quando jovem, forma uma câmara fechada que o protege do exterior; apresentando uma superfície suave, mas, ao abrir, expande uma película escura e fibrosa, surgindo do centro, que proporciona um espalhamento de coloração escura ao longo do cogumelo, sobrepondo a coloração clara [17].



Figura 7: *Macrolepiota procera*.

O caule é delgado e fibroso, tonando-o incomestível, com cor acastanhada, de 1 cm a 2 cm de espessura e pode proporcionar um cogumelo de 10 cm a 60 cm de altura [9]. A parte superior do caule é envolvida por um anel de coloração clara. As suas lâminas são brancas, assim como a sua “carne”, mas esta facilmente escurece com o manuseamento. Os esporos brancos apresentam a forma elipsoide de 12 μm a 18 μm por 8 μm a 12 μm [9] [32].

O cogumelo é apreciado pelas suas características organolépticas únicas, sabor e textura, mas também pelas suas propriedades nutricionais e características medicinais, tais como anti-inflamatórios, antidiabético, antibacteriana e anti tumoral, atribuída à presença de metabolitos bioativos (por exemplo, compostos fenólicos, esteroides, terpenos e polissacarídeos) [33] [34]. Os cogumelos podem ser uma fonte de nutracêuticos com importantes propriedades antioxidantes, que podem influenciar positivamente o *stress* oxidativo nas células e doenças

associadas [35]. O cogumelo fresco possui aproximadamente 85.9 g de água por 100 g de cogumelo, sendo o seu constituinte maioritário, seguido das proteínas. É constituído também por hidratos de carbono e contém um baixo teor em gordura de 375 kcal a 385 kcal por cada 100 g. Na Figura 8 é apresentado um esquema da proporção dos vários constituintes no *M. procera* [36] [37].

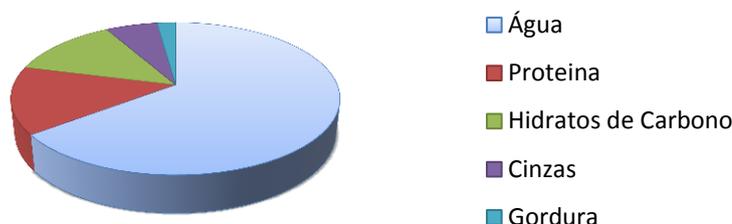


Figura 8: Proporções da composição nutricional do *M. procera*.

O chapéu é rico em minerais, incluindo potássio, fósforo, magnésio, sódio, cobre, zinco e cálcio. Quando comparado com outros cogumelos comestíveis, o *M. procera* é considerado um bom componente da dieta humana, devido ao seu potencial de ser uma boa fonte de selénio [38] [39].

5.2.1 Cultivo

Tal como o *M. esculenta*, o *M. procera* é um cogumelo que desperta curiosidade, havendo diversas publicações acerca da sua morfologia e características, no entanto, poucos são os estudos existentes acerca da sua produção. O *M. procera* é um cogumelo relativamente comum, surgindo em vários tipos de florestas, essencialmente em caminhos, plantações florestais, prados, clareiras, em suma, onde incide um pouco mais de luz. Surgem em grupo ou isolados, essencialmente nas primeiras chuvas de Outono, sob as madrugadas frias e debaixo da neblina. A nível rural, é um cogumelo incluído na dieta de algumas famílias, mas apenas na sua versão silvestre [40].

5.2.2 Espécies venenosas semelhantes

De norte a sul de Portugal, muitos são os apreciadores de cogumelos que procuram o popularmente denominado de frade, míscaros, entre outros. No entanto, existem algumas espécies semelhantes ao *M. procera*, mas venenosos, entre eles, o *Chlorophyllum molybdites*, um dos cogumelos venenosos mais enganosamente consumidos [41]. Um cogumelo morfologicamente idêntico ao *M. procera*, o *C. molybdites*, ilustrado na Figura 9, provoca danos

predominantemente gastrointestinais, tendo como sintomas náuseas, vômitos, dor abdominal e diarreia, que surgem entre 30 min a 180 min após a sua ingestão [42]. Além da seu aspeto semelhante, este cogumelo nutre nos mesmos lugares que o *M. procera*, surgindo também com as chuvas de Outono, aumentando a indução em erro [43] [44].



Figura 9: *Chlorophyllum molybdites*. Adaptado de [44].

A principal diferença entre estas duas espécies reside na coloração dos esporos, onde o *C. molybdites* liberta esporos esverdeados, contrariamente aos esporos brancos do *M. procera*, sendo o nome oriundo dessa característica (*chloro* significa verde e *phyllum* exprime lâminas). No entanto, os esporos podem demorar a desenvolver-se, apresentando a coloração branca antes do término do seu desenvolvimento, podendo induzir em erro a distinção dos dois cogumelos [42].

Um cogumelo que tem vindo a ter vários registos em Portugal de confusão com o *M. procera* é o *Macrolepiota venenata*, um cogumelo tóxico [40]. Apesar da notória semelhança que pode ser perceptível na Figura 10, este cogumelo apresenta algumas diferenças que ajudam na distinção destes dois cogumelos, nomeadamente, a nível do chapéu, nas lâminas e no pé. No *M. venenata* o chapéu é inicialmente globoso e, no final, é aplanado apenas com uma mancha escura não definida no centro, enquanto no *M. procera* é inicialmente ovoide e no final é plano com uma saliência no centro. Também relativamente à cutícula, esta estala radialmente, em grandes escamas estreladas, de tamanho irregular, enquanto no *M. procera* a cutícula estala de forma concêntrica, em escamas irregulares de maior tamanho na periferia. As lâminas do *M. procera* não reagem ao toque, já no *M. venenata* apresentam uma ligeira coloração avermelhada. Relativamente ao pé destes cogumelos, o pé do *M. procera* é zebrado e salientemente de maiores dimensões que o chapéu, enquanto o pé do *M. venenata* é de cor clara e inferior ou, no máximo, proporcional ao tamanho do chapéu. No que concerne ao anel, este é pequeno, duplo no início e mais simples no fim e posiciona-se a nível intermédio do caule, enquanto no *M. procera* o anel é duplo e supero [40].



Figura 10: *Macrolepiota venenata*. Adaptado de [40].

Outro cogumelo semelhante e propício à indução em erro é o *Lepiota brunneoincarnata*, ilustrado na Figura 11, que se trata de um cogumelo potencialmente letal [45] [46]. Possui um chapéu de 3 cm a 5 cm de diâmetro, fisicamente semelhante ao *M. Procera*, surgindo na mesma época sazonal e nos mesmos locais. Normalmente, não atinge dimensões tão grandes como o *M. procera*, sendo um marcador distintivo [47].



Figura 11: *Lepiota brunneoincarnata*. Adaptado de [75].

5.3 *Pleurotus ostreatus*

O *Pleurotus ostreatus* apresenta um conjunto de numerosas frutificações com chapéu em forma de concha. A coloração varia de bege a cinzento-escuro e quando exposto a uma temperatura abaixo dos 15 °C apresenta coloração cinza-azulado. A “carne” do chapéu é branca, apreciada gastronomicamente, fibrosa e tenra. O seu tamanho pode variar de 5 cm a 20 cm de diâmetro e possui um pé lateral [9].



Figura 12: *Pleurotus ostreatus*.

É um fungo saprófita produzido essencialmente em substratos à base de palha. Comumente, na produção industrial, são comercializados em sacos de 18 kg, pois a sua força micelial permite a sua produção em substratos de maiores dimensões que a maioria das espécies, pois o processo de pasteurização é suficiente no combate aos microrganismos. Na maioria das espécies, é necessário o processo de esterilização (121 °C) e atingir essa temperatura no centro dos substratos de pesos superiores a 3,5 kg é um processo difícil, que necessita de equipamentos de custo elevado, retirando a rentabilidade económica desta produção [48].

Além de permitir a produção industrial em sacos de maiores dimensões, permite também a produção caseira, de pessoas que realizam o processo de inoculação em casa, pois os materiais comumente disponíveis são suficientes para a pasteurização, enquanto as espécies que necessitam de esterilização são mais difíceis de produzir em casa. Estes fatores promovem a produção deste cogumelo, permitindo assim este ocupar o título de um dos cogumelos mais produzidos a nível mundial [17].

5.4 *Pleurotus djamor* e *Pleurotus cornucopiae*

O *Pleurotus djamor*, popularmente conhecido como Pleurotus cor-de-rosa, apresenta um aspeto muito semelhante ao *Pleurotus ostreatus*, mas com uma cor distinta, tal como apresentado na Figura 13. Tem a peculiaridade de não resistir a temperaturas abaixo dos 10 °C, dificultando o seu armazenamento. Acima de 16 °C, forma numerosas frutificações cor-de-rosa variáveis entre 7 cm a 12 cm, muito atrativas pelo seu aspeto e cor. Com a diminuição de temperatura, a apresentação da cor e forma podem alterar [9].

O *Pleurotus cornucopiae*, representado no ponto b) da Figura 13, apresenta uma forma muito semelhante ao *Pleurotus ostreatus*, variando na cor, que pode variar do amarelo claro, a um amarelo mais brilhante, dependendo das condições ambientais a que é exposto. O seu crescimento é mais favorável em substratos à base de palha [49].

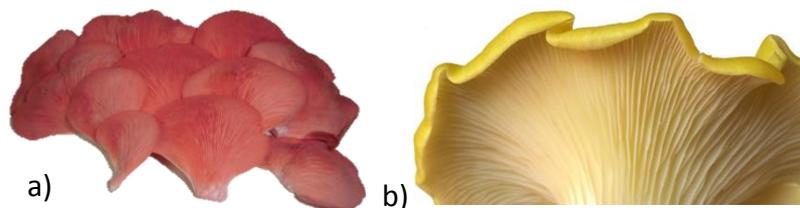


Figura 13: a) *Pleurotus djamor*, b) *Pleurotus cornucopiae*.

Na Tabela 2, encontra-se sintetizado as características de crescimento do *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus djamor* e *Pleurotus cornucopiae*.

Tabela 2: Características dos primórdios e do cogumelo *Pleurotus ostreatus*, *P. cornucopiae* e *P. djamor*. Temperatura (T) tempo (t), humidade (H), necessidade de luz, e concentração de CO_2 . Adaptado de [48]

Estado	Espécies	T °C	t d	H %	Luz (necessidade)	$\frac{C_{CO_2}}{cm^3/m^3}$
Indução dos primórdios	<i>P. ostreatus</i>	12 - 16	5 - 7	90 - 95	Sim	800 - 1000
	<i>P. cornucopiae</i>	18 - 20				
	<i>P. djamor</i>	18 - 20				
Desenvolvimento dos primórdios	<i>P. ostreatus</i>	10 - 18	2 - 5	85 - 90	Sim	600 - 800
	<i>P. cornucopiae</i>	18 - 20				
	<i>P. djamor</i>	20 - 11				
Desenvolvimento do cogumelo	<i>P. ostreatus</i>	10 - 18	2 - 5	80 - 90	Sim	600 - 800
	<i>P. cornucopiae</i>	18 - 20				
	<i>P. djamor</i>	20 - 22				
Amadurecimento do cogumelo	<i>P. ostreatus</i>	10 18	1	80 - 90	Sim	600 - 800
	<i>P. cornucopiae</i>					
	<i>P. djamor</i>					

O *P. djamor* e *P. cornucopiae* carecem de 30 a 35 dias de incubação em substratos à base de serrim. Se recorrermos a substratos de palha pasteurizados, é necessário 18 a 21 dias. Em boas condições, estes podem ter 2 a 3 frutificações, pois estes cogumelos apresentam pouco peso e bastante volume e, normalmente, a superfície exposta para o desenvolvimento dos cogumelos é pequena.

Os primórdios destas espécies são induzidos ao fim de 5 a 7 dias. O *P. ostreatus* necessita de 12 °C a 16 °C, enquanto o *P. cornucopiae* e o *P. djamor*, por sua vez, apresentam um crescimento favorável a 18 °C a 20 °C, com uma humidade de 90 % a 95 %, e necessitam de luz para obterem a sua cor característica. Relativamente à quantidade de dióxido de carbono, esta não pode exceder 1000 ppm (cm³/m³), nem ser inferior a 800 ppm. Esta espécie produz uma elevada quantidade deste composto, pelo que é necessário um movimento constante do ar para controlar o excesso de CO₂. Complementarmente, efetua-se um tratamento mecânico, realizando-se cortes em secções transversais de pequenas dimensões, efetuando buracos e fendas. Relativamente às culturas em frascos, estas necessitam de pequenos arranhões na superfície [9] [48] [50].

Por vezes, na espécie *P. cornucopiae* e *P. djamor*, ocorre a indução dos primórdios espontaneamente, sem qualquer tratamento, quando o substrato se encontra maduro. Após a indução dos primórdios, segue-se o seu desenvolvimento, que ocorrem ao fim de 2 a 5 dias com as condições adequadas de 85 % a 90 % de HR e 10 °C a 18 °C no caso do *P. ostreatus*, 18 °C a 20 °C no *P. cornucopiae* e 20 °C a 22 °C no *P. djamor*. É imprescindível fornecer 600 e 800 ppm de CO₂. Este valor reduzido exige grandes quantidades de ar renovado. É necessário certificar que o ar fresco alcança todos os primórdios, pelo que é essencial um pequeno sistema de arejamento [9] [48].

Os cogumelos desenvolvem-se no término de 2 a 5 dias, sobe a temperatura de 10 °C a 18 °C no caso do *P. ostreatus*, 18 °C a 20 °C no *P. cornucopiae* e 20 °C a 22 °C no *P. djamor*. Estes necessitam de luz no seu crescimento, e HR de 80 % a 90 %, embora o *P. cornucopiae* e o *P. djamor* necessitem de um pouco mais de humidade. A quantidade de CO₂ influencia o crescimento dos chapéus do cogumelo, pelo que não deve exceder os 600 ppm a 800 ppm. De modo a manter este valor, é aconselhável um movimento que uniformize o ar. Se possível, é aconselhável haver uma diminuição gradual da temperatura ao longo dos dias, diminuindo 2 °C por dia. Assim, 4 dias antes da recolha dos cogumelos aumenta-se a temperatura 6 °C e vai-se

diminuindo ao longo do tempo. Este procedimento resultará em chapéus mais densos e num melhor rendimento [9].

O amadurecimento do cogumelo ocorre ao fim de um dia, sob uma temperatura compreendida entre 10 °C e 18 °C, dependendo da cultura, e 80 % a 90 % de humidade. Esta etapa também necessita de luz. No que concerne à quantidade de CO₂, esta deve estar contida entre 600 ppm e 800 ppm, recorrendo a uma uniformização do ar envolvente [9] [48].

5.5 *Pleurotus eryngii*

O *Pleurotus eryngii*, popularmente conhecido como cogumelo rei, é um cogumelo produzido em grande escala na Ásia, Europa e América do Norte. É uma espécie de crescimento rápido, de boa produção e alta qualidade. Possui o pé branco e largo, sendo o chapéu cinzento a acastanhado, tal como pode ser visualizado na Figura 14, com tamanho que varia entre 4 cm a 6 cm. É uma espécie saprófita que cresce em substratos à base de serrim. Podem surgir agrupados ou individualmente. O cogumelo tem elevado teor fibroso, característica que pode ser aproveitada por quem faz regime contra a obesidade, pois dá sensação de saciedade com poucas calorias [51]

Da produção em substrato do *P. eryngii* normalmente surge apenas uma frutificação. Possui o mesmo rendimento que outras espécies que realizam três frutificações (25 % do peso de cogumelo face ao peso do substrato), mas numa única frutificação, por tratar-se de um cogumelo mais denso [52]. Tem um tempo de incubação entre 35 e 70 dias, dependendo do substrato. Se se recorrer ao sistema de frascos, implica menores volumes, diminuindo o tempo de incubação para apenas 28 dias [9] [48] [50].

A indução dos primórdios (ponto a) da Figura 14) requiere temperaturas entre os 15 °C e os 18 °C e humidade relativa de 95 % a 97 %. O dióxido de carbono não deve ultrapassar os 3000 ppm, e o ar envolvente deve ter uma velocidade baixa. Aconselha-se também um tratamento mecânico, raspando a superfície do substrato nos sacos fechados [9] [48].



Figura 14: *Pleurotus eryngii*; a) indução dos primórdios; b) desenvolvimento dos primórdios; c) Frutificação.

Os primórdios desenvolvem-se ao longo de 6 a 7 dias, necessitando de temperatura entre 15 °C e 18 °C e de humidade relativa de aproximadamente 95 %. Não é necessária luz e no que respeita ao dióxido de carbono, este não deve ultrapassar os 2000 ppm. Quando os primórdios atingem a 1 cm a 2 cm, é necessário abrir os sacos, mas apenas no topo. Os primórdios devem expelir algumas gotículas de água e, se tal não ocorrer, é a indicação que o substrato se encontra demasiado seco. Se, pelo contrário, ocorrer uma grande quantidade de gotículas, indica que o substrato se encontra demasiado húmido.

O cogumelo desenvolve-se ao longo de 7 e 10 dias, carecendo duma temperatura de 12 °C a 18 °C e humidade relativa entre 85 % e 90 %, não necessitando de luz e mantendo uma velocidade baixa do ar. O dióxido de carbono não deve ultrapassar os 2000 ppm, nem ser inferior a 60 ppm, pois irá influenciar o comprimento do caule e o tamanho do chapéu do cogumelo. É aconselhável escolher os cogumelos com uma ligeira curvatura antes da libertação dos esporos, pois os esporos prejudicam os primórdios e os cogumelos de menores dimensões e pode tornar o meio propício a bactérias.

O amadurecimento do cogumelo ocorre entre 1 a 2 dias, requerendo 12 °C e 18 °C e 83 % a 85 % de HR, necessitando da exerceção de luz e uma velocidade de ar baixa. A quantidade de CO₂ não deve ser superior a 2000 ppm. A Tabela 3 apresenta, de forma resumida, todas as características supracitadas.

Tabela 3: Condições para o desenvolvimento do cogumelo *Pleurotus eryngii*.

Estado	$\frac{T}{^{\circ}\text{C}}$	$\frac{t}{\text{d}}$	$\frac{H}{\%}$	Luz (necessidade)	$\frac{C_{\text{CO}_2}}{\text{cm}^3/\text{m}^3}$
Indução dos primórdios	15- 18	6 - 7	95 - 97	Não	<= 3000
Desenvolvimento dos primórdios	15 – 18	6 - 7	95	Sim	<= 2000
Desenvolvimento do cogumelo	12 – 18	7 - 10	85 - 90	Sim	600 - 2000
Amadurecimento do cogumelo	12 – 18	1 - 2	83 - 85	Sim	<= 2000

Os parâmetros de crescimento, como a temperatura, humidade e luz, não oscilam muito nos vários períodos de desenvolvimento do cogumelo, pelo que não é necessário um grande investimento nos aparelhos necessários para a obtenção destas condições.

6. Produção de cogumelos saprófitas

Para a produção de cogumelos ser possível é necessário seguir uma série de etapas que são explicadas de seguida, desde a produção do inóculo, passando pelas exigências necessárias nas instalações até à produção dos cogumelos.

6.1 Produção do inóculo

A primeira etapa de qualquer processo de produção de cogumelos saprófitas consiste na obtenção da cultura micelar pura da espécie do cogumelo em questão. Todo o processo envolvente neste tipo de produção é realizado em meio de assepsia, com materiais esterilizados, sendo todas as tarefas executadas o mais rápido quanto possível, de modo a evitar contaminações.

O primeiro passo inerente a esta produção é o isolamento do cogumelo, onde se recolhe uma porção deste e se coloca numa matriz orgânica sólida que permita o desenvolvimento micelar, obtendo-se, assim, uma cultura micelar pura. A cultura obtida poderá ser multiplicada, recorrendo ao mesmo meio nutricional utilizado anteriormente, sob condições ambientais controladas, permitindo o crescimento exponencial do micélio recolhido primeiramente.

De seguida, migra-se o micélio para um meio nutricional adequado, normalmente à base de trigo, permitindo um crescimento do micélio em cerca de 90 % do volume. Este produto denomina-se de *spawn mother*. O grão utilizado proporciona os nutrientes necessários e é também um veículo para a distribuição uniforme no meio de cultura. Cada grão torna-se revestido individualmente com o micélio, tornando-se uma cápsula.

A finalidade desta colonização em grão é aumentar o micélio a um estado de vigor, de tal modo que permitirá a colonização rápida na altura de inoculação do substrato.

O *spawn mother* é a base para a produção da fase seguinte: o *spawn* ou os *pellets*. Segue-se a produção de *spawn* se o objetivo for a produção de cogumelos saprófitas em substrato. Caso se pretenda a produção de cogumelos saprófitas em troncos de madeira, segue-se a produção de *pellets*.

O *spawn* corresponde a um processo idêntico ao *spawn mother*, pois utiliza-se a mesma matéria-prima: cereais. No entanto, aumenta-se de 100 g para 1 kg dessa mesma matéria-prima, permitindo assim que a migração do micélio seja progressiva. A colocação repentina do *spawn mother* no substrato poderia danificar o micélio, não se obtendo o máximo de rentabilidade

necessária. Quando se pretende produzir cogumelos recorrendo a troncos de madeira produz-se os *pellets*, que consistem em cavilhas de madeira de 4 cm perfeitamente incubadas com o micélio da espécie pretendida. Na Figura 15 encontra-se ilustrado as várias fases anteriormente explicadas.

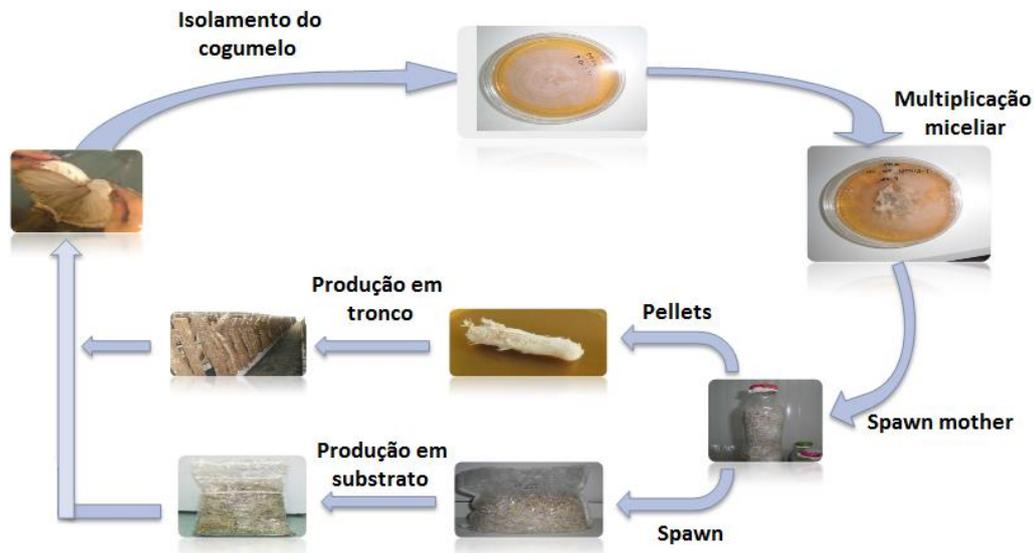


Figura 15: Ciclo de produção de inóculos de cogumelos saprófitas.

Assim, de um único isolamento de um cogumelo, pode-se obter 20 placas de multiplicação micelar, onde estas, por sua vez, originam 4 frascos de *spawn mother* cada, obtendo 80 frascos de aproximadamente 100 g cada.

Para a produção de substratos, cada frasco dá origem a 3 kg de *spawn*, pelo que poderá obter-se 240 kg de *spawn*. Utiliza-se 10 % de *spawn* face ao peso de substratos, pelo que cada kg de *spawn* permitirá a inoculação de 10 kg de substrato. Assim, através de um pequeno fragmento de cogumelo, poderá obter-se 2400 kg de substrato inoculado. Dependendo da espécie e dos substratos em questão, normalmente a produção tem um rendimento de 25 %. Assim, este processo permitirá obter, de um único fragmento, 600 kg de cogumelo, tal como esquematizado na Figura 16, num processo que poderá demorar até 8 meses.

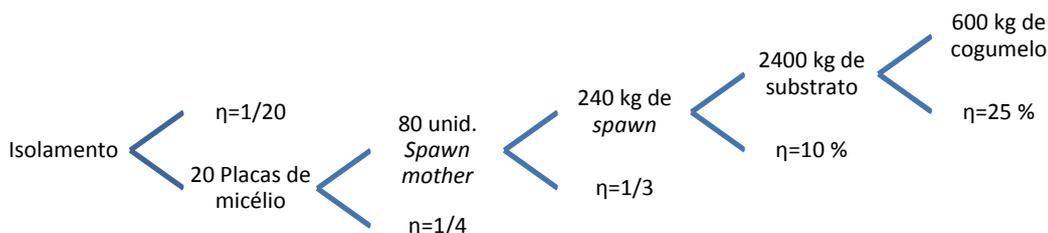


Figura 16: Representação esquemática do rendimento de cada etapa na obtenção de inóculo na produção de cogumelos em substrato.

Para a produção em tronco, cada frasco de *spawn mother* de 100 g dá origem a 1.000 *pellets*, que é a quantidade necessária para inocular 1 tonelada de madeira. Assim, é possível obter 80000 *pellets*, para a inoculação de 80 toneladas. Esta produção, ao longo de 3 anos, ronda um rendimento de aproximadamente 15 %, assim, é possível obter 12000 kg de cogumelos, tal como esquematizado na Figura 17.

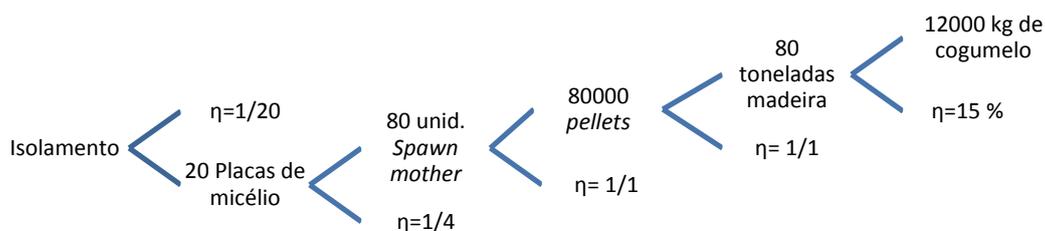


Figura 17: Representação esquemática do rendimento de cada etapa na obtenção de inóculo na produção de cogumelos em tronco.

Com as matérias-primas adequadas, a obtenção do inóculo é um processo de fácil manuseamento e de bons resultados, desde que seja realizado em instalações adequadas com todos os cuidados inerentes.

6.1.1 Instalações: o fator chave para a produção de inóculos

Antecedentemente a qualquer produção, é necessário estabelecer quais as infraestruturas corretas, de modo a evitar contaminações e problemas técnicos, que poderão pôr em causa toda a produção. Na Figura 18 é apresentado um exemplo de um plano para um laboratório de produção de *spawn*. A área é distribuída por uma área de salas limpas, de recolha da cultura, oficina e ferramentas, laboratórios de pesquisa, escritórios, zona de embalagem, área de armazenamento frio e área de simples armazenamento e com respetivas comportas. O esquema é apenas um exemplo genérico com as zonas necessárias que serve de base para o dimensionamento, de acordo com as quantidades pretendidas.

A oficina e zona de ferramentas são a parte suja onde poderá ser realizado o tratamento da matéria-prima e a respetiva colocação nos sacos. De seguida, são colocados na autoclave (ponto “a” da Figura 18). Após esterilização, abre-se a autoclave na parte oposta da que se colocou os sacos, saindo na área limpa, onde, após arrefecimento, será inoculado. Posteriormente, os sacos são colocados numa sala de incubação, que pertence ainda à área de salas limpas. É necessário a existência de áreas de armazenamento em frio, para a conservação do *spawn* já incubado. Posteriormente, é necessário uma zona de embalagem e expedição do produto [53].

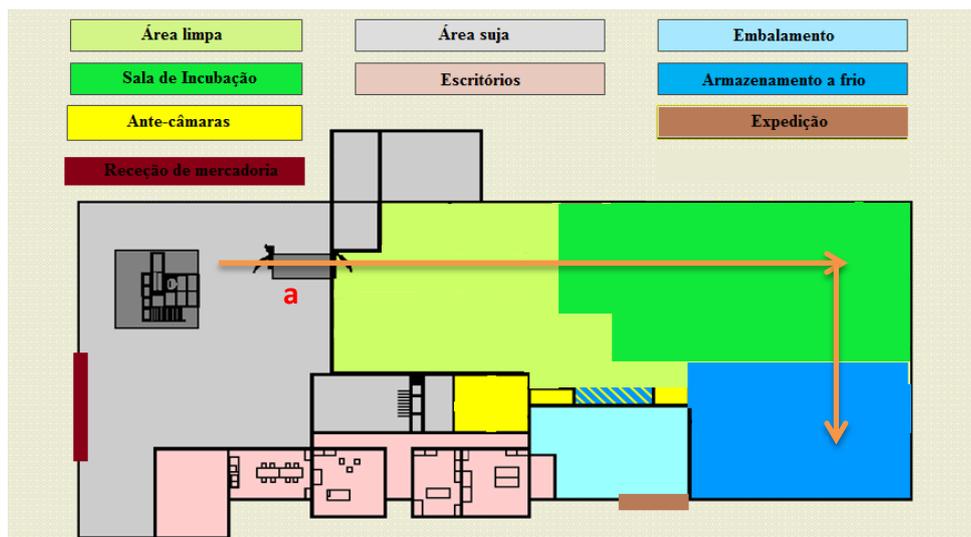


Figura 18: Exemplo de um plano de infraestruturas para um laboratório de produção de *spawn*.

O fluxo do produto deverá seguir o circuito “marcha-em-frente”, desde a entrada das matérias-primas até à expedição/distribuição dos produtos finais, sem que nessa sequência ocorram contaminações cruzadas entre as diferentes operações. De modo a manter as salas limpas estéreis, o ideal é recorrer a câmaras de sobrepressão, isto é, salas que apresentam uma pressão superior à pressão atmosférica, para que, quando se abre uma porta, devido ao equilíbrio atmosférico, o ar tenda a sair, evitando assim que o ar entre mantendo a sala estéril [53].

As salas limpas e a restante instalação são separadas por antecâmaras de modo a evitar contaminações, que são compostas por um lado sujo onde é deixado roupas e adereços, seguido de um lado limpo, que se encontra roupa adequada para as salas onde se efetua o processo, tal como indicado na Figura 19 [53].



Figura 19: Antecâmaras para as salas limpas. Adaptado de [54].

Outro requisito na zona de trabalho é manter o fluxo laminar de ar, que permite a esterilização no espaço de trabalho através de um movimento horizontal ou vertical do ar, com uma velocidade requerida do ar de 0,47 m/s [53].

6.1.2 Embalagem

A embalagem do *spawn* é uma etapa crucial para o bom crescimento do fungo, pois deve permitir a sua respiração adequada, assim como evitar a entrada de contaminantes.

Ao longo do tempo, ocorreu uma evolução dos recipientes de *spawn*, nomeadamente iniciando-se com garrafas contendo apenas rolhas de algodão que permitem a respiração, passando para sacos com filtros de grandes dimensões, otimizados através da diminuição dos filtros, finalizando com sacos com apenas várias tiras ao longo de todo o saco, que permitem a respiração uniforme por parte do fungo. Essa evolução encontra-se ilustrada na Figura 20.



Figura 20: Evolução do recipiente de spawn.

Para um bom embalamento, é necessário o recipiente ser resistente ao calor, ao frio e a choques. Para tal, podem ser constituídos por polipropileno. Preferencialmente, devem ser transparentes de modo a ser visível a evolução do micélio e identificar qualquer contaminação. Além disso, deve permitir trocas gasosas de dióxido de carbono e oxigénio e evitar a desidratação, mantendo a humidade dentro do saco [55].

O filtro deve estar numa posição que permita uma respiração uniforme, de forma a não provocar o sufocamento do *spawn*, tal como na Figura 21. O filtro deve ainda manter-se sempre seco, pois a humidade anulará o efeito de barreira que ele proporciona, permitindo a entrada de microrganismos [53].

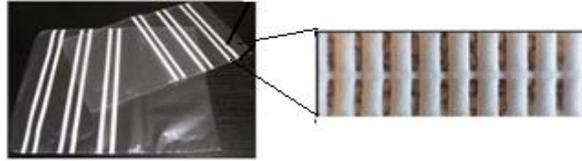


Figura 21: Sacos de *spawn*.

O núcleo do filtro deve ser constituído por duas camadas de filtro semelhantes ao sistema utilizado pelos filtros HEPA, mas numa escala menor. Podem ser compostos por fibras dispostas aleatoriamente em que os microrganismos ficam retidos, tal como ilustrado na Figura 22. Isto permite a troca gasosa, sem uma zona de secagem a seguir aos filtros. Contrariamente ao algodão, o filtro deve ser ainda hidrofóbico [55].

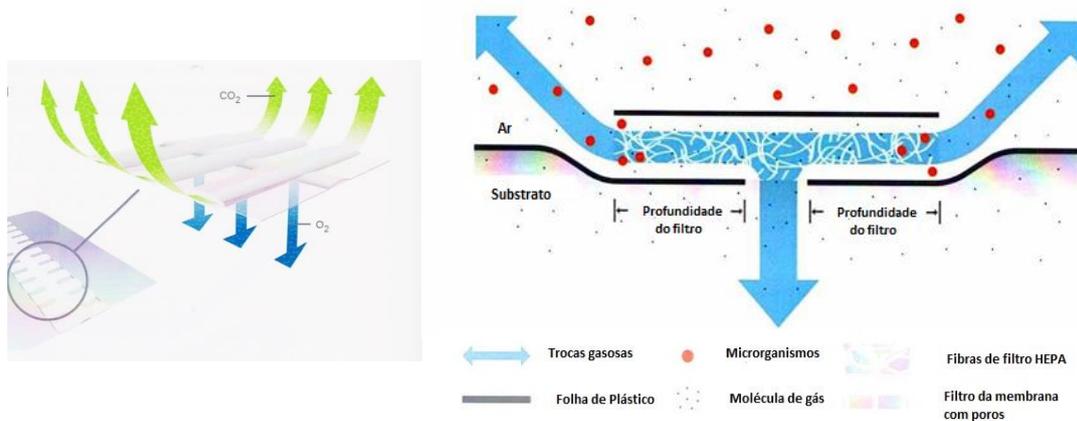


Figura 22: Representação das trocas gasosas realizadas nos filtros dos sacos utilizados na produção de *spawn* e substratos Adaptado de [55].

Estabelecida a embalagem, de seguida enche-se a mesma com trigo/centeio e procede-se ao processo de esterilização. Se o *spawn* não for utilizado de seguida para a produção de substrato, este deve ser armazenado no menor tempo possível, entre 1 °C a 5 °C, normalmente em prateleiras ou bandejas. A esta temperatura, o *spawn* consegue sobreviver até 6 meses. Os sacos devem encontrar-se horizontalmente evitando o contacto entre eles [56].

6.2 Produção de substrato

A produção do substrato para a produção de qualquer espécie de cogumelo é o passo crucial para o bom desenvolvimento do micélio e frutificação do mesmo.

Este processo contempla uma série de etapas que serão abordadas de seguida. As matérias-primas deverão garantir a presença dos nutrientes necessários para o bom desenvolvimento do cogumelo, permitindo o fungo sintetizar os seus metabolitos e obter a quantidade de energia necessária ao seu desenvolvimento.

6.2.1 A logística

Para a produção de cogumelos ser uma produção economicamente viável, é necessário ter em atenção alguns aspetos, visando toda a produção contínua, e não momentânea.

Feito o estudo de rentabilidade do substrato, a escolha dos ingredientes contempla alguns pontos importantes, nomeadamente, a disponibilidade dos ingredientes ao longo de todo o ano e que estes não sejam limitados, pois a mudança da composição dos substratos conduzirá a problemas na produção. Os ingredientes também devem ser passíveis de ser armazenados durante bastante tempo, especialmente quando não estão disponíveis todo o ano. O preço dos ingredientes deve ser acessível, assim como o seu transporte, tendo em conta que o valor do transporte varia conforme a densidade das matérias-primas. O tamanho da embalagem dos ingredientes deve ser de acordo com a técnica utilizada. É necessário garantir também que o transporte dos ingredientes do armazém para a misturadora é sempre possível, mesmo quando as condições meteorológicas são adversas. Não deve haver cruzamentos de pessoas e materiais que se encontrem na zona suja com as áreas limpas e nos dias em que os operadores estiverem a trabalhar na zona suja, não devem deslocar-se para a zona limpa sem uma desinfeção prévia [57].

6.2.2 Os ingredientes

O micélio cresce na superfície e penetra pelos poros existentes no substrato. Este processo é possível, pois existe a libertação de enzimas nas partículas de água presentes no substrato. As enzimas quebram o substrato em nutrientes solúveis em água, possibilitando a incorporação do micélio nos respetivos nutrientes. Quando o substrato se encontra demasiado seco, as enzimas não conseguem trabalhar e quando, pelo contrário, o substrato está demasiado húmido, ocorre

a diluição das enzimas, impedindo o seu correto funcionamento e os nutrientes solúveis são diluídos, dificultando a incorporação do micélio [58].

Quando os substratos apresentam demasiada água ou uma má estrutura, a água bloqueia os poros presentes no centro do substrato e os restantes espaços vazios são preenchidos pelo micélio, promovendo o mau arejamento do substrato devido à falta de oxigénio. Uma boa estrutura de um substrato contempla a distribuição tridimensional das partículas sólidas, da água existente nos poros e do ar presente nos espaços de diferentes tamanhos [58].

Para cada sistema (espécie, tamanho do recipiente) existem condições ótimas associadas, que apenas podem ser melhoradas pela diminuição do peso do saco. Partículas muito finas preenchem os espaços vazios do substrato e podem estragar uma boa estrutura, o que implica mau arejamento. Para uma boa estrutura é necessário combinar a quantidade correta de pequenas e grandes partículas, cujo objetivo não é atingido apenas com a colocação de algumas aparas de madeira [58].

Para se avaliar se uma estrutura é boa, pode-se calcular a proporção entre partículas sólidas, a água e o ar presente nos espaços vazios. O problema que se coloca nesta situação é que não se conhece o tamanho e a distribuição desses espaços. A densidade de um determinado substrato não deve ser alterada, pelo que o controlo das densidades é muito importante [57].

A escolha das matérias-primas influencia diretamente o rendimento de produção assim como as características do próprio cogumelo. Um substrato de cogumelo é qualquer substância, desde que proporcione o crescimento do micélio, sendo que, normalmente, são à base de palhas de cereais, como trigo, centeio e aveia.

A palha apresenta várias vantagens, nomeadamente o seu baixo valor económico, a facilidade de obtenção, e o facto de se utilizada para cultivar vários tipos de cogumelos, dado a maioria destes possuir a capacidade de quebrar facilmente as fibras vegetais da palha, tornando-se, deste modo, um substrato versátil. Por outro lado, palha apresenta como desvantagem a necessidade de um tratamento prévio, pois, naturalmente, esta apresenta microrganismos que, sem a sua eliminação, podem impedir o micélio crescer. Deste modo, normalmente recorre-se à pasteurização da palha antes de ser utilizada como substrato [57].

Existe uma série de ingredientes que formam a estrutura de diversos substratos, mas todos têm que ser utilizados tendo em atenção que podem causar problemas na estrutura. O serrim, devido ao tamanho reduzido das partículas, torna os substratos demasiado compactos, por consequência da sua capacidade de grande retenção de água e em alguns países da Europa é muito caro; as fitas de madeira, apesar de serem estruturas compactas são um bom componente para melhorar substratos constituídos por serrim; as espigas de milho trituradas apresentam uma boa estrutura mas nem sempre estão disponíveis. Assim, a palha apresenta uma boa estrutura após trituração, criando espaços livres entre as matérias-primas, pelo que pode também ser usada para diminuir a densidade do substrato; também se pode usar sementes de girassol que são uma boa matéria-prima para ser utilizada em conjunto com o serrim; o linho apresenta uma boa estrutura mas não se conhece a sua viabilidade; as aparas de madeira, por sua vez, não apresentam benefícios no seu uso, por isso, o ideal é não serem utilizadas [58].

Na Tabela 4 pode ser visualizada a quantidade de água que algumas matérias-primas podem reter (*WHC – Water Holding Capacity*). Estes dados são um dos parâmetros que ajudam na escolha da matéria-prima, no entanto a humidade total do substrato é o parâmetro de interesse.

Tabela 4: Capacidade de retenção de água, *R*, de algumas matérias-primas. Adaptado de [47]

Matéria-prima	Serrim de carvalho	Serrim de fava	Palha	Fitas de madeira	Fibras de madeira	Borra de café	Linho
<i>R</i> /%	62	66	72	75	79	80	81

Outras matérias-primas promovem o aumento do pH do substrato, como é o caso do carbonato de cálcio, em que a gama tampão de valores de pH é de 6,2 a 8,3. O gesso aumenta o pH dos substratos e é também uma fonte de cálcio e enxofre [58].

Nos desperdícios agrícolas e subprodutos agroindustriais, a maior fonte de carbono é a celulose. No entanto, parte destes materiais contém menos de 50 % de celulose, sendo a restante quantidade de carbono necessária fornecida através da lenhina, hemicelulose, amido, proteínas e pequenas moléculas. A insuficiência de carbono no substrato pode resultar num bom desenvolvimento miceliar, mas pode dificultar a frutificação [58].

Algumas matérias-primas não apresentam grande disponibilidade de fonte de carbono, como serrins e turfas, contrariamente a outras, em que a disponibilidade é grande como a palha,

borras de café, grão inteiro, espigas de milho e algodão. Para impulsionar a disponibilidade das fontes de carbono deve-se triturar o trigo, moer o grão, utilizar farelo de trigo, fibras celulósicas e açúcar. Relativamente às fontes de azoto, deve-se evitar o uso exagerado de soja, farelo de trigo, sementes de girassol e ureia (dependendo da espécie de cogumelo) [58].

No que diz respeito às fontes de gordura como soja, sementes de girassol, desperdícios de amendoins e algodão, estas originam cogumelos mais pesados e saudáveis. Outro elemento que é fundamental no desenvolvimento do fungo é o azoto, que é indispensável ao crescimento de todos os organismos, sendo necessário na síntese dos ácidos nucleicos e das proteínas. Este é ainda um importante constituinte da quitina da parede celular dos cogumelos. [59]

6.2.3 Mistura dos ingredientes

Na mistura dos ingredientes é preciso ter em atenção que a disponibilidade em aprovisionamento das matérias-primas é constante ao longo de todo o ano, e que a qualidade se mantém, assim como a granulometria, estrutura e capacidade de retenção de água. A mistura deve ser feita da forma mais uniforme possível, pois o transporte de célula para célula consome energia e provoca a diminuição do rendimento. Substratos misturados de forma desigual resultam num rendimento irregular e a parte mais pequena do substrato é a representação do substrato como um todo. Para evitar que as matérias-primas sejam mal misturadas é necessário proceder a vários passos, nomeadamente, a mistura das matérias-primas em seco, e após esta se encontrar homogénea, continuar com a mistura por mais 5 minutos, garantindo assim que, de facto, se mantém a homogeneidade. Posteriormente humidifica-se a mistura, procedendo à homogeneidade novamente, sendo, assim, a água a última matéria-prima a ser adicionada [58].

A agitação deve ser feita da forma mais suave possível, pois a escolha de más ferramentas para agitação e com uma agitação elevada, a estrutura do substrato fica destruída. Uma estrutura fina de substrato tem falta de oxigénio, logo o crescimento miceliar é lento. Para ser possível uma agitação correta, é necessário cumprir alguns requisitos, como o uso de um agitador adequado, como um agitador helicoidal, tendo o cuidado de não preencher demasiado o agitador, pois implicará uma má mistura e a estrutura é destruída. Assim, é necessário usar uma velocidade de agitação baixa [58].

6.2.4 Humidificação do substrato

A humidificação do substrato é feita pela adição de água na superfície, especialmente com agitadores de grandes dimensões, pois diminui o tempo de agitação e mantém uma boa estrutura. Para se saber a quantidade de água que se deve adicionar ao substrato, é necessário calcular e medir para cada substrato esse valor, para que os resultados sejam consistentes.

Deve existir uma rotina diária com um balanço/controlo através da desidratação dos compostos. Quando se mede a quantidade de água existente em algumas matérias-primas, como serrim, é preciso existir uma amostra bem representativa. A quantidade ótima de água que se adiciona ao substrato depende do tipo de substrato, da espécie de cogumelo, do tamanho do substrato e das condições climáticas. Existem indicações que mostram que a quantidade de água no substrato está em excesso, tais como o crescimento micelial ser lento no fundo do saco e a escorrência de água fora do substrato [60].

Recorrer ao uso de água quente tem vantagens e desvantagens. A água quente é absorvida mais facilmente, não implica problemas quando os grãos estão inteiros e o aquecimento da autoclave é mais rápido. Em contrapartida, aumenta a atividade microbiana, agrega alguns tipos de grão, como o milho, diminui o tempo de espera entre a agitação e a esterilização e amolece a estrutura do substrato, logo a agitação suave será mais difícil. Devido a todas as desvantagens existentes, é preferível recorrer a água fria. A água utilizada para a elaboração dos substratos não necessita ser potável, pelo que podem ser usadas água de poço, de rio, de lago, de furo, de chuva, entre outros [60].

6.2.5 Importância da autoclavagem

A autoclavagem consiste num tratamento térmico utilizado na produção de substrato, de forma a eliminar ou diminuir a carga microbiana, sendo, por isso, um tratamento imprescindível na produção de cogumelos [61].

No momento em que se inicia a mistura das matérias-primas húmidas inicia-se a atividade microbiana. Assim sendo, o tempo entre a agitação das matérias-primas e a colocação dos recipientes na autoclave deve ser o mais curto possível. Os equipamentos devem ser limpos de forma muito cuidada, pois os detritos atraem contaminantes que infetam os substratos antes do tratamento térmico [61].

É possível recorrer a dois processos a fim de eliminar organismos vivos no substrato: a esterilização, que confere uma eliminação total de todos os organismos vivos, e a pasteurização, que apenas reduz o número desses organismos [61].

A pasteurização atua numa gama de temperaturas entre 60 °C a 90 °C durante o tempo necessário para a redução pretendida da contaminação inicial. A esterilização, por sua vez, é efetuada a 121 °C. O tempo de esterilização depende do nível de contaminação do substrato e da quantidade de massa total a ser esterilizada, pois quanto maior for a massa de substrato, mais tempo demorará a atingir a temperatura desejada, dependendo da potência do gerador de vapor. De modo a verificar se a temperatura de 121 °C atingiu o centro, pode-se colocar uma fita de autoclave no centro, passando esta a ter como único propósito servir de indicador. Na Figura 23 é apresentado um esquema genérico, onde se pode observar que a temperatura na autoclave não é a mesma temperatura que se encontra dentro do saco ao longo do processo de esterilização. Por esse motivo, é necessário diferentes tempos de esterilização consoante o produto que se esteja a tratar. Assim, é necessário medir a temperatura dentro do produto em questão [61].

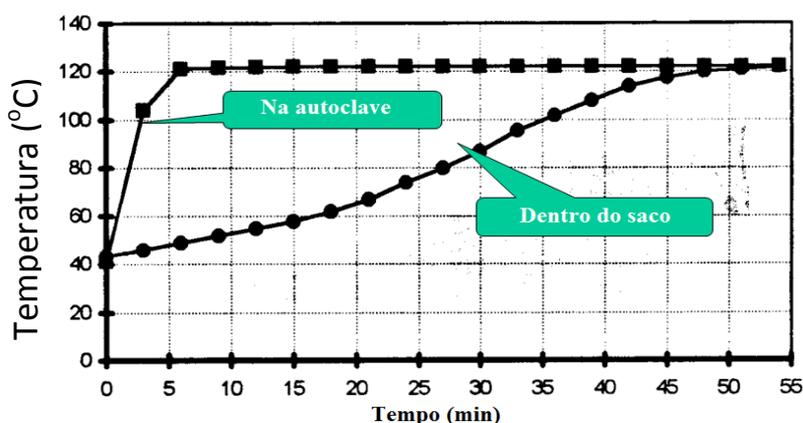


Figura 23: Temperatura ao longo do tempo num processo de autoclavagem. Adaptado de [61].

Durante o tratamento térmico, é necessário ter em atenção alguns aspetos que se podem traduzir em problemas quando não são bem realizados, nomeadamente, a posição na autoclave, pois se o material se encontrar demasiado empilhado, a transferência de calor será lenta, pelo que se deve manter um espaço de 5 mm a 10 mm entre os sacos na autoclave. Idealmente, os sacos ou os fracos não se devem tocar uns nos outros [61].

É necessário ter especial cuidado com a recontaminação durante o arrefecimento do substrato. Durante a esterilização, a atmosfera dentro da autoclave é composta por vapor saturado.

Durante o arrefecimento, esse vapor condensa e cria vácuo. O ar não esterilizado é sugado, o que pode proporcionar a recontaminação do substrato. Deste modo, é importante manter o ar esterilizado durante o arrefecimento do substrato [62].

Outro fator a ter em consideração é o tipo de água a utilizar, pois água não tratada poderá danificar o equipamento utilizado para produzir vapor. Assim, deve-se recorrer a água desmineralizada ou a água tratada por osmose inversa [62].

A autoclavagem não é eficaz perante algumas situações, nomeadamente, se a densidade do substrato for demasiado alta (superior a 0,7 kg/L), se existir água livre na parte inferior do saco ou do frasco utilizado, se a medição de temperatura apresentar uma oscilação de exatidão de 0,1 °C e caso o filtro se encontre bloqueado, pelo que é necessário ter em extrema atenção todos estes aspetos, de forma a poder obter uma eficaz esterilização [61]

6.2.6 Arrefecimento

O arrefecimento após a esterilização deve ser efetuado com a libertação lenta da pressão na autoclave. A autoclave deve ser descarregada num sítio limpo e esse espaço deve estar no máximo a 25 °C. Pequenas quantidades de substrato arrefecem até à temperatura ambiente em menos de 24 horas. Para arrefecer grandes quantidades de substrato é necessário a existência de um sistema de arrefecimento, como autoclaves com circuito de arrefecimento, através da passagem de água fria. Alternativamente pode introduzir-se ar fresco na sala proveniente do exterior, no entanto, é necessário ser sempre ar limpo, recorrendo, por exemplo, a filtros HEPA [60].

6.2.7 Inoculação

Para o processo de inoculação é necessária a existência de filtros HEPA, fluxo laminar do ar (40 a 50 cm/s), farda limpa e completa (luvas de borracha desinfetadas, máscara cirúrgica, roupa de proteção, sapatos muito limpos e pessoas limpas), garantindo que a maior parte da pele não fique exposta. Um exemplo de um fato para utilizar no momento da inoculação pode ser visualizado na Figura 24. No momento da colocação do *spawn*, desinfetam-se os sacos de *spawn* com isopropanol a 70 % e colocam-se num local com ar filtrado com filtro HEPA. O *spawn* é posteriormente quebrado com as mãos ou de forma suave com um martelo de borracha [57].



Figura 24 – Exemplo de um fato para ser utilizado na inoculação de substratos.

Após a quebra do *spawn*, desinfeta-se novamente a superfície dos sacos e abrem-se os sacos sob fluxo laminar do ar. Os sacos de substrato são abertos também em condição de fluxo laminar do ar e coloca-se o *spawn* no topo do substrato. O saco é selado e pressionado para confirmar que ficou bem fechado. Para uma colonização uniforme, agita-se o saco ou coloca-se num tambor de agitação [57].

6.2.8 Incubação

Na fase de incubação é necessário ter em atenção, essencialmente, três parâmetros: a temperatura, a humidade relativa e o dióxido de carbono.

Um fator muito importante nesta etapa é certificar que todos os substratos do espaço de incubação possuem sempre as mesmas condições. Isto permite que todos os substratos comuns se encontrem na mesma fase, em simultâneo, e permite prever a quantidade e o tempo de produção. Para tal, é também importante identificar os lotes de produção e armazená-los separadamente [50].

6.2.8.1 Armazenamento dos substratos

O empilhamento dos substratos para seguirem para a incubação depende do tipo de produção e da forma de funcionamento da empresa, sendo realizado de forma a que este processo seja o mais simplificado possível. O uso de estantes móveis possibilita a deslocação com mais facilidade dos substratos para a zona de incubação. Estantes com rodas são um modelo económico, de fácil movimentação por uma pessoa ou com empilhador para distâncias superiores. Os sacos devem ficar espaçados entre eles quando são colocados nas prateleiras, porque durante a incubação o desenvolvimento de calor pode prejudicar o substrato. Todos os substratos devem ser identificados com todas as informações relevantes, minimizando os

esquecimentos possíveis. A etiqueta de identificação deve conter: data de produção, espécies ou estirpe, lote do *spawn*, data em que o substrato deverá estar pronto para ser usado e referência do substrato, de forma a facilitar todo o controlo de *stocks* [50].

6.2.8.2 Temperatura

Na primeira etapa da fase de incubação, opta-se por manter a temperatura no limite máximo aconselhado, mas é necessário ter em atenção que existe apenas uma linha ténue entre a temperatura ótima e um dano térmico irreversível. Assim, devido ao processo metabólico do micélio, vai-se diminuindo a temperatura da climatização ao longo do tempo. A temperatura no interior do saco de substrato pode ser entre 2 °C a 10 °C superior à temperatura da sala de incubação, mediante o peso do substrato, podendo variar aproximadamente 2 °C nos sacos de menores dimensão (1 kg), e de aproximadamente 10 °C nos sacos de maiores dimensões (5 kg) [50].

O desenvolvimento do calor no substrato pode depender de vários fatores, nomeadamente, da constituição do próprio substrato, do tipo de recipiente e da temperatura do ar envolvente. Quanto mais denso for o substrato e quanto mais finas forem as partículas, maior é a área de contacto, pelo que maior será o calor produzido. Em relação ao recipiente, quanto maior for, maior será a temperatura no centro do substrato, onde, conseqüentemente, maior será o abaixamento de temperatura necessário a aplicar [50].

Caso a temperatura se encontre demasiado baixa (abaixo dos 20 °C), pode induzir o crescimento precoce dos primórdios e estes acabam por morrer quando o saco é aberto, ou no caso de os sacos ainda estarem fechados, os primórdios entram em decadência. Caso a temperatura do substrato atinja temperaturas acima dos 40 °C num espaço de tempo prolongado (acima das 72 horas), o micélio danifica-se irreversivelmente. No entanto, temperaturas altas levam a um metabolismo mais acelerado, proporcionando maior produção de calor e promovendo também um gradiente de temperaturas entre a superfície e o centro do substrato. O gradiente de temperaturas leva a que a superfície do substrato amadureça mais rapidamente do que o centro, podendo induzir em erro o estado de incubação do substrato [50].

6.2.8.3 Humidade

A humidade presente no ar da sala de incubação não é tão crítica como a temperatura. É importante manter a humidade constante para uma boa incubação e ter em atenção que o

aumento da temperatura provocado pelo processo metabólico do micélio diminui a humidade relativa, pelo que é necessário controlar estes dois parâmetros. É aconselhável manter a HR compreendida entre 60 % a 85 %, pois valores superiores a 90 % poderão provocar o crescimento de contaminações nas superfícies plásticas ou nos filtros.

Quando uma produção é atingida por contaminações fúngicas, uma das soluções é o abaixamento da humidade, não diminuindo mais que os 60 %, pois o micélio decresce a sua velocidade de crescimento, mas não se danifica; os fungos invasores, por sua vez, têm tendência a enfraquecer, pois a humidade está diretamente relacionada com a sua proliferação, assim, o micélio consegue combatê-lo e acabar por proliferar.

Na fase de amadurecimento miceliar, um baixo valor de humidade pode prevenir o aparecimento de primórdios, enquanto um alto valor de humidade pode promover o crescimento prematuro dos primórdios através dos filtros, provocando a diminuição do rendimento da produção ou o crescimento de cogumelos deformados. Para baixar a humidade coloca-se ar novo na sala e para aumentar a humidade pode-se utilizar humidificador ultrassónico, vapor, aspersores de elevada pressão, entre outros [50].

6.2.8.4 Dióxido de carbono

A concentração de dióxido de carbono raramente é um ponto crítico na sala de incubação. Para sacos padrão é aconselhável o uso de 3000 ppm a 5000 ppm. No entanto, não é um parâmetro que necessite de ser controlado na fase de incubação. É necessário ter cuidado pois concentrações superiores a 20000 ppm de CO₂ no ar podem dificultar significativamente a respiração dos trabalhadores. Acima de 80000 pode ser letal em menos de 30 minutos [50].

Uma concentração elevada de CO₂ pode impedir o crescimento dos primórdios, enquanto uma baixa concentração induz o seu crescimento. Assim, a presença de quantidades elevadas de CO₂ poderá ajudar a impedir o desenvolvimento precoce dos primórdios e o consequente crescimento irregular.

6.2.8.5 Luz

A maioria dos cogumelos não necessita de luz durante o processo de incubação, permanecendo sempre na escuridão. A luz é apenas necessária na altura de avaliação da existência de contaminações e do crescimento miceliar.

6.2.8.6 Limpeza

As salas de incubação devem ser limpas e desinfetadas antes do enchimento, logo não devem ser usadas consecutivamente. Com o uso consecutivo das salas de incubação podem surgir manchas de sujeira nos filtros, aparecimento de contaminações, entre outros, pelo que é crucial a desinfecção entre a troca dos sacos.

6.2.9 Frutificação

A fase da frutificação pode ser dividida em quatro partes: indução dos primórdios, crescimento dos primórdios, crescimento dos cogumelos e amadurecimento dos cogumelos.

Os primórdios podem ser induzidos através de choque mecânico (como arranhar a superfície onde os primórdios se irão desenvolver ou exercer uma força física em todo o substrato), mudanças de temperatura, exposição ao oxigénio causando a diminuição da concentração de dióxido de carbono e, por vezes, de forma espontânea. Após o choque para o desenvolvimento de primórdios, o micélio fica preparado para produzir cogumelos, pois os primórdios já conseguem ter as condições ideais que necessitam para se desenvolverem.

No crescimento dos primórdios é necessário luz em fotoperíodo e humidade relativa elevada. Relativamente ao dióxido de carbono, se a sua concentração for elevada promove o aparecimento de muitos primórdios, no entanto, os cogumelos são mais pequenos, em contrapartida, se a sua concentração for baixa, produzem-se menos primórdios, no entanto os cogumelos são maiores. Cada espécie tem a sua concentração de dióxido de carbono ideal, sendo necessário um estudo prévio de aperfeiçoamento da sua quantidade.

Geralmente, para o crescimento dos cogumelos continua-se com o fotoperíodo, baixa-se a humidade relativa e realiza-se trocas de ar, de modo a baixar a concentração de dióxido de carbono. As condições ambientais influenciam na forma e na qualidade dos cogumelos. No seu amadurecimento, grande parte destes necessitam de luz, a humidade relativa depende da estirpe, a diminuição lenta da temperatura (1 °C/dia) melhora o rendimento e a qualidade (não é generalizado para todas as estirpes) e a concentração de dióxido de carbono é fundamental na forma do cogumelo desejada, pois a concentração de dióxido de carbono influencia na dimensão do pé e do chapéu do cogumelo.

6.3 Produção em tronco

A produção de cogumelos em tronco contempla uma série de etapas, nomeadamente, a seleção e corte da madeira, a perfuração, a inoculação e a incubação dos troncos, a indução da formação dos cogumelos com choque térmico e mecânico quando necessário e a colheita dos cogumelos após a frutificação.

A madeira utilizada pode ser de vários tipos, com a exceção de madeiras resinosas e fruteiras. Na Tabela 5 são apresentados os tipos de madeira que podem ser utilizados e os respetivos períodos de incubação e períodos de frutificação.

Tabela 5: Período de incubação de *Lentinus edodes* e frutificação de acordo com o tipo de madeira
Tempo de incubação (t_i), tempo de frutificação (t_f)

Tipo de madeira	$\frac{t_i}{\text{meses}}$	$\frac{t_f}{\text{anos}}$
Choupo, Eucalipto	6	3
Castanheiro, Carvalho	9 a 12	4 a 5
Sobreiro, Azinheira	18	5 a 6

Conforme pode ser verificado, o tipo de madeira é que define o período de incubação, que poderá estar compreendido entre 6 a 18 meses, correspondendo ao tempo que demorará a atingir a primeira frutificação. O período de frutificação do castanheiro e carvalho é maior, como pode ser constatado na tabela, no entanto, isto não significa que dará mais produção, somente indica que dará o mesmo rendimento num período maior de tempo. Globalmente, obtém-se 15 % de peso de cogumelos face ao peso da madeira.

O inóculo utilizado para a migração do micélio para o tronco denomina-se de *pellets*, tal como explicado no ponto 6.1- Produção do inóculo, que consistem em cavilhas, tal como apresentado na Figura 25 inoculadas com o fungo pretendido, denominados, somente a partir desta fase, de *pellets*.



Figura 25: Cavilhas.

7. Do laboratório à Industrialização

Uma boa produção de cogumelos ocorre perante boas condições, que apenas são conseguidas através de, primeiramente, uma boa construção do espaço envolvente. Para tal, é necessário ter em consideração algumas técnicas de construção, nomeadamente, no que se refere aos materiais de construção, à eletricidade, ao abastecimento de água e às águas residuais.

7.1 Técnicas de construção

O clima dentro de um espaço apenas pode ser controlado se tiver um bom isolamento e portas herméticas. Caso isto não se verifique, o edifício acabará por controlar o clima [54].

O sistema padrão nas indústrias é constituído por painéis *sandwich* que proporcionam um bom isolamento, portas herméticas, piso de cimento liso, que facilita a limpeza, e a construção recorre a estruturas de aço. Nas salas interiores, é aconselhável o uso de painéis de poliuretano, painéis de poliestireno de célula fechada ou estufas com isolamento [63].

As estufas de produção de cogumelos devem ser constituídas por três camadas de construção, conter uma película plástica resistente aos raios UV, 18 cm de isolamento de lã de rocha e, por fim, um filme plástico branco [63].

De modo a evitar alguns problemas neste campo, é aconselhável o uso de lâmpadas de limpeza fácil e resistentes à água e interruptores de luz em todas as áreas e tomadas, mantendo-as sempre limpas. Todos os cabos elétricos e os tubos de água têm de estar posicionados no teto, de modo a facilitar a limpeza da restante sala. As tomadas e interruptores, por sua vez, devem estar na parte inferior do edifício [63].

É aconselhável nunca usar o mesmo canal para o cabo de alimentação e o cabo de rede de unidades de computador ou de controlo. É necessário manter uma distância de pelo menos 1 m entre o cabo de rede e o cabo conversor de frequência (para o motor); e nunca se deve limpar a caixa de controlo com limpeza a alta pressão, com consequência de danificar o equipamento [63].

É necessário ter uma limpeza acrescida nos sensores de medição de humidade nas salas de frutificação, pois estes são absolutamente desnecessários quando estão cobertos de esporos. Se possível, é aconselhável manter o máximo de elementos elétricos fora da sala de frutificação [58].

7.2 Abastecimento de água

A água é necessária em várias fases do processo, nomeadamente, como ingrediente na preparação do substrato, para limpeza, humidificação do ar, propósitos sanitários e água potável. Pode-se recorrer à água subterrânea para limpeza e para a preparação do substrato. Para todas as outras fases, usa-se a água da torneira [63].

Para a humidificação do substrato, assim como para a limpeza, é necessário uma quantidade grande de água num curto espaço de tempo, pelo que, quando a água disponível não é suficiente, é necessário recorrer a armazenamento de água em tanques e a bombas com capacidade de um grande caudal. A água subterrânea pode conter uma grande quantidade de ferro, que, juntamente com o oxigênio, pode danificar os tubos com a ocorrência de oxidação. Assim, é normal que todas as superfícies em contacto com esta adquiram a coloração acastanhada [63].

7.3 Águas residuais

Todas as etapas de limpeza, tal como a limpeza das máquinas de substrato (liquidificador, enchimento), das salas de produção de substrato e das salas de frutificação, utilizam grandes quantidades de água que necessitam de tratamentos. Estas águas contêm nutrientes e partículas de madeira, que facilmente se acomodam nas tubulações. Assim, é necessário uma fossa, que arrecade um grande volume de água e respetivo tratamento [63].

7.4 Suportes e prateleiras

São inúmeros os suportes e sistemas de prateleiras possíveis para o cultivo de cogumelos. Para pequenos produtores, há várias formas de improvisar na disposição do cultivo, de forma a rentabilizar o espaço disponível.

Os suportes e as prateleiras são necessários nas várias fases de produção de cogumelos, nomeadamente, na incubação, frutificação e autoclavagem, e estes sistemas necessitam de respeitar alguns critérios, de forma a demonstrarem-se eficientes [64].

7.4.1 Incubação

Na etapa de incubação, os suportes e prateleiras necessitam de ser facilmente móveis, manualmente ou recorrendo a empilhadores. Estes devem facilitar a colocação do substrato na prateleira e permitir um espaçamento entre eles. Fisicamente, devem ser resistentes, empilháveis e com uma duração de vida longa [63].

Uma possibilidade de uso é o carrinho dinamarquês de flores, que pode ser visualizado no ponto (a) da Figura 26, que foi desenvolvido por jardineiros com o intuito de transportar flores em vasos. Na figura pode-se observar 800 kg de substratos movidos pela força humana, traduzindo a facilidade de transporte que estes proporcionam. No entanto, este tem como desvantagem não permitir a sua colocação em pilha [64].

Uma outra opção são as caixas empilháveis, ilustradas no ponto (b) da Figura 26. Estas são de valor económico mais elevado, no entanto, são mais facilmente limpas e de fácil utilização, podendo ser empilhadas da forma moldável ao espaço disponível. Contudo, dificulta a sua movimentação manual [64].

Pode-se recorrer também a prateleiras de madeira tal como indicado no ponto (c) da Figura 26. São prateleiras baratas e de fácil construção, no entanto, não é possível movê-las manualmente nem por empilhadores, nem são de fácil colocação do substrato, manual ou automaticamente. Além disso, não são empilháveis e são mais difíceis de limpar, acumulando mais facilmente microrganismos, dado a sua porosidade [64].

Pode-se realizar, ainda, construções individuais de prateleiras com rodas (ponto d da Figura 26). No entanto, estas são de valor económico elevado e não permitem empilhar, quer estejam cheias ou vazias. Uma outra opção são as prateleiras metálicas ou de plástico empilháveis, ilustradas no ponto (e) da figura anterior. São construções maioritariamente individuais, de fácil construção e de baixo valor económico. Apresentam a desvantagem de não permitirem ser movidas manualmente [64].

Os pequenos tabuleiros em prateleiras metálicas são outra solução possível. No entanto, podem tornar-se pesados, dificultando o movimento manual. Estes tabuleiros não apresentam a forma necessária para permitir o movimento por empilhadores. Deste modo, também não é fácil colocar o substrato por meio de um sistema automático [64].

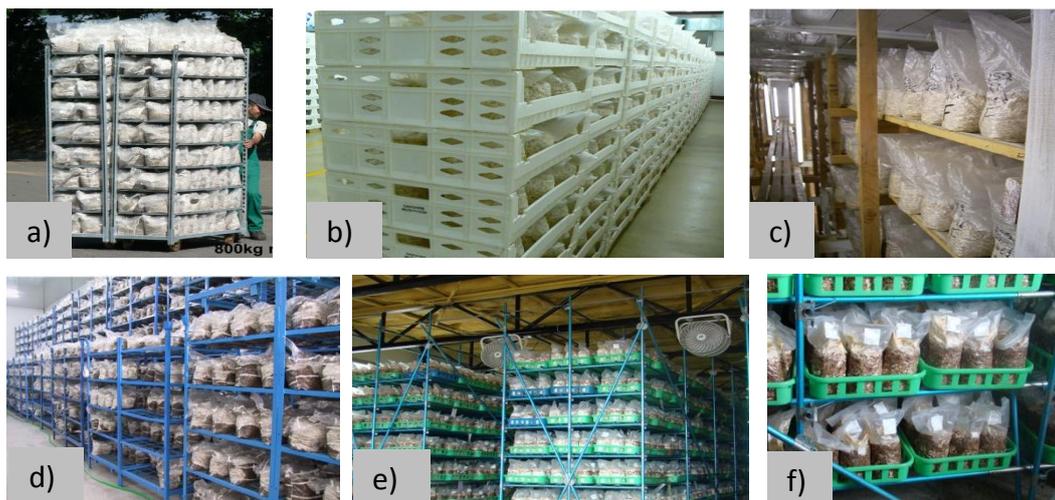


Figura 26: a) Carrinho dinamarquês; b) Caixas empilháveis; c) Prateleiras de madeira; d) construções individuais de prateleiras com rodas. Adaptado de [63].

No sistema de frascos, pode-se utilizar frascos empilhados em tabuleiros. Este é o sistema padrão no Japão e na Coreia. Este sistema tem como desvantagem não permitir o movimento manual [63].

7.4.2 Frutificação

No espaço da frutificação, as prateleiras devem proporcionar um bom arejamento, facilitar a colocação dos substratos nas prateleiras de forma ordenada, serem resistentes à água, de fácil limpeza e desinfecção e terem um tempo de vida longo.

Os carrinhos dinamarqueses para flores, mencionados anteriormente, também podem ser utilizados na etapa de frutificação. No entanto, estes não são de fácil limpeza. Um outro sistema possível de adotar são as prateleiras de tubos metálicos, ilustradas no ponto (a) da Figura 27. São de baixo valor económico e de fácil construção, não apresentando desvantagens significativas, sendo, por isso, bastante aconselháveis.

As prateleiras de madeira também são um recurso possível, sendo baratas e de fácil construção e facilmente moldáveis ao espaço disponível. Apresentam várias desvantagens, nomeadamente a falta de resistência à água, o tempo curto de vida, não são de fácil limpeza e, por vezes, proporcionam um arejamento insuficiente, dependendo da construção.

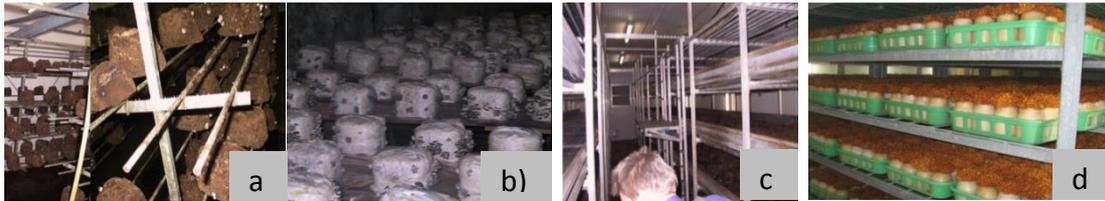


Figura 27: Prateleiras e suportes utilizados na frutificação. a) Prateleiras de tubos metálicos, utilizados na frutificação; b) Prateleiras de madeira; c) Prateleiras holandesas de botão branco; d) Prateleiras de aço usados no sistema de frascos. Adaptado de [64].

O mercado oferece também as prateleiras holandesas de botão branco. Este é um sistema padrão para o crescimento do cogumelo *A. bisporus*, mas pode também ser adaptado a outro tipo de cogumelos. Quando é utilizado o sistema de frascos, pode-se empregar as prateleiras de aço e os frascos em tabuleiros, sendo este o sistema padrão no Japão e na Coreia. Este é um sistema dispendioso mas bastante eficiente [63].

7.5 Técnicas de frutificação

Para se obter uma boa frutificação é crucial ter em atenção alguns aspetos, nomeadamente, os sistemas de ventilação, humidificação e higiene.

7.5.1 Sistemas de ventilação

O sistema de ventilação mais simples é a estufa sem paredes. Este sistema só deverá ser utilizado quando as condições de temperatura e humidade ambientais forem semelhantes às necessárias para a frutificação. É um sistema que varia diretamente com a região, pelo que pode funcionar numa zona geográfica, mas não ser eficiente noutra zona. Assim, é necessário um estudo prévio das variações climatéricas, altitude, ventilação, de modo a averiguar a fiabilidade deste sistema. O ideal é experimentar uma quantidade pequena de produção inicial, e só depois de haver certeza que funciona, extrapolar-se para uma produção superior. É necessário ter sempre em conta que este sistema é muito mais propício ao aparecimento de contaminações e pragas. É um sistema associado à produção em tronco, dado que é inviável utilizá-lo numa produção em substrato [60].

Outro sistema bastante simples é a utilização apenas dum ventilador. O ar já existente na sala é forçado a circular, proveniente de um único ponto, a uma velocidade bastante elevada e, por conseguinte, de forma desigual. Este tipo de ventilação não é compatível com a maioria dos cogumelos, pelo que é necessário implementar um sistema capaz de ventilar a sala de forma uniforme [63].

O sistema de ventilação ideal consiste numa unidade de controlo do clima, composta por um ventilador, associado a um controlo de temperatura e humidade, humidificação e recirculação do ar, condutas de ventilação com saídas direcionadas horizontal ou verticalmente e um computador central [63].

7.5.2 Sistemas de humidificação

A humidificação pode ser feita simplesmente através da rega do chão e das paredes da sala de cultivo, a intervalos de tempo regulares. Existem, no entanto, várias soluções técnicas no mercado, capazes de corresponder às necessidades das salas de produção, garantindo uma humificação mais uniforme e, paralelamente, reduzindo significativamente o número de pragas. Assim é porque a rega no chão e paredes poderá originar acumulações de águas paradas, atraindo contaminações e pragas. Neste sentido, é fundamental recorrer a sistemas de humificação que não danifiquem o cogumelo, não originem acumulações de água parada e mantenham a uniformidade de humidade na sala, não proporcionando excessos de humidade numa secção da sala e défices noutra [50].

7.5.2.1 Pentas de humidificação

Este sistema é mais utilizado para arrefecimento de um clima quente e seco, em substituição da sua humidificação. A principal desvantagem reside no facto de não ser possível controlar os níveis de humidade [50].

7.5.2.2 Sistema gota-a-gota

Neste sistema pode ser utilizada água da torneira, a uma pressão que varia entre os 3 e os 8bar. Pode ser classificado como um sistema barato, mas ineficiente, dado que a maioria da água não será aproveitada. Uma vez que as gotículas de água caem do teto, é necessário ter cuidado para que não caiam diretamente nos cogumelos e os danifiquem. Esta queda poderá ser propícia a acumulações de água, originando águas paradas. Estas águas propiciam o crescimento de mosquitos, pelo que exigem uma manutenção e limpeza constante [50].

7.5.2.3 Sistema de nebulização

Este sistema de humidificação utiliza gotículas finas de água desmineralizada, que se tornam difíceis de controlar. O uso deste tipo de água é aconselhado numa tentativa de diminuir a probabilidade de entupir os bocais (problema que acontece frequentemente quando secam). Na

montagem são necessários diversos equipamentos considerados dispendiosos, tais como uma bomba de água de alta pressão (40 bar a 80 bar), tubos e válvulas capazes de suportar esta pressão, que tornam o sistema caro. Desta forma, justifica-se a sua aplicação em grandes salas de cultivo ou a conjuntos razoáveis de salas. Este sistema tem a vantagem de não danificar o cogumelo no momento da frutificação, pois a nuvem criada é uniforme e não cai diretamente no cogumelo. Tem também a vantagem de evitar o surgimento de pragas, uma vez que não há excessos de humidade em secções da sala, devido ao facto da humidade se manter uniforme ao longo da sala de produção [50].

7.5.2.4 Vaporizador de ar comprimido

Assim como no sistema de nebulização, também neste são produzidas gotículas finas de água, com a vantagem de não serem necessários quaisquer tratamentos à água utilizada. O investimento é considerado de baixo valor, mas o ar comprimido necessário é bastante dispendioso, pelo que a sua aplicação é justificável apenas para pequenas salas de produção. Tem igualmente a vantagem de não danificar o cogumelo e de não aumentar o risco do surgimento de pragas [50] [65].

7.5.2.5 Vaporizador ultra sónico

O vaporizador ultra sónico é um sistema de valor económico elevado, mas eficaz porque produz gotas finas e é capaz de autorregulação. É o sistema mais indicado para humidade elevada (HR superior a 95 %), baixas trocas de ar, e para salas de menores dimensões. No Japão, este é o sistema padrão em salas com o uso de garrafas. Este sistema é apropriado para humidificação de salas frias e necessita de água amolecida e desmineralizada [50].



Figura 28: Vaporizador ultra sónico.

7.5.2.6 Disco vaporizador de alta velocidade de rotação

O sistema de disco vaporizador de alta velocidade de rotação é um sistema barato, comparativamente ao ultra sónico. Produz pequenas gotículas, através de apenas um ponto de saída, pelo que é difícil uma distribuição uniforme. Este sistema não necessita de manutenção intensiva [50].



Figura 29: Disco vaporizador de alta velocidade de rotação.

7.5.2.7 Vapor para humidificação

A humidificação através de vapor é um sistema padrão utilizado no crescimento do cogumelo *A. bisporus*. É um sistema de fácil controlo, mas apresenta um valor elevado de perda de energia e, conseqüentemente, custos elevados [50].

7.5.2.8 Controlo de humidade

Um sistema de baixo valor económico de controlo de humidade é a combinação de um humidificador com um higróstato. Esta combinação tem como desvantagem ser um sistema de apenas ON/OFF, sem regulação e propício a aparecimento do fenómeno de histerese. É necessário calibrar este equipamento frequentemente [50].

Um sistema padrão do crescimento do cogumelo *A. bisporus* é a medição de humidade através de bolbo húmido/bolbo seco. Este sistema mede a temperatura do termómetro húmido e do termómetro seco. Esta diferença é proporcional ao défice de humidade no ar. De seguida, um controlador eletrónico calcula a humidade do ar e controla a humidificação. É um sistema rápido, preciso e trabalha com humidades relativas entre 95 % e 100 %. Ele funciona mesmo com a presença de concentrações altas de esporos [50].

7.5.3 Regras de Higiene

Os cuidados de higiene são fundamentais na prevenção de pragas e doenças nas salas de cultivo e garantem também a qualidade dos cogumelos.

É necessário ter alguns cuidados simples, que podem evitar graves problemas, nomeadamente, nunca misturar substratos antigos com substratos novos na mesma sala de produção. As pragas e doenças presentes nos substratos mais velhos (como vírus e bactérias) podem ser propagadas, através dos esporos, para os substratos novos, contaminando-os [50] [65].

É crucial não misturar espécies de cogumelos diferentes numa única sala de produção. As espécies diferentes possuem fases de frutificação, amadurecimento e condições de temperatura e humidade diferentes. Esta mistura pode levar a uma diminuição dos rendimentos e da qualidade dos cogumelos [63].

No caso de existirem diferentes salas em fase de frutificação, deve começar-se a apanha pela sala que contem os substratos mais recentes. Caso contrário, os coletores tornam-se vetores de contaminação [63].

É importante entrar nas salas sempre com roupa lavada, de forma a não dispersar contaminações e usar um tapete de desinfecção à entrada de cada sala. É necessário limpar o chão todos os dias após a colheita de forma a evitar o apodrecimento dos cogumelos e dos substratos, pois aumentaria a probabilidade de surgir contaminações e pragas. É aconselhável recorrer a água e a um rodo de borracha na limpeza do chão, tal como indicado na Figura 30, de modo a escoar toda a água, evitando a acumulação de poças [63].

Caso ocorra o apodrecimento dos substratos, é necessário removê-los todos de uma só vez. Após a última frutificação, é preciso esvaziar completamente a sala, seguido de uma limpeza que elimine a carga microbiana da sala.



Figura 30: Limpeza do chão.

8. Pragas, contaminações e outros problemas: prevenção e soluções

A produção de cogumelos é uma área difícil devido a todos os problemas que podem surgir no decorrer da produção. Consequentemente, as condições de cultivo têm que ser rigorosas. O aparecimento de contaminações é muito propício, porque a competição entre microrganismos é muito elevada. Os produtores de cogumelos nem sempre estão cientificamente preparados para os produzir, o que dificulta a análise e resolução de alguns problemas que possam surgir.

Várias são as pragas e contaminações possíveis no cultivo de cogumelos, podendo estas englobar animais, fungos, bactérias, problemas químicos, problemas relacionados com o clima e contaminações por falhas técnicas, tais como os que são indicados na Tabela 6.

Tabela 6: Pragas, contaminações e outros problemas: prevenção e soluções

Contaminações, pragas e problemas	Animais	Moscas
		Mosca do cogumelo
		<i>Gall midge</i>
		Lesmas
		Ratos e Ratazanas
	Fungos e bolores	<i>Trichoderma</i>
		<i>Penicillium</i>
		<i>Neurospora crassa</i>
		Bolores de diferentes cores
		Fungos selvagens em troncos
	Bactérias	Bactérias no substrato
		Manchas de bactérias nos cogumelos
		Formação de biofilme no chão
	Problemas químicos	
	Problemas relacionados com o clima	Aparecimento de primórdios longos e finos
		Crescimento lateral dos cogumelos
		Infeções de trichoderma na sala de frutificação do cogumelo shiitake
		Crescimento dos primórdios nos sacos com substratos não maduros.
	Contaminações por falhas técnicas	Fornecimento insuficiente de vapor
		Fornecimento insuficiente de água
		Pequenos orifícios na parte inferior do saco de substrato

8.1 Animais

A mosca (*Drosophila spp*) e o mosquito de fungo preto (*Sciaridae spp*) são os insetos mais comuns nos substratos à base de serrim. Crescem ao longo de 3 semanas dependendo da temperatura e habitualmente alcançam dimensões entre 2 mm a 3 mm. São animais comuns em detritos, tais como substratos e/ou cogumelos velhos e deteriorados, substratos de *Lentinus edodes* infetados, de *Pleurotus djamor*, *Pleurotus cornucopiae* e *Agrocybe aegerita*. Prosperam em temperaturas superiores a 18 °C e em ambientes com humidade elevada, sendo propícios em longos ciclos de frutificação e ciclos de frutificação rotativos.

Estas pragas alimentam-se do micélio fraco e/ou podre, de substratos deteriorados e aproveitam-se das brânquias secas dos cogumelos. Deste modo, as moscas, em conjunto com as larvas, transmitem contaminações bacterianas.

Para evitar a ocorrência deste problema, é aconselhável manter sempre os espaços de cultivos limpos e as portas fechadas, temperaturas abaixo dos 18 °C, ciclos de frutificação pequenos e colocar mosquiteiros.

Outro inseto comum neste tipo de cultura é a mosca dos cogumelos, (*Iycoriella spp*, *Megaselia spp*, *Heteropeza spp*, *Mycophila spp*; *Mycophill spp*). É menos comum nos substratos à base de serrim, mas, contudo, existente. Geram em aproximadamente 2 a 3 semanas e atingem um tamanho de 4 mm a 5 mm. São comuns em madeiras secas de árvores mortas, em condições de humidade alta (cerca de 90 %), em cogumelos grandes e velhos e são proporcionados através da exposição ao meio externo, como janelas ou portas abertas.

Por vezes, após a limpeza da sala ficam gotas de água nas paredes favorecendo a reprodução deste animal. A mosca do cogumelo coloca os seus ovos nos corpos de frutificação de modo a proporcionar-lhes condições favoráveis de crescimento, dando origem às larvas. Estas, por sua vez, constroem buracos dentro dos corpos de frutificação e alimentam-se do micélio e dos jovens primórdios, causando, conseqüentemente, estragos significativos no cogumelo.

De modo a evitar o aparecimento deste inseto, é recomendável limpar o exterior envolvente, filtrar as entradas de ar, colocar redes mosquiteiras, realizar curtos ciclos de frutificação e remover quaisquer gotas de água que tendam a ficar nas paredes e teto após a limpeza que recorra à utilização de água em grandes quantidades.

Um outro inseto comum na produção de cogumelos, mas raro nos que recorrem a substratos à base de serrim, é o *gall midge* (*Cecidomyiidae*). Apresenta um tamanho de 2 mm a 3 mm e as suas larvas são cor de laranja. As larvas replicam-se por partenogénese, pelo que crescem de uma forma bastante rápida. Este inseto pode ocorrer devido a uma má pasteurização do substrato, em circunstâncias como portas abertas e entradas de ar e normalmente em cogumelos *Pleurotus spp.*. As suas larvas alimentam-se do micélio e, por vezes, do corpo de frutificação. É necessário um cuidado acrescido, devido à sua capacidade de se propagar rapidamente para outros espaços através de roupas e sapatos.

Para evitar a propagação deste inseto é necessário uma boa pasteurização ou esterilização do substrato, recorrer a substratos à base de madeira e descartar de uma só vez todas as culturas provenientes dos espaços infetados, seguido de limpeza e desinfeção de espaço e material.

As lesmas também representam um problema. Surgem normalmente devido a portas abertas, pelo que é necessário ter um cuidado acrescido em fechar todas as portas. As lesmas não se reproduzem em lugares regularmente limpos, sendo crucial uma limpeza contínua.

Por fim, os ratos e as ratazanas podem ser um grande problema em espaços de incubação de substratos. Crescem ao longo de 9 a 10 semanas e podem atingir os 10 cm a 30 cm de comprimento (sem a cauda). Estes roedores são mais propícios em espaços de incubação de grandes dimensões, em espaços sem movimento, em longos ciclos de incubação e têm maior ocorrência em substratos com grãos integrais. Estes animais são capazes de danificar grandes quantidades de sacos, rompendo-os, espalhando o seu conteúdo, assim como destruir troncos. Têm tendência a recolher pequenas quantidades de substrato e armazená-lo em esconderijos, aumentando o risco de contaminações [65].

De modo a evitar este problema, deve-se limpar e esvaziar frequentemente os espaços, fechar as portas e limpar os arredores dos espaços de cultivo. Pode-se ainda reforçar o controlo recorrendo a iscos tóxicos ou sistemas mais complexos de controlo de pragas [65].

8.2 Fungos e bolores

O aparecimento de fungos pode ser considerado um indicador de problemas no processo de cultivo.

O *Trichoderma*, um fungo com a coloração esverdeada, é uma das contaminações mais comuns que surge na produção de cogumelos. São propícios em substratos que contenham celulose, que tenham sofrido uma pasteurização incompleta, em lugares com detritos presentes na sala de cultivo, assim como filmes de plástico danificados. Este fungo desenvolve-se ao longo de 10 a 14 dias e a temperatura ótima de crescimento situa-se entre os 25 °C e os 30 °C, apesar que algumas das espécies podem crescer a temperaturas de 45 °C. O *Trichoderma sp.* é caracterizado pela produção de esporos em grande quantidade [66]. É um fungo que cresce de forma altamente ramificada e, desse modo, é difícil de definir e medir o grau de crescimento. Surge essencialmente em derivados de madeira nova, que contém ainda uma quantidade relativamente alta de hidratos de carbono. Outra característica do *Trichoderma* é o facto de se iniciar com um desenvolvimento prolífico de micélio branco e, após 2 a 4 dias, apresentar a coloração verde [67].

A produção de esporos dificulta a extração da contaminação, pois esta dificilmente é apenas localizada e a sua extração facilmente dispersa os esporos. A humidade elevada promove a proliferação deste fungo, o que torna crucial controlar este parâmetro. Por vezes, uma vez instalada esta contaminação, uma das formas de a combater passo por, após extração da contaminação, diminuir a humidade do ambiente envolvente até um valor que não danifique o micélio pretendido, mas, em simultâneo, é necessário que seja um abaixamento suficiente para a não proliferação da contaminação, acabando por desaparecer [68] [69].

Tendo por objetivo evitar este problema, é crucial efetuarem-se esterilizações e pasteurizações do substrato adequadamente, efetuar uma limpeza nos espaços de frutificação, verificar se os sacos de plástico utilizados se encontram danificados e manter os espaços de incubação limpos, recorrendo a filtrações nas entradas de ar [65].

Um outro problema que pode ocorrer é o aparecimento de *Penicillium*, que cresce ao longo de 3 a 4 dias, com um crescimento lento em pequenas colónias. Usualmente, exibem diferentes cores sendo na sua maioria verdes acinzentadas e, por vezes, verde amarelado ou totalmente cinzentos. São propícios em ambientes que apresentem ar húmido, manchas de filtro húmido, em *spawn* infetado e em superfícies sujas [65].

Este fungo apresenta ainda a habilidade de crescer numa nova colónia, na mais pequena fração do micélio, ocorrendo a esporulação em apenas poucos dias. Vive em substratos não

colonizados, ou em micélios fracos ou mortos e as superfícies húmidas e com pó são favoráveis ao seu crescimento, assim como os filtros quando o ar se encontra húmido. Para evitar o crescimento do *Penicillium*, é crucial filtrar o ar dos espaços de incubação, manter a humidade do ar baixa, secar os filtros e limpar o saco do *spawn* [65].

O *Neurospora crassa*, representado na Figura 31, é outro problema que pode surgir. Cresce ao longo de 4 a 10 dias e exibe um tempo de crescimento bastante rápido (acima dos 4 centímetros por dia) [65] [70].



Figura 31: *Neurospora crassa*. Adaptado de [65].

Os substratos que contêm açúcares e amido são os mais propícios ao crescimento do *N. crassa*. Podem surgir através de pequenos orifícios e podem crescer através do filtro para o exterior do saco, surgindo uma grande quantidade de esporos cor de laranja. Poeiras e humidade no espaço de armazenamento são fatores que proporcionam o seu crescimento. Este fungo coloniza apenas substratos esterilizados ou pasteurizados. Deste modo, os pequenos esporos procuram qualquer orifício de pequenas dimensões para infetar qualquer novo substrato que consigam alcançar [65].

Com recurso a evitar a contaminação, é necessário um especial cuidado na selagem do saco, verificar a integridade dos sacos e manter os espaços e superfícies limpos. Caso se verifique que um substrato se encontra contaminado, é necessário descartá-lo antes que ocorra a esporulação.

Existem também outros fungos, de diferentes espécies, que apresentam variadas cores, podendo abranger todas as cores do arco-íris, como representado na Figura 32. Com um tempo de geração compreendido entre 4 e 10 dias, estes podem apresentar um crescimento lento em pequenas colónias.



Figura 32: Diferentes fungos que contaminam os substratos.

Uma inoculação mal preparada, roupa de proteção não apropriada, detritos no espaço de crescimento, filtros molhados e a não desinfecção dos sacos de *spawn*, pode resultar no desenvolvimento de um destes fungos, pelo que o seu aparecimento, normalmente, está associado a falhas na sala de crescimento. Deste modo, é importante manter as salas extremamente limpas, os filtros secos, uma inoculação correta e roupas de proteção adequadas. É de igual importância a desinfecção dos sacos de *spawn* [65].

8.3 Bactérias

As bactérias como o *Bacillus spp.* são comuns nos substratos pasteurizados, pois este processo não consegue eliminar totalmente os esporos do *Bacillus*. Estas bactérias surgem em pasteurizações de substrato que ostentem um valor de pH alto, em substratos que não sofreram uma esterilização adequada (que não atinjam o centro do substrato). Também podem aparecer a temperaturas de incubação altas, em substratos com níveis de suplementação elevadas e com baixas quantidades de *spawn* para inoculação e nos cogumelos na altura da frutificação, tal como mostra a Figura 33.



Figura 33: Exemplos de cogumelos contaminados com bactérias. a) *Pleurotus eryngii*; b) *Pleurotus ostreatus*; c) *Lentinus edodes*.

Estas bactérias competem com o micélio, podendo suprimir o crescimento deste e produzem uma grande quantidade de calor, o que pode levar ao sobreaquecimento. As bactérias não produzem esporos, pelo que é mais fácil remover a zona contaminada sem contaminar a restante. São propícias em substratos ineficazmente pasteurizados e em micélios fracos. Surgem, especialmente, no tempo do crescimento dos primórdios, em ambientes com a

humidade do ar alta e na presença de água nos corpos de frutificação. Estes estragam os corpos de frutificação alterando-lhes a coloração e, por vezes, tornando-os viscosos. Conseguem parar o crescimento dos primórdios, tornando-se, assim, um sério perigo para o corpo de frutificação [65].

De forma a prevenir o aparecimento destas bactérias, é essencial uma pasteurização bem sucedida dos substratos, ventilação adequada com ar novo e filtrado, limpeza e desinfecção dos espaços de frutificação e cortar o corpo frutífero antes de ocorrer a esporulação, de modo a ter a quantidade mínima de esporos no ar quanto possível [65].

Estes aglomerados de bactérias são comuns nos espaços de frutificação húmidos, quando o chão se mantém húmido, pois o seu crescimento é favorecido pelo chão húmido e climas quentes e húmidos. Estas características tornam o chão escorregadio, o que pode levar a quedas. Estas bactérias utilizam a esporulação dos corpos de frutificação, fungos ou outras fontes de poeiras orgânicas. Para evitar o aparecimento deste biofilme, é crucial manter o chão limpo e seco, assim como todas as superfícies. É aconselhável recorrer a agentes de limpeza alcalinos [65].

8.4 Problemas Químicos

Os problemas químicos são traduzidos por manchas escuras, tal como pode ser observado na Figura 34, ou, por vezes azuladas, podendo aparecer 1 a 3 dias depois da colheita.



Figura 34: *Lentinus edodes* com problemas químicos.

Apresentam problemas essencialmente para a espécie *Lentinus edodes*, pois esta contém tanino e se houver contato com o ferro, ambos vão lentamente reagir com a tinta da bilis do tanino. É semelhante ao processo em que se formam as manchas de bactérias, mas não ocorre decadência. De modo a solucionar o ocorrido, é necessário encontrar a fonte de ferro (saída de vapor, água do poço contendo ferro, partículas de ferro no pó, entre outros) [65].

8.5 Contaminações técnicas

Durante a esterilização, um fornecimento insuficiente de vapor ou água, devido a ferrugens nas tubagens e a existência de orifícios finos na parte inferior do saco de substrato, são alguns dos fatores que podem causar contaminações. Tal ocorrência pode dever-se a canos danificados, os quais podem conter pequenas partes soltas e, ao colocar os sacos do substrato na autoclave, são danificados. Por conseguinte, é necessário ter muita atenção no processo de autoclavagem e observar se existe o aparecimento das partes soltas [65].

9. Materiais e Métodos

O crescimento pretendido de um cogumelo é um desafio constante, sendo o primeiro passo conseguir obter um micélio fortemente incubado, de forma a obter-se um bom rendimento. Para tal, efetua-se um isolamento do cogumelo numa placa de Petri com nutrientes específicos para o bom desenvolvimento miceliar, e após crescimento, efetua-se a produção do *spawn mother*, seguido do *spawn*. Estas etapas permitem o crescimento do micélio do cogumelo, proporcionando-lhe nutrientes e espaço necessário para a sua proliferação.

Durante todo este processo, os inimigos são impercetíveis e encontram-se em todos os lugares, e os competidores são rápidos e fortes, pelo que é crucial a existência de regras rígidas e uma constante verificação para se obter uma produção bem-sucedida.

Uma produção bem-sucedida depende de vários fatores, nomeadamente, da matéria-prima, do tratamento térmico, do fluxo de inoculação, tipo de embalagem, do volume de enchimento, da qualidade do *spawn*, do tempo de incubação, da higiene geral, das condições de crescimento e do clima.

De modo a garantir a qualidade do *spawn* é necessário seguir alguns critérios, principalmente, em relação à embalagem, que deve permitir trocas gasosas, garantindo a entrada de oxigénio no substrato. O substrato utilizado deve ser cuidadosamente esterilizado e o micélio deve ser proveniente de poucas repicagens, traduzindo-se num micélio o mais puro possível.

9.1 Preparação do inóculo

O início da produção de cogumelos inicia-se com a obtenção de micélio puro, que pode ser obtido através do isolamento do cogumelo.

Primeiramente, preparou-se o meio de cultura apropriado ao desenvolvimento miceliar usando *Potato, Dextrose, Agar* (PDA), juntando, para 1 L de solução, 24 g de *Potato Dextrose Broth* (PDB) com 15 g de agar, preenchendo com água destilada; agitou-se e esterilizou-se na autoclave, a 121 °C durante 20 min.

Tal como pode ser visualizado na Figura 35, após esterilização dividiu-se o meio por várias placas de Petri, dando 1 L de meio para aproximadamente 30 placas (\approx 30 mL em cada placa). Este procedimento é feito num ambiente estéril. Após arrefecimento, deixou-se as placas repousar ao longo de 2 semanas, garantindo que se encontravam ausentes de contaminações.



Figura 35: Preparação do meio de cultura para a preparação do inóculo.

De seguida, procedeu-se ao isolamento de uma porção do cogumelo, que deve ser feito num cogumelo jovem sem sinais evidentes de colonização por larvas e de desidratação, devendo ser realizado entre 24 a 48 horas após a colheita. O isolamento pode ser executado a partir de qualquer parte do cogumelo, mas recomenda-se que o fragmento a isolar seja retirado do chapéu sempre que possível, por apresentar menor probabilidade de contaminação, dado que, na maioria das vezes, é carnudo.

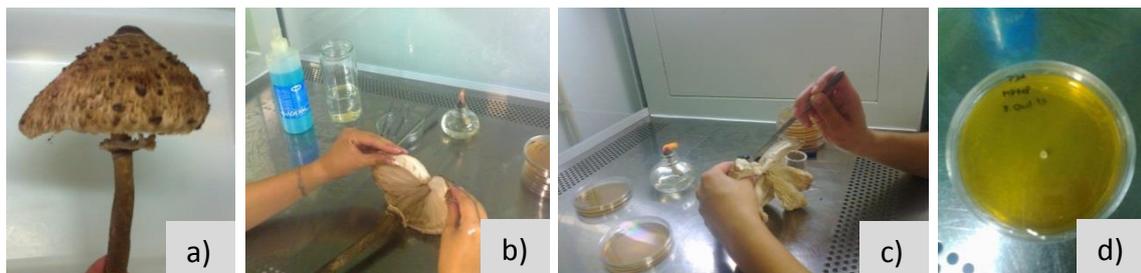


Figura 36: Isolamento do cogumelo. a) *Macrolepiota procera* silvestre; b) Abertura do cogumelo em meio de assepsia; c) Corte da parte interior do chapéu; d) Colocação da porção retirada numa placa de Petri.

De seguida, colocou-se essa parte do cogumelo, com cerca de 5 mm numa placa de Petri com PDA, sempre em condições estéreis, e, por fim, deixou-se crescer o fungo a 19 °C. As placas obtidas, após finalização de incubação, que é diferente para as diferentes espécies de cogumelos, será viável durante 6 a 12 meses desde que armazenadas no frio.

O micélio proveniente do isolamento de uma porção de cogumelo pode ainda ser repicado e dar origem a novas placas de Petri com micélio, pelo que, quando a placa se encontrou totalmente preenchida pelo fungo, dividiu-se em 20 partes aproximadamente iguais, de forma a proceder-se à sua multiplicação, colocando cada uma das partes numa placa de Petri com meio PDA. Ou seja, cada placa de isolamento de cogumelo deu origem a 20 placas. De seguida, proporcionando a temperatura ótima de crescimento de 19 °C, deixa-se o fungo crescer.

9.2 Produção do *spawn mother*

A preparação do *spawn mother* iniciou-se pelo enchimento dum recipiente, com aproximadamente 330 mL, com grão de trigo previamente humedecido em água ao longo de 24 horas, até cerca de 70 % a 80 % do seu volume. Adicionou-se 1 % de carbonato de cálcio de forma a aumentar o pH, e tapou-se o recipiente com uma pequena película de algodão, que permitirá mais tarde o fungo estabelecer as trocas gasosas necessárias. De seguida, esterilizou-se o preparado a 120 °C durante 90 min.



Posteriormente, dividiu-se o micélio que se encontrava na placa de Petri que continha o fungo multiplicado e desenvolvido, em 4 partes iguais. Dividiu-se $\frac{1}{4}$ da placa em fragmentos de menores dimensões e, após o arrefecimento do recipiente que contém o cereal, colocou-se esses mesmos fragmentos no frasco. A divisão dos fragmentos em porções mais pequenas permitiu a sua colocação em vários pontos do frasco o que permite um crescimento uniforme. Os 20 % a 30 % de espaço livre no frasco e o algodão, que funciona como filtro, irão permitir as trocas gasosas que o fungo necessita para o seu desenvolvimento. Posteriormente, seguiu-se a incubação.

Figura 37: a) Trigo humedecido b) *Spawn mother* antes de esterilização.

A manutenção da cultura inicial e a produção de *spawn mother* é um ponto crucial, dado que se houver algum problema nesta etapa, esse problema poderá refletir-se em todas as etapas sucessivas. Assim, recorre-se sempre a um registo, de forma a controlar todo o lote. Quando se verifica algum problema em alguma etapa, todo o lote é rejeitado.

9.3 Produção do *spawn*

Após a obtenção de um *spawn mother* bem incubado, procedeu-se à realização do *spawn*. De uma forma semelhante ao *spawn mother*, este produto é constituído à base de cereais, onde, após o tratamento necessário, consistirá numa cultura miceliar do fungo pretendido sendo posteriormente utilizado para inocular substratos para a produção de cogumelos. Na Figura 38 são apresentadas todas as etapas inerentes à produção de *spawn*.

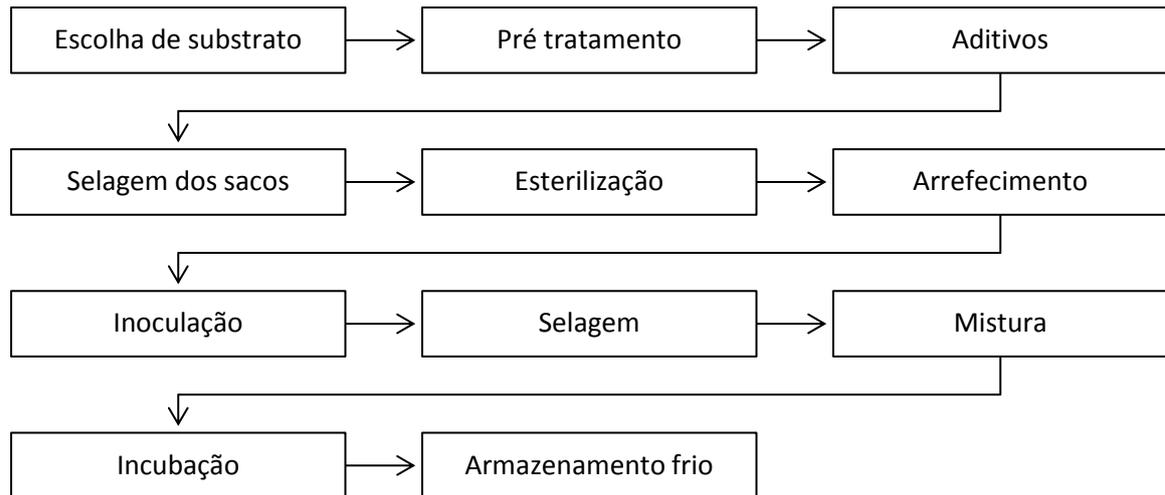


Figura 38: Representação esquemática das várias etapas inerentes à produção de *spawn*.

Inicialmente, efetuou-se a escolha das matérias-primas e fez-se um pré-tratamento de humificação e adição de aditivos, nomeadamente, carbonato de cálcio para aumentar o pH. De seguida, selaram-se os sacos e procedeu-se à sua esterilização. Posteriormente, utilizaram-se as salas limpas onde se deixa arrefecer o grão de trigo até aproximadamente à temperatura ambiente, para, de seguida, se efetuar a inoculação com *spawn mother*. Selaram-se os sacos para não haver contaminações e agitou-se o *spawn* inoculado de forma a distribuir as partículas do *spawn mother*, uniformizando o crescimento miceliar, seguindo para a sala de incubação. Finalizada a incubação está pronto a ser expedido ou armazenado no frio ($\approx 5\text{ }^{\circ}\text{C}$).

9.3.1 Qualidade do *spawn*

Relativamente ao controlo de qualidade, recorre-se essencialmente a testes sensoriais. Recorreu-se à avaliação visual onde se observa quaisquer irregularidades na cor e no crescimento, ao tato onde se avalia a textura e firmeza e, por fim, ao olfato pois permite detetar odores anormais através dos filtros. Qualquer *spawn* que apresente algo distinto e questionável é descartado.

Por vezes, é difícil, somente com testes sensoriais, avaliar se o *spawn* se encontra contaminado, pelo que pode-se recorrer a testes laboratoriais. Para tal, inverteu-se o saco, empurrando o conteúdo para baixo, tirou-se uma pequena quantidade de grãos para o canto superior e selou-se o saco no local inferior aos grãos. Esterilizou-se uma tesoura recorrendo a uma chama e cortou-se o canto acima da zona selada. Posteriormente colocaram-se os grãos retirados numa placa de Petri com meio PDA, e, cuidadosamente, uniformizaram-se os grãos por toda a placa. Por fim, incubaram-se as placas a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ para fungos e bactérias e outra placa a $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ para bactérias termorresistentes. Ao fim de 3 dias verificou-se o estado das placas.

O *spawn* é propício a contaminações com bactérias ou fungos, que podem ser visualizadas na Figura 39, pelo que é crucial um manuseamento eficaz e cuidado. A qualidade do *spawn* é extremamente importante, pelo que todo o processo deve seguir uma série de regras, implicando um rigor de higiene. Por vezes, contaminações ocorrem e não por causa da qualidade do *spawn*, mas sim pela falta de higiene, assim sendo, este parâmetro deve sempre acompanhar todo o processo.

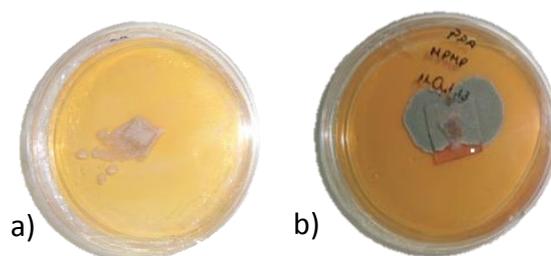


Figura 39: Contaminações. a) Bactéria; b) Fungo.

Além de contaminações, um dos problemas que pode ocorrer é o envelhecimento do micélio, pois este vai perdendo a força ao longo do tempo. O tempo de vida do *spawn* depende da cultura, da temperatura de armazenamento e da forma como é armazenado. Culturas que apresentem um desenvolvimento mais lento têm um maior tempo de vida. O envelhecimento pode ser traduzido pela compactação do micélio, formação fragmentos, crostas e nódulos miceliares, pelo surgimento de um fluido escuro e a autólise¹ do micélio, assim como a desintegração do *spawn*. Nos primeiros dois indícios, o micélio é perfeitamente utilizável, embora seja menos quebradiço do que o micélio fresco. Uma vez iniciada a autólise, é recomendado não utilizar o *spawn*. Quando surge um cheiro desagradável, indica a degradação do micélio e o produto deve ser eliminado. Relativamente à temperatura de armazenamento, esta deve rondar os 0 °C a 5 °C.

A certa altura, é natural as características organoléticas do *spawn* não serem suficientes para avaliar a qualidade deste produto. Deste modo, recorreu-se a um teste de crescimento que traduzirá a qualidade do produto. Este teste é muito semelhante ao teste de existência de contaminações.

Numa câmara de fluxo laminar, abriu-se o saco de *spawn*, colocou-se uma pequena porção deste, 2 a 3 grãos no máximo, numa placa de Petri com meio PDA, isolando posteriormente a placa. Proporcionou-se a temperatura ótima de crescimento (≈ 20 °C) durante 1 semana. Após

¹ Autólise: Ver 10.2.2.1 Autólise da página 104

este tempo, deverá ser possível avaliar a qualidade do *spawn*. Terá que ser visível o crescimento miceliar ao longo da placa. O *spawn* envelhecido também terá a capacidade de desenvolver o micélio na placa de Petri, no entanto, muito mais devagar. Se o crescimento for rápido e abundante, indicará que o *spawn* se encontra em bom estado e preparado para ser utilizado [53].

9.4 Produção de substrato de *Morchella esculenta*

A formação de esclerócios é uma etapa fundamental na produção de *Morchella esculenta*, pois é a partir deste ponto que se obtém a frutificação do cogumelo ou a formação de novo micélio. Assim, o sucesso da produção deste cogumelo é determinado nesta fase.

Os esclerócios apenas se formam na presença de substratos pobres em nutrientes, no entanto o micélio desenvolve-se bem em substratos ricos em nutrientes. Para se obter esclerócios e, em simultâneo, ocorrer o desenvolvimento do micélio, uma possível solução será a formulação de substratos mistos. Assim, opta-se pela divisão de substratos por camadas, separando os substratos com diferentes características nutricionais, através de uma barreira física com pequenos orifícios que permitirão que a água percole, simulando as chuvas na altura da Primavera.

Um fator importante para induzir a frutificação e a formação de esclerócios é a privação de nutrientes. Desta forma, os esclerócios que já se encontram no substrato pobre terão de ter boas condições ambientais (humidade, temperatura e ventilação) para ocorrer a formação de primórdios. Essas condições não estão ainda totalmente definidas, mas devido ao comportamento da *Morchella* na Natureza, um fator importante para a indução da frutificação é a exposição do fungo a uma alta quantidade de água no substrato onde se encontram os esclerócios.

Atendendo a todos estes fatores, realizaram-se vários substratos, que contemplam um substrato pobre e um substrato rico em nutrientes. Todos os ensaios apresentados foram realizados em triplicado, de forma a aferir a viabilidade dos mesmos.

Nos substratos sem barreira, colocou-se o substrato rico na parte inferior do saco de filtros, colocando de seguida o substrato pobre, evitando a mistura dos solos. A intenção é inocular o

substrato pobre, na expectativa deste migrar para o solo rico. Por esse motivo, o solo pobre ficou na parte superior, de forma a permitir a sua inoculação.

Nos substratos com barreira, por sua vez, colocou-se o substrato rico na parte inferior, seguida da barreira, com o substrato pobre em nutrientes na parte superior, tal como pode ser visualizado na Figura 40.

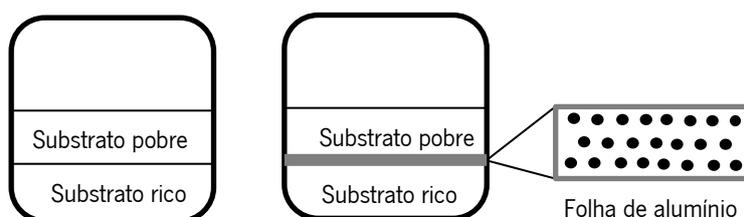


Figura 40: Representação dos substratos realizados de *Morchella esculenta*. a) Sem barreira; b) com barreira de alumínio.

Na Tabela 7 encontra-se a composição do substrato pobre e do substrato rico em nutrientes para um primeiro ensaio.

Tabela 7: Produção de substrato do Ensaio 1 de *Morchella esculenta*. Caracterização do solo rico e do solo pobre Composição, *C*, em percentagem, de volume do constituinte face ao volume do substrato total. Indicação do pH de cada substrato e da humidade relativa, *HR*, em percentagem

Ensaio 1			
Substrato pobre	<i>C</i> /%	Substrato rico	<i>C</i> /%
Solo	40	Trigo	45
Turfa	40	Composto	4
Perlite	q.b.	Gesso	1
Água	20	Água	50
pH	6,1		6,6
<i>HR</i> /%	32		62

O substrato pobre é constituído por 40 % de volume de solo sob o volume total, 40 % de turfa, um material de origem vegetal, parcialmente decomposto, uma quantidade residual de perlite e 20 % de água. O substrato rico é constituído por 45 % de trigo, 4 % de composto orgânico, 1 % de gesso e 50 % de água.

Com as composições referidas do solo pobre e rico, realizaram-se 4 misturas diferentes, tal como apresentado na Tabela 8. Foi estudada também a viabilidade da existência de uma barreira física entre os substratos.

Tabela 8: Composição dos 4 ensaios 1 dos substratos de *Morchella esculenta*. Composição, *C*, em percentagem, de volume do constituinte face ao volume do substrato total

Substrato	Ensaio 1.1 <i>C</i> /%	Ensaio 1.2 <i>C</i> /%	Ensaio 1.3 <i>C</i> /%	Ensaio 1.4 <i>C</i> /%
Pobre	50	50	30	30
Rico	50	50	70	70
Barreira	Ausente	Presente	Ausente	Presente

Um primeiro ensaio (1.1) contemplou quantidades iguais de ambos os substratos, assim como o segundo ensaio (1.2), mas neste último colocou-se uma barreira física, nomeadamente, uma folha de alumínio com alguns orifícios, para permitir a migração do micélio de um substrato para o outro e proporcionar a percolação da água. O terceiro ensaio (1.3), ausente de barreira, é constituído, maioritariamente, pelo substrato rico, com 70 % e o restante com solo pobre, assim como o quarto substrato (1.4), mas este com a presença de uma barreira física.

Num segundo ensaio, testaram-se substratos pobres e substratos ricos em nutrientes com diferentes composições no substrato pobre e a troca de uma matéria-prima no substrato rico. Na Tabela 9 encontram-se essas diferentes composições.

Tabela 9: Produção de substrato do Ensaio 2 de *Morchella esculenta*. Caracterização do solo rico e do solo pobre. Composição, *C*, em percentagem, de volume do constituinte face ao volume do substrato total. Indicação do pH de cada substrato e da humidade relativa, *HR*, em percentagem

Ensaio 2				
	Substrato pobre	<i>C</i> /%	Substrato rico	<i>C</i> /%
	Solo	55	Centeio	45
	Turfa	25	Composto	4
	Prelite	qp	Gesso	1
	Água	20	Água	50
pH	6,0		6,6	
<i>HR</i> /%	31		62	

Na Tabela 10 encontra-se a proporção utilizada de cada um dos substratos na disposição indicada anteriormente.

Tabela 10: Composição do ensaio 2 dos substratos de *Morchella esculenta*. Composição, *C*, em percentagem, de volume do constituinte face ao volume do substrato total

Substrato	Ensaio 2.1 <i>C</i> /%	Ensaio 2.2 <i>C</i> /%
Pobre	50	50
Rico	50	50
Barreira	Ausente	Presente

O ensaio 2 difere do anterior no substrato pobre, com uma maior quantidade de solo (55 %), 25 % de turfa e 20 % de água, juntamente com a quantidade residual de perlite, como anteriormente. No que concerne ao substrato rico, este difere pelo constituinte de centeio, em vez de trigo, mantendo as proporções iguais. Realizaram-se duas variantes desta constituição, uma com a presença e outra com a ausência de barreira.

Seguiu-se um terceiro ensaio onde se manteve a constituição do substrato pobre referente ao ensaio 1, mas variando no substrato rico em nutrientes, sendo constituído por 40 % de dois distintos cereais: 20 % de centeio e 20 % de grãos de trigo, adicionando 9 % de composto e 1 % de gesso, tal como apresentado na Tabela 11

Tabela 11: Produção de substrato do Ensaio 3 de *Morchella esculenta*. Caracterização do solo rico e do solo pobre. Composição, *C*, em percentagem, de volume do constituinte face ao volume do substrato total

Ensaio 3			
Substrato pobre	<i>C</i> /%	Substrato rico	<i>C</i> /%
Solo	40	Centeio	20
Turfa	40	Trigo	20
Pre-lite	q.b.	Composto	9
Água	20	Gesso	1
		Água	50
pH	6,1		6,5
<i>HR</i> /%	32		62

Realizaram-se duas composições diferentes de solo rico e pobre, tal como apresentado na Tabela 12.

Tabela 12: Composição ensaios 3 dos substratos de *Morchella esculenta*. Composição, C, em percentagem, de volume do constituinte face ao volume do substrato total

Substrato	Ensaio 3.1 C/%	Ensaio 3.2 C/%
Pobre	30	30
Rico	70	70
Barreira	Ausente	Presente

De seguida, esterilizaram-se todos os substratos a 121 °C ao longo de 120 min. Após arrefecimento, inoculou-se o substrato pobre, ou seja, apenas na parte superior do substrato, selou-se o saco e colocou-se na sala de incubação a 22 °C. Na Figura 41 é possível visualizar os substratos realizados e anteriormente descritos.



Figura 41: Substratos de *Morchella esculenta*.

Procedeu-se à observação e registo diário ao longo de 6 semanas, avaliando o crescimento miceliar e a existência de contaminações.

9.5 Produção do substrato de *Macrolepiota procera*

A produção de substratos de *M. procera* realizou-se com base nas características do solo onde este surge na forma silvestre. A composição dos substratos envolveu várias matérias-primas, nomeadamente, palha, devido a relatos de sucesso com este constituinte, assim como lascas de madeira, essencialmente de carvalho [9]; estrume de cavalo, devido aos relatos populares deste cogumelo surgir em pastagens destes animais; granulado universal, pois favorece o crescimento, frutificação e floração de todas as espécies de plantas, sendo usado em jardins onde surge o cogumelo em questão; corno triturado, sendo este indicado para plantações de árvores, arbustos e roseiras, mostrando-se ideal para fertilizar o solo antes das plantações e podendo ser uma boa fonte de azoto e matéria inorgânica que o cogumelo necessita; recorreu-se também a centeio, por ser uma fonte rica de nutrientes e mostrando-se eficaz noutros substratos para outros cogumelos; húmus, por ser uma fonte rica em matéria orgânica, resultante da decomposição de

animais e plantas mortas ou de subprodutos destes. Desta forma, avaliaram-se seis substratos distintos, realizando ensaios em duplicado, nas combinações apresentadas na Tabela 13.

Tabela 13: Composição, *C*, em percentagem do volume do constituinte face ao volume total do substrato, dos 6 substratos de *Macrolepiota procera* com indicação do pH e da humidade relativa, *HR*, em percentagem

Substrato 1		Substrato 2		Substrato 3		Substrato 4		Substrato 5		Substrato 6	
Material	<i>C</i> / %	Material	<i>C</i> / %	Material	<i>C</i> / %	Material	<i>C</i> / %	Material	<i>C</i> / %	Material	<i>C</i> / %
Lascas madeira	25	Estrume cavalo	25	Palha	30	Palha	20	Estrume cavalo	25	Palha	20
Húmus	15	Lascas madeira	20	Húmus	15	Solo	20	Palha	20	Estrume cavalo	20
Centeio	15	Centeio	10	Corno triturado	5	Estrume cavalo	20	Granulado universal	5	Centeio	10
Água	45	Água	45	Água	50	Água	40	Água	50	Água	50
pH	6,4	6,3	6,4	6,2	6,2	6,3					
<i>HR</i> / %	61	61	62	58	61	61					

Fizeram-se diferentes misturas dos substratos em embalagens de 3 kg, de forma a proporcionarem nutrientes suficientes, promovendo a frutificação, perfazendo um total de 12 ensaios. Misturaram-se as matérias-primas de forma a obter um substrato homogéneo e avaliou-se o pH, pois este deve ser de aproximadamente 7 [71]. De seguida esterilizaram-se os sacos ao longo de 120 min a 121 °C.

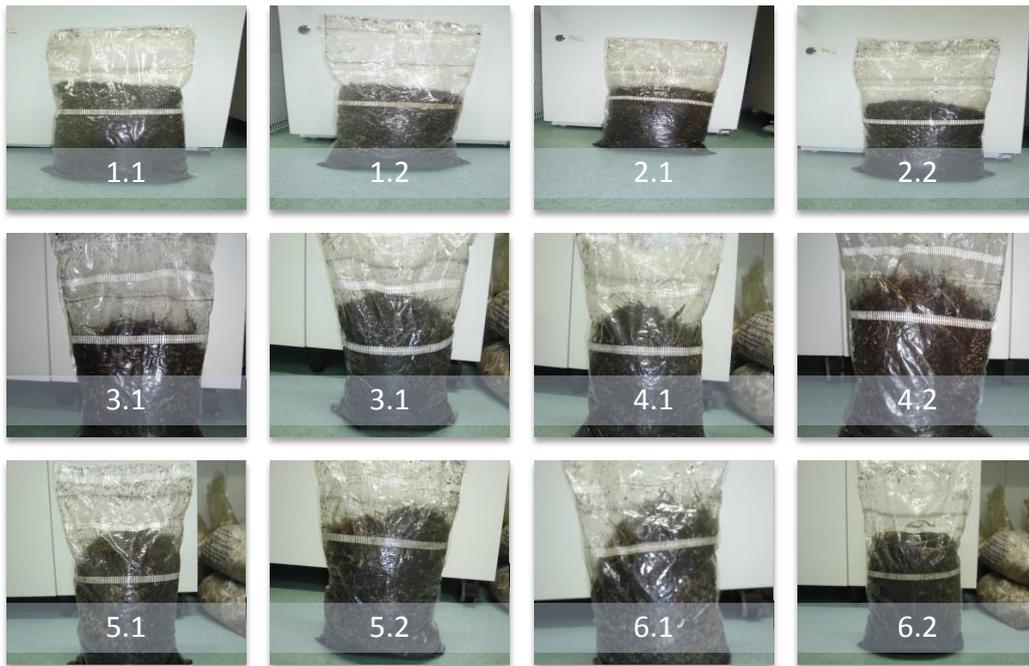


Figura 42: Seis substratos distintos, realizados em duplicado, inoculados com *Macrolepiota procera*.

Após arrefecimento dos substratos, em meio de assepsia, adicionou-se aproximadamente 10% de *spawn* misturando homogeneamente com o substrato. Selou-se os sacos e colocou-se numa sala de incubação limpa e controlou-se a temperatura e a presença de contaminações.

9.6 Produção de substratos com lamas de ETAR

O impacto negativo antropogénico sobre a Natureza tem crescido ao longo dos tempos, devido ao constante desenvolvimento tecnológico e crescimento populacional. Nos últimos anos, conceitos como preservação ambiental e desenvolvimento sustentável tornaram-se usuais e a sua inclusão nas políticas e estratégias empresariais, regionais e nacionais tornaram-se uma exigência incontornável. Nesta sequência, a inclusão do conceito de sustentabilidade a nível empresarial, com as vertentes económica, social e ambiental, apresenta-se como única alternativa.

As preocupações ambientais decorrem de uma realidade económica em crescimento acelerado, resultado de uma competitividade e inovação sem precedentes, em que a necessidade de deteção e otimização dos fatores críticos de sucesso se torna a chave para um desenvolvimento sustentado. Com uma sociedade alicerçada num desenvolvimento cada vez mais industrializado, as preocupações ambientais são hoje, mais do que nunca, acentuadas e de empenho obrigatório. Por sua vez, estas devem centrar-se na preservação, proteção e melhoria da

qualidade do ambiente, sempre associadas à proteção da saúde humana e ao uso prudente e racional dos recursos naturais.

No contexto específico das ETAR, as entidades gestoras produzem diariamente milhares de toneladas de lamas que são encaminhadas para diferentes destinos finais, nomeadamente o aterro, a incineração, a compostagem e a valorização agrícola. Neste contexto reforça-se o princípio da hierarquia dos resíduos que orienta em ordem decrescente de prioridade para a prevenção e redução, para a preparação para a reutilização, reciclagem e outras valorizações e, por fim, a eliminação.

Estas lamas são geradas em quantidades significativas e constituem, geralmente, um problema em termos do seu destino final. No entanto, quando corretamente geridas, as lamas podem representar um importante recurso renovável. O teor em nutrientes e matéria orgânica que está presentes nas lamas é muito importante para a aplicação destas na agricultura, como fertilizantes para o solo.

No intuito de usufruir destas características das lamas provenientes das ETAR, acrescido à vantagem de dar um destino final às mesmas, realizaram-se substratos à base deste resíduo para testar a sua viabilidade na produção cogumelos.

O *Pleurotus ostreatus* é um fungo saprófita cuja produção é conhecida e otimizada e apresenta um crescimento rápido e forte, conseguindo desenvolver-se em ambientes mais adversos. Deste modo, utilizou-se esta espécie para, primeiramente, testar a viabilidade do recurso das lamas de ETAR, cujas características se encontram no Anexo 2. Realizaram-se 3 ensaios distintos, tal como pode ser visualizado na Tabela 14.

Tabela 14: Composição, *C*, em percentagem do volume do constituinte face ao volume total do substrato, dos 4 substratos com lamas de ETAR inoculados com *Pleurotus ostreatus*.

	Ensaio 1		Ensaio 2		Ensaio 3	
	Material	<i>C</i> /%	Material	<i>C</i> /%	Material	<i>C</i> /%
	Lamas	50	Lamas	70	Lamas	50
	Palha	50	Palha	30	Fitas	50
pH	6.7		6.7		6.6	
HR/%	57,5		59		63	

As lamas são um resíduo denso, que dificultaria o crescimento micelial. Por esse motivo, juntou-se outros produtos para promover áreas entre as partículas, permitindo a respiração micelial,

nomeadamente, palha e fitas de madeira. As lamas têm uma densidade de 800kg/m^3 , as fitas de 200 kg/m^3 e a palha de 100 kg/m^3 . Tal como indicado no boletim caracterizador das lamas (ver em anexo II), as lamas continham 85,5 % de água, sendo demasiado para o estudo pretendido. Por esse motivo, realizou-se a secagem das mesmas até aproximadamente 50 % de humidade relativa. A palha foi previamente humedecida ao longo de 6 horas em água, ficando com uma humidade relativa de 60 %. De seguida, mediu-se a humidade relativa da mistura obtendo-se 57,5 %. Assim, realizaram-se dois ensaios recorrendo a palha, um constituído por 50 % e outro com 30 % de palha previamente humedecida. O pH da mistura é de 6,7.

Realizou-se um terceiro ensaio recorrendo à adição de 50% fitas de madeira. Como referido, as lamas continham 85,50 % de HR, pelo que adicionaram-se apenas as fitas sem adição de água, obtendo-se no final do ensaio HR de 63 %.

Esterilizaram-se os substratos a $121\text{ }^\circ\text{C}$ ao longo de 120 min. Devido à situação experimental colocou-se fita de autoclave no centro do substrato de forma a certificar a boa esterilização ao longo de todo o substrato. Após arrefecimento, inoculou-se o substrato com, aproximadamente, 10 % de *spawn* de *P. ostreatus*. Selou-se e procedeu-se à incubação.

Experimentou-se também recorrer às lamas de ETAR para a produção de *M. procera*. Realizaram-se dois ensaios, ambos com 50 % de lamas com uma desidratação prévia até aos 50 % e o restante com palha humedecida., procedendo-se de modo análogo ao explicado anteriormente. Na Figura 43 é possível visualizar a preparação dos substratos mencionados.



Figura 43: Preparação de substratos com lamas de ETAR.

Num total de 5 ensaios, 3 com *P. ostreatus* e 2 com *M. procera*, deixaram-se os substratos a incubar ao longo de 4 semanas. O processo do desenvolvimento micelial foi controlado com observações diárias, atendendo sempre à existência de contaminações.

9.7 Produção de substratos com resíduos de algodão

Cerca de metade da produção agrária é inutilizada, permanecendo na natureza sob a forma de resíduo. A contínua acumulação destes desperdícios, bem como dos subprodutos provenientes das agroindustriais, provocam problemas de ordem ecológica, que se têm vindo a tornar particularmente relevantes. O aproveitamento biotecnológico destes materiais, através da produção de cogumelos, apresenta inúmeros benefícios de índole económico-social, das quais destaca-se o desanuviamento da poluição do ambiente e a obtenção de biomassa comestível, geralmente aceite como alimento de alta qualidade, saber e valor nutritivo.

Com o intuito de se encontrar uma matéria-prima de baixo custo, estudou-se a possibilidade de produção de cogumelos recorrendo a resíduos de algodão, já que resíduos gerados a partir do processamento mecânico de algodão em bruto antes de fiação, fornecem um substrato ideal para o crescimento de alguns cogumelos.

Esta produção não é novidade para outras espécies, nomeadamente, *Pleurotus ostreatus*, que é comercializado pela empresa Relabiz, no Paquistão. Já em 1971, os resíduos de algodão tinham sido usados primeiramente, em Hong Kong, com a finalidade de ser um material de aquecimento, aumentando a temperatura do substrato, permitindo a produção *indoor* ao longo dos meses frios. Apesar de ser o motivo que levou, na altura, a produção com este tipo de substrato, acabou-se por verificar que o rendimento era maior do que com a utilização de palha de arroz, comumente utilizada nos países asiáticos [2].

No decorrer do trabalho, teve-se conhecimento de uma empresa que possui cavalos que utiliza este produto para fazer a “cama” dos cavalos. A junção do fertilizante de cavalo com esta matéria-prima proporcionou uma mistura que permitiu avaliar o crescimento do *Macrolepiota procera*, derivado aos relatos populares deste cogumelo surgir na zona de cavalos. Assim, no intuito de simular o terreno do aparecimento do cogumelo em modo silvestre, realizaram-se 7 substratos à base desta matéria-prima, em duplicado, conforme apresentado no esquema da Tabela 15.

Assim, realizaram-se diferentes misturas de modo a aferir o comportamento do fungo nas variadas condições.

Tabela 15: Composição, *C*, em percentagem do volume do constituinte face ao volume total do substrato, dos 7 substratos com resíduos de algodão inoculados com *Macrolepiota procera*, com indicação do pH e humidade relativa, *HR*, de cada um dos substratos realizados

Ensaio 1		Ensaio 2		Ensaio 3		Ensaio 4		Ensaio 5		Ensaio 6		Ensaio 7	
MP	<i>C</i> /%	MP	<i>C</i> /%	MP	<i>C</i> /%	MP	<i>C</i> /%	MP	<i>C</i> /%	MP	<i>C</i> /%	MP	<i>C</i> /%
Algodão	60	Algodão	70	Algodão	80	Algodão	30	Algodão	35	Algodão	30	Algodão	35
						Aparas madeira	30	Aparas madeira	35	F. cavalo	30	F. cavalo	35
Água	40	Água	30	Água	20	Água	40	Água	30	Água	40	Água	30
pH	6,7	6,7		6,6		6,6		6,6		6,5		6,5	
<i>HR</i> /%	62	58		51		61		59		60		55	

Num primeiro ensaio, misturou-se 60 % de algodão com 40 % de água, misturando homogeneamente. Retirou-se uma amostra da mistura e mediu-se o pH de modo a aferir se seria necessário aditivos para modificar o pH. Obteve-se um pH de 6,7 pelo que não foi necessário adição de nenhum constituinte. De uma outra amostra mediu-se a HR do substrato, aferindo, aproximadamente, 62 %. Num segundo ensaio, diminui-se a quantidade de água, misturando apenas 30 %. De forma análoga, mediu-se o pH e a HR, obtendo-se 6,7 e 58 % respetivamente. No terceiro ensaio misturou-se 80% de algodão com 20% de água, com pH de 6,6 e HR de 51%. No quarto e quinto ensaio misturou-se aparas de madeira, com 30 % e 35 % respetivamente, obtendo-se o pH e HR indicado na tabela. Nos dois últimos ensaios, 6 e 7, recorreu-se à mistura de fertilizante de cavalo, tal como indicado nas duas últimas colunas de Tabela 15.

9.8 Produção de outros substratos

Num estudo muito genérico, averiguou-se o comportamento de várias matérias-primas para a produção de substratos. Para tal, recorreu-se a constituições já conhecidas, fornecidas por empresas comerciantes deste tipo produto, obtendo os dados indicados na Tabela 16.

Na Tabela 16 podemos observar as constituições para várias espécies, nomeadamente, *Pleurotus ostreatus*, *Lentinus edodes*, *Pleurotus eryngii*, *Pholiota nameko*, *Flammulina velutipes*, *Hipsyzygus tessulatus*, *Hericiium erinaceus*, *Griffola frondosa* e *Agrocybe aegerita*.

Tabela 16: Constituição de substratos para várias espécies de cogumelos (PO: *Pleurotus ostreatus*; LE: *Lentinus edodes*; PE: *Pleurotus eryngii*; PN: *Pholiota nameko*; FV: *Flammulina velutipes*; HT: *Hipsyzigus tessulatus*; HE: *Hericium erinaceus*; GF: *Griffola frondosa*; AG: *Agrocybe aegerita*), disponibilizada pela empresa Mycelia

	PO C/(%)	LE C/(%)	PE1 C/(%)	PE2 C/(%)	PN, FV C/(%)	PN ₂ , FV ₂ C/(%)	HT C/(%)	HE C/(%)	GF C/(%)	AG C/(%)
Serrim de faia		76			76		72	75	69	57
Serrim de Carvalho										
Serrim Abeto	38		20	15		79				
Aparas de madeira	5		5	10						5
Fibras (madeira, palha)	20		30		5		5	5	5	5
Borras				45						
Polpa de beterraba			5							
Grão, trigo	18	10	14	11	9	10	5	10	12	10
Farelo de trigo	13	10	14	11	7	7	15	8	12	15
Bolo de semente oleaginosa (brita)	6	4	12	8	3	4	3	2	2	8
Água	68	62	67	68	65	65	64	64	62	66

São apresentadas as percentagens das várias matérias-primas utilizadas em cada substrato adequado a cada espécie, seguida da última linha que indica a percentagem de humidade face ao substrato indicado. As matérias-primas são resíduos agrícolas de baixo valor económico. Além de se mostrarem eficazes no crescimento miceliar, têm também como vantagem permitirem custos que tornam viável economicamente este tipo de produção.

Baseado nestas indicações, realizaram-se substratos para variadas espécies diferindo na constituição das matérias-primas. Avaliaram-se os substratos de *Pleurotus djamor*, *Pleurotus cornucopiae* e *Pleurotus eryngii*. As restantes espécies apresentadas pela Tabela 16 estão a título de exemplo, de forma a demonstrar que os substratos não mudam significativamente nas espécies citadas.

9.8.1 *Pleurotus eryngii*

Numa primeira fase, realizaram-se substratos à base de serrim, com as composições apresentadas na Tabela 17 para a produção de *Pleurotus eryngii*.

Tabela 17: Constituição de substratos para a produção de *Pleurotus eryngii*

Composto	Ensaio 1 C/(%)	Ensaio 2 C/(%)	Ensaio 3 C/(%)	Ensaio 4 C/(%)
Serrim	45	35	35	25
Grão	15	35	25	25
Água	40	30	40	30
Palha	-	-	-	20
pH	6,7	6,6	6,7	6,7
HR/%	58	51	58	51

De forma a manter todo o substrato uniforme, realizou-se a mistura num único recipiente e, posteriormente, encheram-se sacos de filtro até atingir os 3 kg de modo uniforme. Esterilizaram-se os substratos a 121 °C ao longo de 120 min. Após arrefecimento em meio estéril, inocularam-se com *P. eryngii*.

Figura 44: Substratos de *Pleurotus eryngii*.

Colocaram-se os substratos a incubar a 22 °C, observando-se semanalmente o crescimento miceliar.

9.8.2 *Pleurotus djamor* e *Pleurotus cornucopiae*

O *Pleurotus djamor* e o *Pleurotus cornucopiae* crescem muito bem em substratos à base de palha, no entanto inoculou-se também esta espécie em substratos à base de serrim, de forma a comparar o seu comportamento em diferentes situações. Na Tabela 18 encontra-se indicadas as composições utilizadas nos diferentes substratos.

Para ambas as espécies realizou-se os mesmos substratos. Colocou-se o grão previamente de molho ao longo de 24 horas. Misturou-se 10 % de grão humedecido em 40 % de serrim humedecido a 50 % de adição direta de água. Pretendeu-se com isto que o grão crie os espaços

livres necessários para a proliferação miceliar, pois, somente serrim, poderá criar um substrato demasiado denso.

Tabela 18: Substratos de *Pleurotus djamor* e *Pleurotus cornucopiae*

Composto	<i>Pleurotus djamor</i>		<i>Pleurotus cornucopiae</i>	
	Composição (Ens.1)	Composição (Ens.2)	Composição (Ens.1)	Composição (Ens.2)
Serrim (%)	40	-	40	-
Grão (%)	10	-	10	-
Água (%)	50	-	50	-
Palha humedecida (%)	-	100	-	100
pH	6,5	6,3	6,4	6,5
HR/%	61	62	61	62

Paralelamente realizaram-se substratos à base de palha. Para tal, colocou-se a palha submersa em água durante 24 horas proporcionando HR de 62 %. Esterilizaram-se os substratos a 121 °C ao longo de 120 min. Após arrefecimento procedeu-se à inoculação com *spawn*, selaram-se os sacos e colocaram-se na sala de incubação.

9.9 . Inoculação em troncos de madeira

A escassez de registos de experiências de inoculação de troncos com *Macrolepiota procera* dificulta a programação das várias etapas. Por esse motivo, assimilou-se o processo à produção de *Lentinus edodes*, devido ao conhecimento vasto e registos quantificáveis. Assim, recorreu-se aos dados destas espécies para extrapolar à produção de *Macrolepiota* em troncos.

Procedeu-se à realização de *pellets* desta espécie. Humidificou-se as cavilhas ao longo de 24 horas com 1 % de hipoclorito de sódio, com o intuito de as desinfetar. Após esta etapa, humidificou-se os *pellets* ao longo de 24 horas em apenas água. Escorreu-se a água em excesso através de uma peneira e esterilizou-se a 121 °C ao longo de 120 min.

Após arrefecimento, inoculou-se as cavilhas com *spawn mother*. Recorreu-se a recipientes de vidro, com um disco de algodão, promovendo as trocas gasosas, de modo a ter-se amostras mais pequenas facilitando o controlo de contaminações. A utilização de recipientes de vidro permitiu aferir se a presença de água no recipiente no momento da esterilização influencia o crescimento micelial. Dado o fungo, aparentemente, ter um crescimento propício em ambientes mais húmidos, preencheu-se o recipiente que contém as cavilhas, com água e, posteriormente, esterilizou-se. Dentro da câmara de fluxo, em meio de assepsia, retirou-se a água e inocularam-se as cavilhas no procedimento explicado anteriormente. Procedeu-se deste modo de forma a avaliar se a presença de água até ao momento de inoculação influencia na velocidade de crescimento do fungo. Isto porque, desde o processo da autoclavagem, até o momento da inoculação, as cavilhas acabam por perder humidade, que pode ser crucial na forma de crescimento do micélio. É essencial colocar os frascos de vidro utilizados na vertical, numa posição que se tenha a certeza que não verta, pois o disco de algodão utilizado, que permite as trocas gasosas e cria a barreira contra os microrganismos, não poderá entrar em contacto com água, pois isso quebraria a barreira existente entre o exterior e o interior do recipiente, permitindo a entrada de contaminações externas.



Figura 45: Isolamento de *pellets* de *Macrolepiota procera* em placa de Petri com meio PDA.

De modo a avaliar o desenvolvimento do fungo ao longo dos *pellets*, isolou-se o mesmo numa placa de Petri, aferindo o seu crescimento micelial, tal como pode ser visualizado na Figura 45.

Após a incubação dos *pellets*, procedeu-se à inoculação dos troncos. Introduziu-se vários *pellets* ao longo do tronco, tal como pode ser visualizado na Figura 46. Com o auxílio de uma rebarbadora, juntamente com um adaptador e uma broca, realizou-se orifícios de 5 centímetros de profundidade, pois o *pellet* utilizado tem 4 cm de comprimento, criando assim uma câmara-de-ar de 1 cm, permitindo ao fungo realizar as trocas gasosas necessárias.

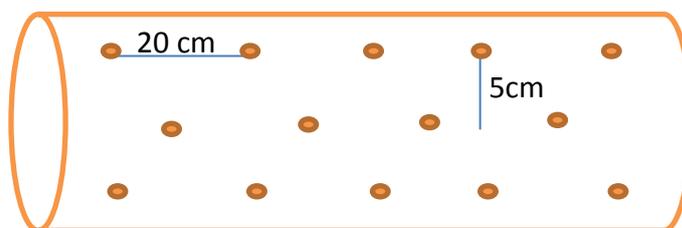


Figura 46: Perfuração e Inoculação dos troncos.

De seguida, isolou-se os orifícios com cera de abelha quente mediante auxílio de um pincel, de forma a proteger o fungo, promovendo o seu crescimento e procedeu-se à incubação.

Ao longo do tempo de incubação é importante manter sempre a temperatura e humidade constantes, não deixando o tronco exposto a humidades muito elevadas, nem demasiado baixas. Tentando simular a época sazonal do surgimento desta espécie, tentou-se manter o tronco a 24 °C com humidades de 75 %, através duma rega constante. Numa produção em grande escala é necessário colocar os troncos próximos uns dos outros, de modo a haver uma proteção mútua, resguardando das contaminações externas, dando tempo para o fungo fortalecer-se e colonizar o tronco. Obtendo-se o fungo forte, é mais fácil combater os microrganismos indesejáveis e sobreviver a condições adversas que surjam, como falta de água ou excesso/défice de temperatura. No presente caso, não se detém muitos troncos para que possa haver a proteção mútua referida, pelo que é necessário colocar, inicialmente, um plástico escuro envolvente no tronco. Isto tem como finalidade proteger o tronco aos invasores e manter os parâmetros de humidade e temperatura mais constantes, com o acréscimo de que no momento de incubação não é necessário luz. No entanto, é necessário aferir qualquer contaminação que surja, combatendo-a de imediato com lixívia a 30 %. Se as condições estão boas para a proliferação do fungo desejados, também estão boas para os restantes, pelo que é crucial um cuidado acrescido nesta fase de produção.

10. Resultados e Discussão

10.1 *Morchella esculenta*

A fim de obter o bom desenvolvimento miceliar da *Morchella esculenta*, realizaram-se as várias etapas inerentes à produção deste cogumelo. Iniciou-se pela multiplicação miceliar em placa, e, finalizado o tempo de incubação, procedeu-se à realização do *spawn mother*. Este permitiu a obtenção do *spawn*. Por fim, realizaram-se substratos com distintas composições, proporcionando-lhes diferentes induções de frutificação, de forma a obter o cogumelo propriamente dito.

Todas as etapas referidas, quando finalizado o tempo de incubação, são armazenadas no frio (5 °C), no seu tempo respetivo de validade.

10.1.1 Placas

A inexistência do cogumelo impossibilitou o isolamento do mesmo, pelo que apenas foi possível aferir o crescimento miceliar em placa oriunda duma placa obtida comercialmente. O micélio da espécie *Morchella esculenta* mostrou um crescimento de velocidade média, colonizando progressiva e uniformemente a placa ao longo de 4 semanas. Assim, de uma placa com o isolamento obteve-se 20 placas semelhantes à ilustrada na Figura 47.



Figura 47: Micélio de *Morchella esculenta*.

A placa aparenta ter um tempo de vida elevado, de aproximadamente 2 anos, não indicando envelhecimento através de análise sensorial, comprovado pela análise qualitativa da placa, nomeadamente, o aspeto e o comportamento das hifas.

10.1.2 *Spawn mother* e *Spawn*

Realizaram-se vários ensaios de produção de *spawn mother* e todos se mostraram uniformes, quanto à velocidade de crescimento, uniformidade ao longo do produto e clareza na coloração. O tom acastanhado do micélio da *Morchella* dificulta o acompanhamento do crescimento inicial, dado a semelhança com a matéria-prima utilizada, mas rapidamente se pode observar o micélio a proliferar e apoderar-se de todos os nutrientes disponíveis.

O disco de algodão utilizado mostrou-se eficiente quanto às trocas gasosas, assim como a câmara-de-ar no topo do recipiente. Na Figura 48 é possível observar a uniformidade da distribuição dos fragmentos da placa de micélio utilizados.



Figura 48: *Spawn mother* de *Morchella esculenta*.

Assim, ao fim de 4 semanas o trigo estava todo envolvido pelo micélio, originando um aglomerado compacto, pronto a ser utilizado na etapa seguinte. Ausente de contaminações, o *spawn mother* pode ser armazenado em frio ao longo de, aproximadamente, um ano.

O *spawn* comportou-se de forma semelhante, tal como pode ser visualizado na Figura 49. A coloração acastanhada é notória ao longo da matéria-prima.



Figura 49: *Spawn* de *Morchella esculenta*.

Demorou cerca de 4 a 5 semanas a estar completamente desenvolvido, sendo traduzido pela uniformidade ao longo da matéria-prima e pelo surgimento de manchas acastanhadas mais escuras

Como referido no ponto 6.1.2 (Embalagem), os filtros utilizados são de extrema importância na produção deste produto, pois permitem as trocas gasosas necessárias e criam uma barreira aos invasores. A embalagem utilizada mostra-se perfeitamente eficaz, tendo sido um ponto crucial para o sucesso desta etapa. Ausente de contaminações, o *spawn* pode ser armazenado no frio ao longo de 8 meses.

10.1.3 Substratos

Os substratos realizados apresentaram um longo período de incubação, demorando cerca de 10 semanas até concluir a colonização no substrato. Ao longo do tempo, foi difícil aferir o estado de desenvolvimento, dado a semelhança de cores entre o micélio e o próprio substrato. Esperava-se que o micélio tivesse força suficiente para aglomerar fortemente as partículas do substrato, mas tal não se sucedeu, ficando o substrato bastante solto como inicialmente. Noutras espécies, verifica-se que o micélio une fortemente todas as partículas, estabelecendo ligações entre os compostos, resultando num substrato consistente. Tal não se verificou em nenhum dos substratos, levando a concluir que o substrato poderá não ser o mais indicado para esta espécie.

Um substrato viável poderá ser feito com o recurso a matérias-primas mais finas, de forma a este micélio se aglomerar de melhor forma, podendo estabelecer pontes de contacto entre todas as partículas.

Durante o tempo de incubação, verificaram-se várias contaminações em algumas das amostras, tal como podemos ver na Figura 50. Pela cor e pelas características físicas, supõe-se que uma das contaminações presentes foi o *Trichoderma spp.*, que se revelou uma contaminação constante, persistente e muito difícil de controlar. Estando perdido o substrato, testou-se abrir, combater a contaminação com uma solução de hipoclorito de sódio a 30%, retirando primeiramente a parte contaminada. Neste momento, confirmou-se a falta de compactação do substrato.

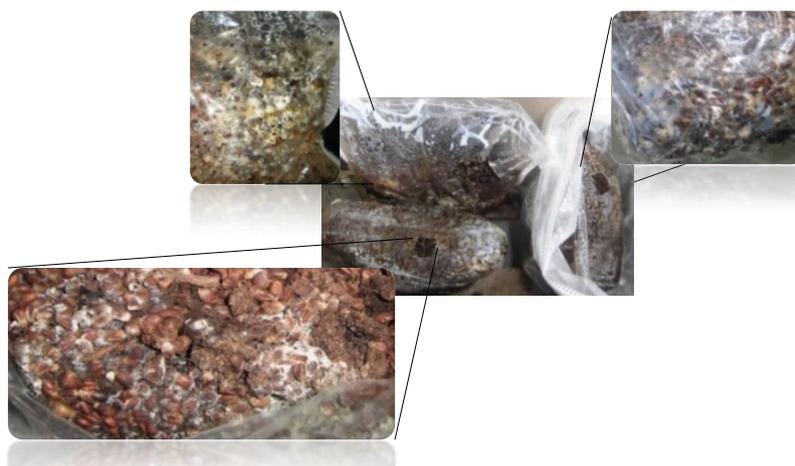


Figura 50: Substratos de *Morchella esculenta*.

As contaminações foram persistentes e, de forma a proporcionar as condições climáticas ótimas ao crescimento da *Morchella*, proporcionaram-se também as condições ótimas ao crescimento do *Trichoderma spp.* através de humidades a 80 % e a temperatura a rondar os 25 °C (condições sentidas na Primavera, altura em que a *Morchella esculenta* surge na Natureza de

modo silvestre). Deste modo, o *Trichoderma spp.* prevaleceu e inibiu qualquer crescimento por parte da *Morchella*, promovendo o insucesso destes ensaios.

10.1.3.1. Esclerócios

Apesar do insucesso nas amostras, devido às contaminações presentes, foi possível aferir o aparecimento de esclerócios. Abriram-se os sacos contaminados, e após a separação da contaminação, verificaram-se alguns esclerócios do substrato, com cerca de 2 cm de diâmetro, tal como pode ser observado na Figura 51.

Não se verificou qualquer distinção dos esclerócios nos vários ensaios de substratos (com diferentes constituições), tendo-se aferido que a variação das matérias-primas realizadas em nada condicionou o crescimento dos esclerócios.

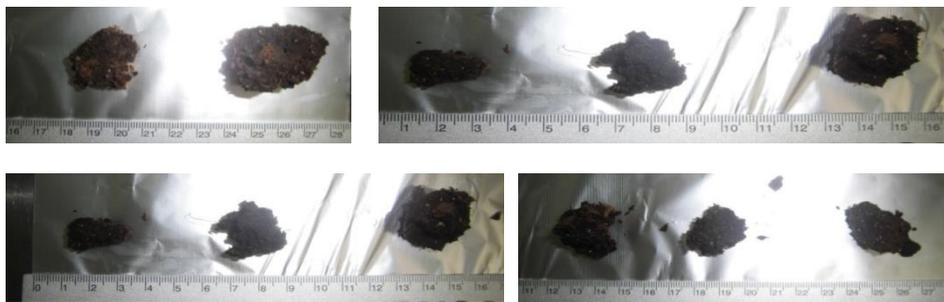


Figura 51: Esclerócios.

Apesar da contaminação presente no substrato, os esclerócios permaneceram ausentes de contaminações. Assim, tendo em conta que o surgimento dos esclerócios poderá ser a chave para o cultivo desta espécie, reutilizaram-se os mesmos, colocando-os em substrato esterilizado, na expectativa destes conseguirem proliferar.

Dividiram-se os esclerócios em pedaços, com tamanhos compreendidos entre 0,5 cm³ e 4 cm³ e inoculou-se numa camada fina de substrato, com 1 cm a 4 cm de profundidade. Antes da inoculação, emergiram-se os esclerócios em água estéril ao longo de 1 hora, de forma a promover o crescimento do micélio presente nos esclerócios, simulando, assim, as condições ambientais na Natureza. Colocou-se de seguida os esclerócios em substrato de suporte pobre em nutrientes igual ao substrato 1, permitindo um controlo da disponibilidade de nutrientes, através da aplicação e subsequentemente remoção de uma fonte externa de nutrientes para o substrato.

No entanto, após 2 semanas, o substrato contaminou novamente. Tratando-se de um fungo prevalente, presumiu-se que o *Trichoderma spp.* ter-se-á alojado também nos esclerócios, sendo

movido de igual modo para o novo substrato, tornando os resultados, mais uma vez, inconclusivos.

10.1.4 Indução dos primórdios e Frutificação

Após a incubação, realizou-se a indução dos primórdios. No momento da incubação, não se verificou qualquer presença de primórdios, como seria de esperar, de modo a indicar a proximidade da frutificação. No entanto, o período de incubação era já elevado, sendo necessário a indução dos mesmos, para testar o seu surgimento. Na Tabela 19 encontra-se sintetizado os testes descritos anteriormente, com os respetivos resultados.

Tabela 19: Resumo do procedimento efetuado na produção de substratos de *Morchella esculenta*, indicando o modo de indução dos primórdios e a respetiva frutificação

Ensaio		Teste	Indução primórdios	Frutificação
Ensaio 1	Ensaio 1.1	Teste 1	Mergulho ao longo de 6h	Contaminação
		Teste 2	Mergulho ao longo de 12h	Contaminação
		Teste 3	Contaminação fungo <i>Trichoderma spp.</i>	
	Ensaio 1.2	Teste 4	Mergulho ao longo de 6h	Contaminação
		Teste 5	Mergulho ao longo de 12h	Contaminação
		Teste 6	Mergulho ao longo de 24h	Contaminação
	Ensaio 1.3	Teste 7	Exposição ao ar, T _{amb}	Contaminação
		Teste 8	Contaminação fungo <i>Trichoderma spp.</i>	
		Teste 9	Contaminação fungo <i>Trichoderma spp.</i>	
	Ensaio 1.4	Teste 10	Exposição ao ar, T _{amb}	Contaminação
		Teste 11	Exposição ao frio, 5°C durante 24h	Contaminação
		Teste 12	Exposição ao frio, 5°C durante 24h	Contaminação
Ensaio 2	Ensaio 2.1	Teste 13	Mergulho ao longo de 24h	Contaminação
		Teste 14	Camada de matéria inorgânica	Contaminação
		Teste 15	Camada de matéria inorgânica	Contaminação
	Ensaio 2.2	Teste 16	Mergulho ao longo de 24h	Contaminação
		Teste 17		Contaminação
		Teste 18		Contaminação
Ensaio 3	Ensaio 3.1	Teste 19	Mergulho ao longo de 24h	Contaminação
		Teste 20		Contaminação
		Teste 21		Contaminação
	Ensaio 3.2	Teste 22		Contaminação
		Teste 23	Contaminação fungo <i>Trichoderma spp.</i>	
		Teste 24	Contaminação fungo <i>Trichoderma spp.</i>	
Relembrar: <u>Ensaio 1:</u> Substrato pobre: 40% Solo, 40% Turfa, 20% Água; Substrato rico: 45% Trigo, 4% Composto, 1% Gesso, 50% Água Ensaio 1.1: 50% Solo rico, 50% Solo Pobre, sem barreira Ensaio 1.2: 50% Solo rico, 50% Solo Pobre, com barreira Ensaio 1.3: 70% Solo rico, 30% Solo Pobre, sem barreira Ensaio 1.4: 70% Solo rico, 30% Solo Pobre, com barreira <u>Ensaio 2:</u> Substrato pobre: 55% Solo, 20% Turfa e 20% Água; Substrato rico: 45% Centeio, 4% Composto, 1% Gesso e 50% Água Ensaio 2.1: 50% Solo rico, 50% Solo Pobre, sem barreira Ensaio 2.2: 50% Solo rico, 50% Solo Pobre, com barreira <u>Ensaio 3:</u> Substrato pobre: 40% Solo, 40% Turfa; Substrato rico: 20% Trigo, 20% Centeio, 9% Composto, 1% Gesso e 50% de Água Ensaio 3.1: 50% Solo rico, 50% Solo Pobre, sem barreira Ensaio 3.2: 50% Solo rico, 50% Solo Pobre, com barreira				

10.1.4.1 Indução dos primórdios através de choque de humidade

Como já referido, esta espécie de cogumelo é comum na altura da Primavera, com o cessar das chuvas, mas na presença de terreno húmido e temperaturas amenas. Por esse motivo, simulou-se este ambiente, mergulhando os substratos em água durante 8, 12 e 24 horas, avaliando, simultaneamente, a influência deste choque térmico e mecânico, assim como a necessidade de exposição do substrato na água.

Após o mergulho dos substratos nos tempos indicados, colocou-se os mesmos, separadamente, num ambiente propício ao seu crescimento. Recorreu-se a uma incubadora previamente desinfetada, que permite ter a temperatura desejada, tendo-se aferido os 18 °C para o crescimento dos primórdios, um sistema de fotoperíodo (12 horas de luz e 12 horas de escuridão), com humidade de 80 %. A incubadora não permitia um controlo de ventilação, sendo desejáveis 3 a 6 trocas de ar por hora. Esta falta de controlo poderia ter resultado em cogumelos menos uniformes e sem o crescimento ótimo, mas, nos níveis disponíveis, não seria um fator que impossibilitasse o crescimento dos primórdios, devido ao grande volume de ar disponível.

Após 5 dias, surgiram contaminações em 2 dos substratos. Retirou-se de imediato esses mesmos substratos. No entanto, a contaminação aparentemente alastrou-se e 3 dias depois todos os substratos contaminaram de modo irreversível, tal como pode ser visto na Figura 52.



Figura 52: Substrato de *Morchella esculenta* contaminado.

Todos os substratos submersos falharam, devido às contaminações que se instalaram, impossibilitando aferir a viabilidade deste processo.

A água utilizada para imergir estes substratos pode ser a origem das contaminações surgidas. Recorreu-se a água normal e não esterilizada, de modo a não fugir das condições ambientais a que a *Morchella spp.* silvestre está exposta. Para além disso, humidades elevadas proporcionam ambientes muito mais propícios a contaminações, como o *Trichoderma spp.*, pelo que, ao

proporcionar humidades tão elevadas, proporcionou-se condições altamente favoráveis para outros fungos não pretendidos. Espécies que recorram a excessos de humidade são muito mais percíveis nessa fase, pelo que este procedimento está sempre associado a um risco elevado, exigindo cuidados mais rigorosos. No decorrer deste procedimento, teve-se todo o cuidado de limpeza e na manutenção do substrato. No entanto, a contaminação prevaleceu.

10.1.4.2 Indução dos primórdios através de exposição ao ar

Em simultâneo, testaram-se 2 substratos, apenas abrindo o saco de filtro que contém o substrato, expondo o micélio ao ar, com humidade e temperatura controlada, sem qualquer choque inicial.



Figura 53: Substrato de *Morchella esculenta*.

Colocaram-se os substratos numa sala fechada, com o gradiente de pressão atmosférico normal, sem filtros na ventilação, higienizada, com indicador de temperatura, mas sem controlo. O higrómetro indicava 21 °C na sala e 79 % de HR.

Após 3 dias, este substrato foi invadido aparentemente pelo fungo *Trichoderma spp.*, tal como anteriormente, impossibilitando a avaliação da qualidade deste substrato. Assim, expôs-se o substrato a condições controladas quanto possível. No entanto, as instalações disponíveis não foram as ideais. Com a presença de antecâmaras, de salas sobre pressão, bem desinfetadas e bem fechadas, com a presença de ventiladores com filtros HEPA, as condições de exposição ao ar seriam muito mais favoráveis ao controlo de contaminações.

10.1.4.3 Indução dos primórdios através de choque térmico

Paralelamente, testou-se colocar 4 substratos no frio, a 5 °C ao longo de 24 horas. Esta temperatura inibe as enzimas, estagnando o processo de crescimento do micélio.

Colocaram-se os substratos na mesma sala explicada no ponto anterior, ou seja, numa sala fechada, com o gradiente de pressão atmosférico normal, sem filtros na ventilação, higienizada, com indicador de temperatura, mas sem controlo, a 21 °C e 79 % de HR. Após 3 dias, o substrato foi igualmente invadido aparentemente pelo fungo *Trichoderma spp.*

A sala disponível para a colocação destes substratos aparenta não ser a indicada, sugerindo uma forte possibilidade de origem destas contaminações e ausência da frutificação esperada. A falta de controlo da ventilação pode ser crucial para a falta de desenvolvimento dos primórdios.

Associado à impossibilidade de desinfecção acrescida, o ambiente criado pode ser ótimo para o aparecimento de invasores.

10.1.4.4 Indução dos primórdios com camada de matéria orgânica

À semelhança do processo realizado na frutificação de outras espécies de cogumelos, como o *Agaricus bisporus* e a *Lepista nuda*, experimentou-se induzir os primórdios através da colocação de matéria orgânica na superfície do substrato. Assim, esterilizou-se turfa, abriu-se o substrato e colocou-se essa mesma turfa na parte superior do substrato. Esta proporcionará uma barreira física aos microrganismos invasores e protegerá de algum déficit que possa ocorrer de temperatura, humidade ou ventilação, resguardando as características do substrato.

Manteve-se a humidade e temperatura, e teve-se cuidado acrescido na limpeza e desinfecções, no entanto, as contaminações surgiram e prevaleceram. Retirou-se e desinfetou-se com hipoclorito de sódio a 30 % todas as contaminações que surgiam, contudo, não foi suficiente e estas acabavam sempre por proliferar, até colonizarem de forma irreversível, sendo necessário descartar os substratos.

10.2 *Macrolepiota Procera*

10.2.1 Placas

Na Figura 54 pode-se observar o isolamento do cogumelo *Macrolepiota procera* e o crescimento do seu micélio em placa ao longo do tempo. Este demonstrou um crescimento uniforme. Na imagem (c) da mesma figura, é visível o crescimento do micélio em camadas, formando anéis concêntricos, mostrando o comportamento típico de crescimento deste fungo. Ausente de contaminações, ao fim de 4 semanas obteve-se uma placa perfeitamente desenvolvida.

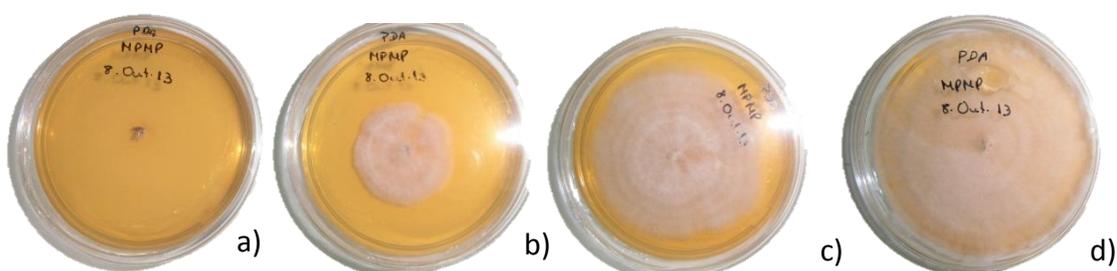


Figura 54: Isolamento do cogumelo *Macrolepiota Procera*. a) Tempo 0; b) 1 semana; c) 3 semanas; d) 4 semanas

Utilizando o micélio em placa perfeitamente desenvolvido, foi possível obter 20 placas de multiplicação desta espécie, recorrendo ao procedimento explicado no capítulo anterior. Deste modo, pode-se obter placas perfeitamente desenvolvidas ao fim de 4 semanas, tal como pode ser visualizado na Figura 55. Nesta etapa, o crescimento é mais irregular ao longo da placa, sendo notório o desenvolvimento das hifas. Esta etapa apresenta o mesmo tempo de incubação que a anterior.



Figura 55: Multiplicação em placa do cogumelo *Macrolepiota procera*.

10.2.2 *Spawn mother e Spawn*

Na Figura 56 pode-se observar o desenvolvimento do micélio ao longo do tempo do *spawn mother*. Ao fim de 3 semanas, em (b), é visível o crescimento ao longo dos fragmentos provenientes da placa de micélio de forma circular. Ao fim de 6 semanas, obtém-se *spawn mother* perfeitamente desenvolvido, onde é notório o crescimento e desenvolvimento das hifas miceliares.

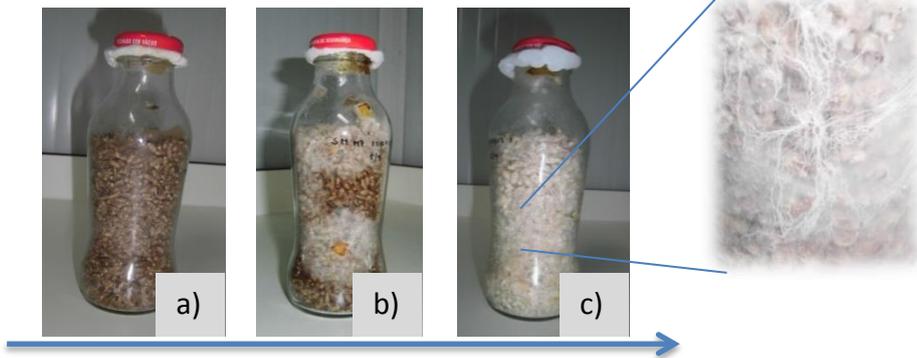


Figura 56: *Spawn mother* de *M. procera*; a) tempo 0; b) 3 semanas; c) 6 semanas.

Na Figura 57 é notório o desenvolvimento miceliar ao longo do tempo. Inicialmente, contempla-se o desenvolvimento em volta dos fragmentes provenientes do *spawn mother*, mas posteriormente, ao fim de 5 semanas, o micélio apodera-se de todo o substrato, traduzido pela coloração esbranquiçada.

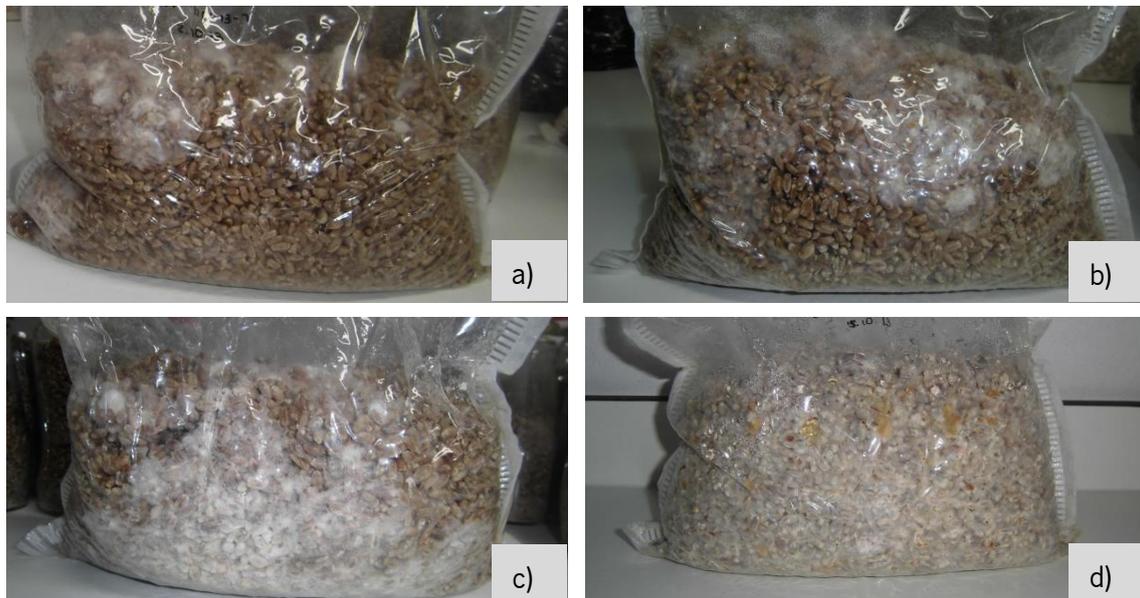


Figura 57: Desenvolvimento do *spawn* ao longo do tempo. a) 1 semana; b) 2 semanas; c) 3 semanas; d) 4 semanas.

A embalagem utilizada permitiu as trocas gasosas necessárias e mostrou uma barreira eficiente contra as contaminações externas. A câmara-de-ar disponível nos produtos em questão é suficiente para o bom crescimento miceliar.

O *spawn* da espécie *M. procera* foi obtido com sucesso, permitindo a realização da fase seguinte: a inoculação do substrato. O *spawn mother* pode ser armazenado no frio (5°C) ao longo de um ano. O *spawn*, por sua vez, pode aguentar nas mesmas condições ao longo de 8 meses. Ao fim deste tempo, poderá ocorrer a autólise.

10.2.2.1 Autólise

Com a inutilização de todo o *spawn*, verificou-se a autólise do fungo, tal como a Figura 58 evidencia. A autólise consiste no processo em que ocorre a desordem no sistema enzimático, levando ao ataque indiscriminado das enzimas com atividade de degradação, resultando na alteração da integridade da parede celular, permitindo a solubilização e liberação dos componentes intracelulares ao meio externo.

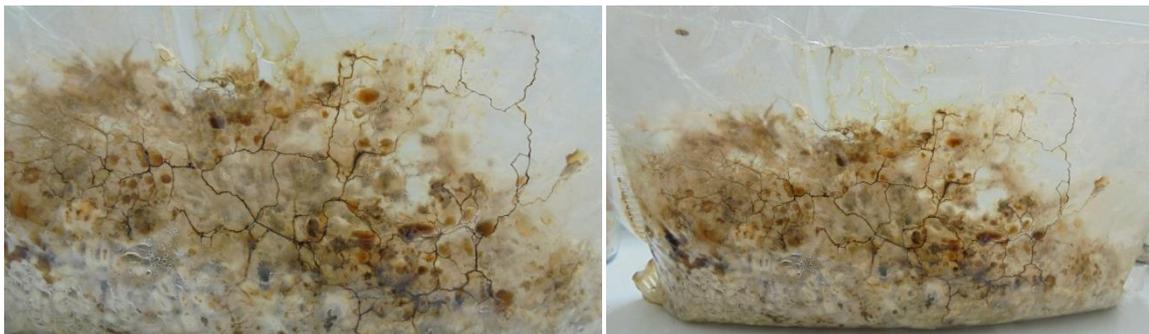


Figura 58: *Spawn* de *Macrolepiota procera* envelhecido.

Este fenómeno é evidenciado pela coloração escura envolvente na matéria-prima. Pode-se observar o micélio bastante mais delineado, que vai escurecendo ao longo do tempo, até começar a diminuir de volume e a apresentar um aspeto não saudável, isto é, com semelhanças a podridão.

10.2.3 Substratos

Como referido anteriormente, foram efetuados primeiramente 6 substratos com matérias-primas diferentes, em duplicado.

O substrato 1 teve um tempo de incubação relativamente rápido, estando completamente incubado ao fim de 4 semanas. Na Figura 59 pode-se observar a uniformidade de crescimento ao longo do tempo, estando o substrato perfeitamente incubado na última fase. O micélio alterou a coloração do substrato, sendo notório o bom desenvolvimento do mesmo. Na Figura 60 pode-se observar a concordância do ensaio em duplicado, permitindo aferir a viabilidade dos resultados.

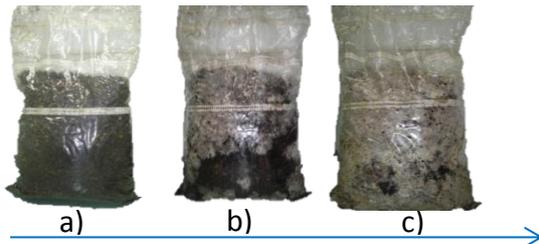


Figura 59: Substrato 1.1 de *Macrolepiota procera*. a) 1 semana; b) 2 semanas; c) 4 semanas.



Figura 60: Substrato 1.2 de *Macrolepiota procera*. a) 1 semana; b) 2 semanas; c) 4 semanas.

O substrato 2 mostrou a mesma velocidade de crescimento que o substrato anterior. Ao longo de duas semanas a coloração branca foi invadindo o substrato, traduzindo um crescimento constante e uniforme. Na Figura 62 e Figura 63 é possível aferir a ótima proliferação do micélio, migrando do *spawn* para o substrato. As composições utilizadas de cada matéria-prima nestes substratos proporcionaram uma densidade favorável ao crescimento miceliar. Receou-se que a ausência de maquinaria adequada para misturar as matérias-primas fosse um entrave à mistura homogênea, impossibilitando o crescimento miceliar de igual forma em todo o substrato. No entanto, tal não se verificou, tendo-se obtido um crescimento ótimo do micélio no substrato 2.2, tal como pode ser visualizado no ponto c) da Figura 63.



Figura 61: Proliferação do micélio em contorno do *spawn*.

No entanto, ao fim de duas semanas, o substrato 2.1, representado na Figura 62, contaminou, exibindo uma coloração verde. A contaminação, por análise da forma e coloração, assumiu-se tratar-se do fungo *Trichoderma spp*, tendo a contaminação como origem o meio externo, dado a proximidade da contaminação na zona dos filtros. Em alguma circunstância, entre o processo de esterilização e incubação, pode ter ocorrido a humidificação do filtro, e isso promove a permeabilidade do filtro a quaisquer microrganismos. Pode não ser logo evidente a presença dos microrganismos no substrato, mas com o decorrer do tempo, criando-se condições propícias ao seu crescimento, este acaba por proliferar.

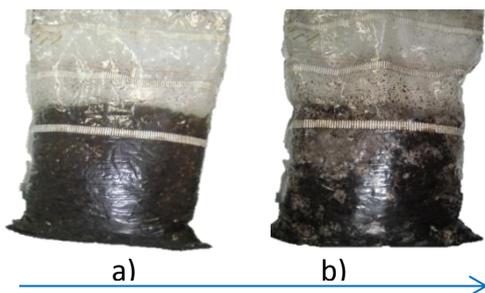


Figura 62: Substrato 2.1 de *Macrolepiota procera*. a) 1 semana; b) 2 semanas.

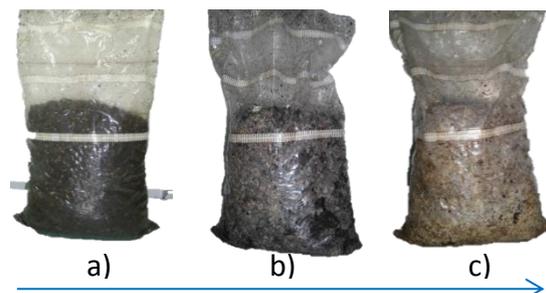


Figura 63: Substrato 2.2 de *Macrolepiota procera*. a) 1 semana; b) 2 semanas; c) 4 semanas.

O substrato 3, ao fim de duas semanas, encontrava-se com um resultado semelhante aos substratos anteriores, indicando, que para já, a adição de corno triturado (matéria inorgânica) não enriqueceu o substrato. Ao fim de 3 semanas é notório que o crescimento não se encontra uniforme, encontrando-se a parte final do substrato sem desenvolvimento miceliar, tal como pode ser visualizado na Figura 64.

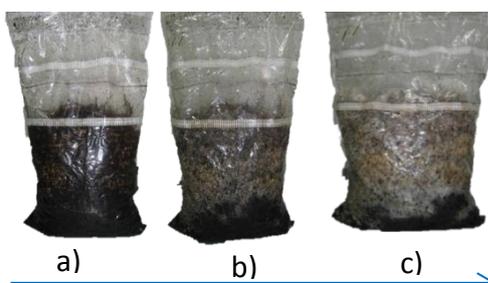


Figura 64: Substrato 3.1 de *Macrolepiota procera*.
a) 1 semana; b) 2 semanas; c) 4 semanas.

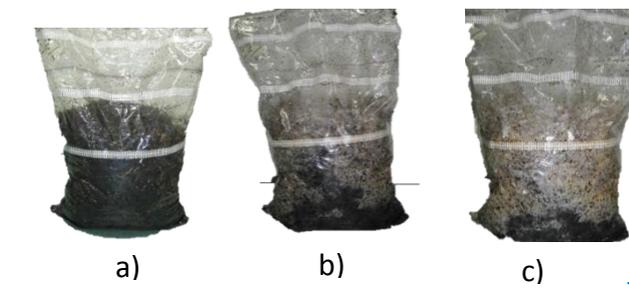


Figura 65: Substrato 3.2 de *Macrolepiota procera*. a) 1 semana;
b) 2 semanas; c) 4 semanas.

A falta de uniformidade foi comum nos dois ensaios, confirmando que a dificuldade do *spawn* em atingir todos os pontos do substrato estará diretamente relacionada com o substrato. Poderá dever-se à falta de homogeneidade da mistura das matérias-primas ou a junção destas criar um substrato demasiado denso. O excesso de humidade poderá provocar um substrato demasiado húmido, bloqueando as passagens que deveriam existir de modo a permitira proliferação do micélio. No entanto, a humidade utilizada é comum em todos os ensaios pelo que, à partida, não seria a origem do problema. Porém, a falta de homogeneidade poderá ter provocado a má absorção da água por parte das matérias-primas, e, devido à gravidade, a água poderá ter percolado ao longo do substrato e depositando-se no final, provocando uma humidade excessiva nesta zona. Consequentemente, impossibilitaria o crescimento miceliar. A existência desta matéria morta no substrato acaba por danificar a matéria restante, aumentando o risco de contaminação. Mesmo que não prejudique o substrato no tempo de incubação, na altura da abertura do saco é importante retirar de imediato a parte não colonizada, de modo a evitar condições propicias a pragas e microrganismos não desejáveis.

O substrato 4 mostrou o crescimento mais rápido ao fim de duas semanas, tal como evidenciado na Figura 66 e na Figura 67. Nesta etapa, o micélio já se encontrava perfeitamente distribuído ao longo de todo o substrato. No restante tempo, até perfazer as 4 semanas, o micélio apenas se intensificou, apoderando-se da matéria-prima em falta. Os dois ensaios foram concordantes, indicando uma boa solidez por parte da junção das matérias-primas. A esterilização realizada mostrou-se eficaz e os filtros criaram a barreira necessária a

contaminações, assim como permitiu as trocas gasosas necessárias. O curto tempo necessário de incubação traduz que a humidade utilizada para esta junção de matérias-primas aproxima-se da ideal. Posteriormente, poderá otimizar-se este valor, mas, de momento, indica um fator favorável. Ao fim de 4 semanas ambos os ensaios finalizaram o seu tempo de incubação.



Figura 66: Substrato 4.1 de *Macrolepiota procera*. a) 1 semana; b) 2 semanas; c) 4 semanas.

Figura 67: Substrato 4.2 de *Macrolepiota procera*. a) 1 semana; b) 2 semanas; c) 4 semanas.

O substrato 5, ao fim de duas semanas, mostrou um ótimo crescimento. No entanto, a parte inferior do substrato não apresentou desenvolvimento miceliar, tal como pode ser visualizado na Figura 68. Ao fim de 4 semanas, os dois ensaios mostraram-se os mais distintos de todos. A coloração não era idêntica, nem o crescimento teve o mesmo ritmo, podendo traduzir que a mistura das matérias-primas poderá não ter sido homogênea. O primeiro ensaio contaminou, tal como pode ser visto na mesma figura. A contaminação ocorreu na zona dos filtros, indicando que poderá ter como origem o exterior. Ao longo do processo de esterilização, arrefecimento e inoculação, poderá ter havido a humedificação dos filtros, promovendo a sua permeabilidade, retirando o efeito de barreira necessária aos microrganismos. Relembra-se que a incubação foi feita numa sala própria de incubação, com as desinfecções adequadas.



Figura 68: Substrato 5.1 de *Macrolepiota procera*. a) 1 semana; b) 2 semanas; c) 4 semanas.

Figura 69: Substrato 5.2 de *Macrolepiota procera*. a) 1 semana; b) 2 semanas; c) 4 semanas.

Tal como explicado para o substrato 3, o excesso de água poderá estar na origem da falta de desenvolvimento miceliar na zona inferior do substrato. A água poderá ter percolado ao longo do substrato e ter-se armazenado no fundo, devido à gravidade. Assim, provocaria um excesso de

humidade nessa zona, impossibilitando a proliferação do micélio. De modo a corrigir o ocorrido, mudou-se o substrato de posição, invertendo 180°, passando a parte inferior a superior, esperando que, se o problema fosse o excesso de água acumulada, a gravidade obrigasse a água a percorrer o restante substrato.

Esperou-se mais uma semana, e, de facto, o micélio começou a proliferar na zona onde não se tinha verificado o desenvolvimento miceliar. Assim, ao fim de 5 semanas, obteve-se um substrato perfeitamente desenvolvido.

O substrato 6, por sua vez, mostrou um crescimento igualmente rápido ao longo do tempo. O crescimento não foi uniforme ao longo do substrato, havendo algumas zonas que não foram alcançadas pelo micélio. Poderá dever-se a uma má mistura, tanto do *spawn* com o substrato, como das matérias-primas, ou a consistência do substrato não permitir o alcance por parte do micélio. O segundo ensaio deste substrato, tal como pode ser visualizado na Figura 71, exibiu uma coloração ótima, típica do micélio desta espécie, indicando que tudo teria para frutificar.

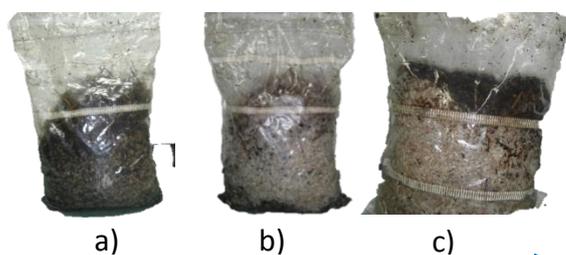


Figura 70: Substrato 6.1 de *Macrolepiota procera*. a) 1 semana; b) 2 semanas; c) 4 semanas.

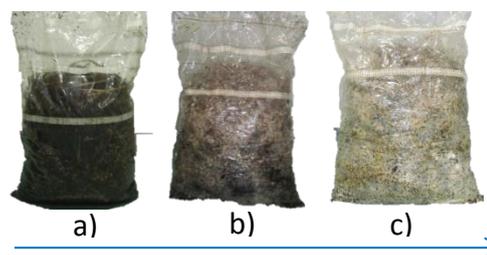


Figura 71: Substrato 6.2 de *Macrolepiota procera*. a) 1 semana; b) 2 semanas; c) 4 semanas.

Na Figura 72 pode-se observar o substrato 6.1 quando aberto o saco de filtro. Alguma fração da palha não se encontrava colonizada, mas resultou num substrato consolidado.

Finalizadas 4 semanas, todos os ensaios mostraram tempos próximos de crescimento miceliar, indicando que a mistura das matérias-primas utilizadas pouco influenciou a velocidade de crescimento. A percentagem utilizada de cada uma será pouco relevante, pelo menos a nível do desenvolvimento das hifas, à exceção do



Figura 72: Substrato exposto de *Macrolepiota procera*.

substrato 5, que não apresentou crescimento nem coloração uniforme.

Na Figura 73 é possível observar o comportamento do fungo ao fim de 6 semanas. Dada a escassez de equipamentos, a indução dos primórdios não foi testado em todos os substratos em simultâneo. Consequentemente, 3 dos substratos (1.2, 3.1 e 6.2) foram sujeitos aos testes duas semanas depois. Após esse período, o fungo começou a ter o comportamento visível na imagem. O micélio tomou uma coloração bastante mais escura, sendo bem visíveis as hifas. O substrato aparentou amolecer, diminuindo de volume, indicando que estaria a passar pelo processo de autólise.



Figura 73: Comportamento do fungo *Macrolepiota procera* ao fim de 6 semanas.

3.2.4 Indução dos primórdios e frutificação

Estando o micélio perfeitamente desenvolvido, procedeu-se à tentativa de frutificação dos substratos.

Na Figura 74 é visível o ótimo crescimento do micélio. Ao abrir os sacos, deparou-se com massas geradas, traduzindo a força miceliar. Estas massas criadas encontravam-se, essencialmente, na zona dos filtros, atingindo espessuras de 5 centímetros e 6 centímetros. Com o toque, danificavam-se pelo que se evitou o contacto.

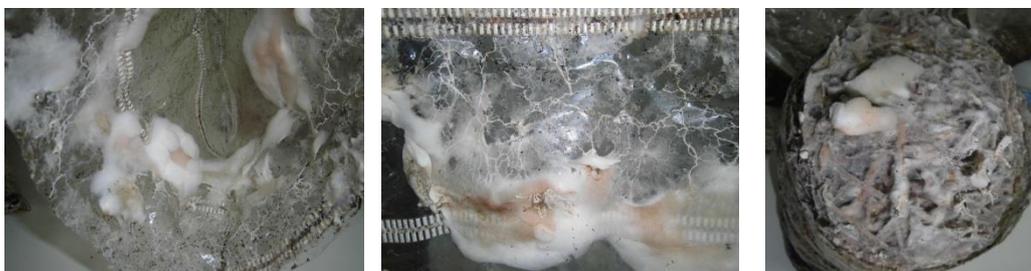


Figura 74: Micélio de *Macrolepiota procera* perfeitamente desenvolvido, com o aparecimento de massas miceliares.

O *Macrolepiota procera* é um cogumelo, como já anteriormente referido, comum em Portugal, surgindo tipicamente na altura do Outono, época das primeiras chuvas onde o solo quente do Verão fica encharcado. Na tentativa de simular esta situação, mergulhou-se em água alguns dos

substratos durante 12 horas. A consistência que o micélio proporcionou ao substrato permitiu o mergulho sem danificar a estrutura, podendo avaliar, assim, a atividade hidrolítica do fungo. Proporcionando a humidade relativa do ar apenas através de rega por aspersão, abriu-se alguns sacos expondo o fungo ao oxigénio, na tentativa que a humidade, temperatura e oxigénio proporcionados fossem suficientes para a frutificação.

Simulando o solo quente seguido de encharcamento, num dos sacos expôs-se o fungo a 27 °C e posteriormente mergulhou-se o substrato perfeitamente consolidado em água ao longo de 6 horas. De seguida, expôs-se o bloco a condições atmosféricas controladas.

A Figura 75 apresenta uma representação esquemática, resumindo todas as ações explicadas anteriormente, expondo os resultados obtidos.

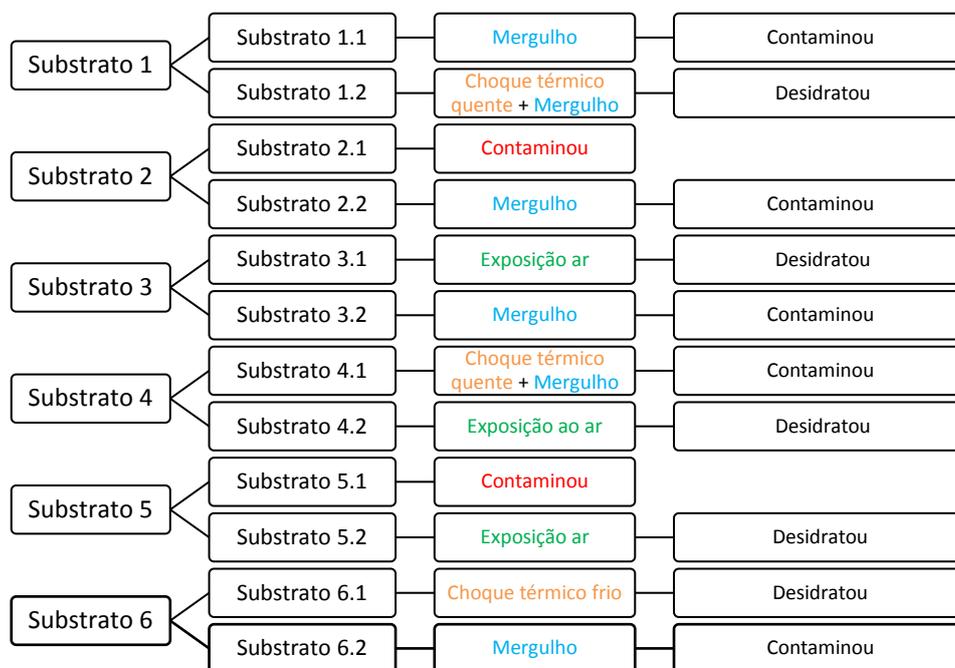


Figura 75: Representação esquemática resumindo as ações e resultados dos substratos de *Macrolepiota procera*.

As variantes eram muitas, havendo poucas indicações bibliográficas acerca da temperatura e humidade ótimas para o crescimento deste cogumelo. Experimentou-se uma temperatura aproximadamente de 19 °C e humidade relativa de 75 % a 80 %, numa tentativa de simular a época sazonal em que este cogumelo cresce. Estes valores foram mantidos para todas as experiências.

Através do esquema apresentado pode-se constatar que todos os ensaios, dos quais foram sujeitos à submersão em água, acabaram eventualmente por contaminar, impossibilitando a frutificação. A contaminação foi de tal modo rápida e destrutiva, que o fungo não teve como

combater, acabando por exigir que se descartasse todos estes substratos, resultando, assim, em resultados inconclusivos acerca da eficácia deste método. O *Trichoderma spp.* é bastante propício em ambientes com humidades elevadas, e sem uma incubadora em ambiente estéril ou ar sobre pressão, torna-se difícil controlar o seu desenvolvimento, acabando por proliferar.

Os substratos que não foram sujeitos à imersão em água, independentemente do procedimento a que foram sujeitos, isto é, quer com choque térmico, quer com exposição ao ar ou mesmo a junção das duas, o substrato acabou por secar. A humidade relativa do ar foi cuidadosamente controlada, nunca baixando dos 75 %, mas, mesmo com esse controle, o substrato acabou por desidratar.

Numa última tentativa de recuperar um dos substratos (6.1), mergulhou-se o mesmo durante 3 horas. Inicialmente, pareceu surgir um crescimento rejuvenescido do micélio, e, desta vez, manteve-se uma humidade relativa de 85 %, ainda com os 19 °C. O substrato acabou por contaminar, sendo descartado.

Os substratos produzidos podem ser usados como composto, mas não é um fertilizante. Este substrato é uma boa fonte de húmus para campos arenosos ou argilosos e pode ser usado também como cobertura morta no jardim. Apesar das contaminações, o micélio continuou presente, pelo que, ao ser usado como fertilizante, é possível que o micélio prolifere e acabe por colonizar o solo, possibilitando a sua frutificação na época sazonal.

10.2.4 Inoculação em troncos de madeira

Numa primeira etapa, e dado a escassez de registos da produção de *Macrolepiota procera* em troncos de madeira, avaliou-se o seu crescimento nos *pellets*, antes da sua colocação nos troncos de madeira.

Ao fim de 4 a 5 semanas, a colonização do micélio na madeira estava concluída, tal como pode ser visualizado na Figura 76. Aparentemente, o micélio aderiu bem à madeira, adesão traduzida pela migração do micélio do *spawn mother* para os *pellets*.



Figura 76: *Pellets* inoculados com *Macrolepiota procera*.

O crescimento miceliar, nas cavilhas que foram encharcadas até ao momento da inoculação, foi muito mais rápido e eficaz do que nas cavilhas que foram sujeitas ao procedimento normal, isto é, autoclavagem e arrefecimento sem água. Essa diferença pode ser visualizada Figura 77. As cavilhas submersas em água finalizaram o seu tempo de incubação ao fim de duas semanas e meia, enquanto as realizadas com o procedimento comum, apenas ao fim de quatro semanas e meia é que finalizaram a incubação. Mesmo assim, tal como visualizado na figura, algumas das cavilhas não aparentam colonização, principalmente as superiores que se encontram mais expostas ao ar, que, por isso, poderão ter desidratado um pouco mais. Deste modo, a migração do micélio não parece tão eficaz como quanto exposto à submersão em água, garantindo a humidade presente na matéria-prima. Uma desvantagem que este procedimento poderá ter é que meios com maior humidade são mais propícios a contaminações, pelo que é necessário um cuidado acrescido.

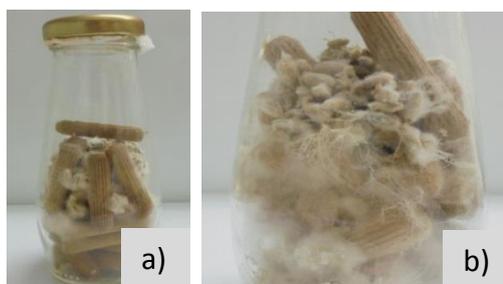


Figura 77: Cavilhas inoculadas com *spawn mother* de *Macrolepiota procera*. a) Sem encharcamento de água no momento de esterilização e arrefecimento; b) Com encharcamento.

A colocação de água em todo o processo anterior à inoculação permite que as cavilhas retenham uma quantidade mais elevada de humidade, fator favorável ao crescimento miceliar. No entanto, a realização deste processo recorre, normalmente, aos sacos mencionados no capítulo 6.1.2 (Embalagem), ou seja, sacos com filtros que não podem estar em contacto com água, pois quebra a barreira existente com os microrganismos, promovendo as contaminações externas. Para a realização deste procedimento de colocação de água, é necessário utilizar recipientes de vidro ou análogos que permitam a permanência da água sem danificar o sistema de respiração e filtração, mantendo sempre o filtro longe da água, ou seja, uma solução será a sua colocação na parte superior do recipiente, como o utilizado nesta experiência.

De modo a autenticar a migração do micélio, colocaram-se fragmentos de *pellets* em placas de Petri com meio PDA. Ao fim de três semanas, a proliferação das hifas é bem visível, tal como ilustrado na Figura 78.



Figura 78: Crescimento micelial do isolamento de *pellets* de *Macrolepiota procera* em placa de Petri com meio PDA.

Independentemente da colocação da água ou não no momento pré inoculação, a migração do micélio é bem-sucedida, pelo que este parâmetro apenas influenciará a velocidade de crescimento. O aumento da velocidade poderá estar diretamente relacionado com o combate a contaminações, pois se o micélio é mais rápido na sua proliferação, dará menos oportunidade a contaminações externas.

Garantida a presença do micélio, inoculou-se troncos de eucalipto. Este processo é muito moroso, necessitando de, no mínimo, meio ano para obter a primeira frutificação. Até ao momento, a madeira aparenta colorações esbranquiçadas no topo, ausentes de contaminação, indicando que o micélio está a desenvolver-se. No entanto, só finalizado o tempo de incubação é que poderá dar-se a indução dos primórdios e avaliar o método de frutificação.

Para a indução, poderá dar-se o choque mecânico e térmico, processos idênticos ao realizado com a espécie *Lentinus edodes*, dado esta espécie sugerir uma reação ao excesso de água com o seu aparecimento nas chuvas de Outono.

10.3 Produção de substratos com lamas de ETAR

A tentativa de valorização das lamas de ETAR não se mostrou bem-sucedida. Controlou-se diariamente o desenvolvimento micelial, assim como o surgimento de contaminações. Na primeira semana, o micélio exibiu um comportamento semelhante ao mostrado num substrato à base de palha ou idênticos. Na segunda semana, obteve-se o crescimento micelial apresentado na Figura 79, onde se pode observar, aparentemente, cerca de 75 % do substrato colonizado.



Figura 79: Substratos de lamas de ETAR para a produção de *Pleurotus ostreatus*.

Ao longo do tempo, todos os substratos mostraram o mesmo comportamento, independentemente da sua constituição.

Após a segunda semana, o crescimento miceliar parou. Nos dias seguintes foi possível observar a necrose gradual do micélio, através da modificação da coloração do micélio, passando de branco para amarelo, atingindo, por fim, coloração acastanhada. Não foi possível aferir o que causou a degradação miceliar em todos os ensaios, mesmo após o micélio apresentar um bom crescimento ao longo de duas semanas.

Inicialmente, a densidade do substrato não se mostrou um problema, dado a velocidade inicial do crescimento miceliar. No entanto, a densidade pode-se alterar com o tempo, isto é, com a gravidade, a água, que poderá não ter sido bem estagnada no substrato, pode ir percolando com o tempo, armazenando-se no final do substrato. Isto causará a falta de humidade na parte superior do substrato, e o excesso desta na parte inferior, impossibilitando o crescimento do micélio pelas condições extremas e opostas. Ao fim de 4 semanas o micélio alterou a sua coloração, passando de esbranquiçado para um tom acastanhado, cor que não é comum nesta espécie, podendo esta ser consequência da necrose do fungo.

Poderá ser necessário desidratar um pouco as lamas antes da sua utilização, de forma a diminuir a densidade, facilitando o crescimento do fungo. O acréscimo de outras matérias-primas, como palha e trigo, promoverá caminhos de proliferação do micélio. No entanto, se se mostrar ser necessário grandes quantidades de outras matérias-primas, deixa de haver vantagem no recurso às lamas de ETAR, pelo que é importante aferir a quantidade máxima possível a ser utilizada neste substrato, mantendo uma densidade que permita o crescimento do fungo.

10.4 Produção de substratos com resíduos de algodão

Na Tabela 20 encontra-se os resultados obtidos na realização de substratos de *Macrolepiota procera* à base de resíduos de algodão. Realizaram-se substratos à base de algodão, com 100% de algodão, a sua mistura com aparas de madeira e com fertilizante de cavalo em diversas composições.

Tabela 20: Resultados obtidos na produção de substratos de *Macrolepiota procera* com resíduos de algodão.

Ensaio	Desenvolvimento micelar visível		Desenvolvimento micelar completo visível	Frutificação
	Após 2 semanas	Após 4 semanas		
1	≈ 50%	≈ 80%	5 Semanas	Não
2	≈ 60%	≈ 90%	5 Semanas	Não
3	≈ 50%	≈ 80%	5 Semanas	Não
4	≈ 50%	≈ 90%	5 Semanas	Não
5	≈ 50%	≈ 80%	5 Semanas	Não
6	≈ 50%	≈ 80%	5 Semanas	Não
7	≈ 60%	≈ 80%	5 Semanas	Não

Após 2 semanas, avaliou-se o desenvolvimento micelar dos substratos. A cor inicialmente clara do *Macrolepiota procera* começou a sobressair ao longo de todo o substrato. Todos os substratos, independentemente da composição, aparentaram crescimento regular e uniforme com velocidade de crescimento semelhante. Ao fim de duas semanas, os substratos estavam cerca de ½ preenchidos, completando grande parte da colonização no substrato ao fim de 4 semanas. Ao fim de 5 semanas, o micélio mostrou-se perfeitamente desenvolvido em todos os substratos, independentemente da humidade e da sua constituição. Aparentemente, o micélio proliferou ao longo de todo o substrato.

Ao fim das 5 semanas, o micélio desenvolveu uma tonalidade mais escura, dificultando a avaliação do seu desenvolvimento ao longo dos substratos, pelo que, no momento da abertura dos sacos, para promover a frutificação, retirou-se uma pequena amostra do centro do substrato e colocou-se numa placa de Petri com meio PDA, de modo a avaliar se, de facto, o fungo se desenvolveu. Ao fim de 4 semanas, constatou-se um bom crescimento traduzindo o crescimento eficaz nos substratos.

De seguida procedeu-se à indução dos primórdios e respetiva frutificação. Procedeu-se ao encharcamento dos substratos pela sua imersão em água ao longo de 12 horas, onde está

inerente o choque mecânico, resultado da colocação do substrato bruscamente na água. Procedeu-se de igual forma em todos os substratos.

Manteve-se a HR a cerca de 80 % e temperatura a 22 °C, através de rega por nebulização. No entanto, eventualmente, os substratos desidrataram ao longo do tempo. Apesar da rega intensiva, os substratos secaram e o micélio aparentemente acabou por morrer. A rega da sala de frutificação poderá não ser a suficiente, apesar do higrómetro indicar uma humidade constante de 80%. Este tipo de matéria-prima retém muito bem a água, pelo que este resultado não era esperado. Poderá ser necessário um segundo choque de humidade, tendo sempre um cuidado acrescido às contaminações, pois elevados níveis de humidade promovem o aparecimento de contaminantes.

10.5 Produção de novos substratos

Visando a produção em grande escala, realizaram-se substratos do *Pleurotus djamor* e *Pleurotus cornucopiae* e *Pleurotus eryngii*. Realizaram-se substratos à base de palha e de serrim para o *P. djamor* e *P. cornucopiae*. Para o *P. eryngii* procedeu-se a substratos à base de serrim. Primeiramente, é necessário a obtenção do micélio de cada um das espécies.

10.5.1 Produção de *Pleurotus djamor* e *Pleurotus cornucopiae*

Na Figura 80 encontram-se ilustrados os resultados obtidos na produção de micélio de *Pleurotus djamor*. Cada etapa tem uma duração de aproximadamente 4 semanas, demorando cerca de 16 semanas na obtenção de *spawn*. Por este motivo, é importante deter um *stock* de cada um dos produtos, de modo a que, para a realização do substrato não seja necessário consecutivamente todo este tempo.

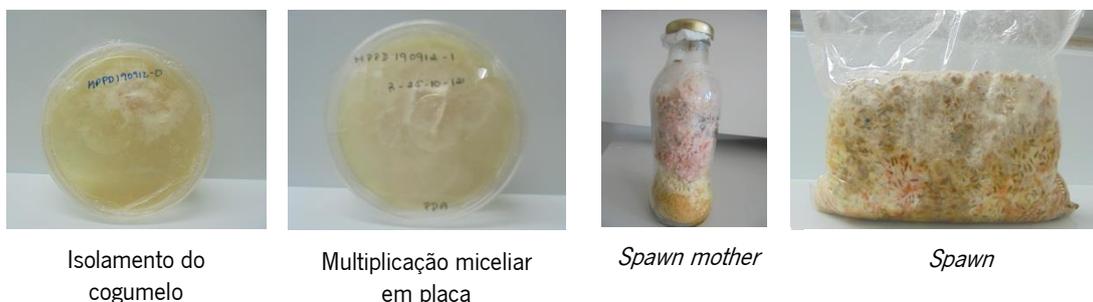


Figura 80: Crescimento micelial do *Pleurotus djamor*.

O micélio cresceu progressivamente em todas as etapas, obtendo-se no final um *spawn* de qualidade e ausente de contaminações.

Seguiu-se a realização dos substratos propriamente ditos. Os substratos realizados à base de serrim não mostraram um crescimento uniforme nem na velocidade esperada. Em todos eles o crescimento miceliar sugeriu que o substrato estaria demasiado denso. Esperar-se-ia que o grão de trigo utilizado proporcionaria espaços livres para a proliferação das hifas, atingindo todos os espaços do substrato. No entanto, tal não se sucedeu. O micélio desenvolveu-se, unicamente, num diâmetro de aproximadamente 2 cm a 3 cm em volta do *spawn*, estagnando e não inoculando o restante substrato. O micélio mostrou o mesmo comportamento em todos os substratos, pelo que o ocorrido poderá ser consequência da composição do serrim utilizado. No mercado é difícil fazer a seleção do serrim, pois eleva bastante o seu custo económico. Isto leva a que o serrim não seja uniforme, podendo ter, por exemplo, madeira resinosa, provocando o insucesso no crescimento. O serrim tinha pH de 6,8, e os substratos compreendiam pH na gama de 6,3 a 6,5 estando aproximado do necessário, sendo este de 6,5, logo este parâmetro não será a origem do problema.

Os resultados do *Pleurotus cornucopiae* reforçam a possibilidade da qualidade do serrim ser o problema, pois este deteve o mesmo comportamento. O micélio proliferou circularmente ao longo do *spawn*, estagnando o seu crescimento, tal como pode ser visto na Figura 81.

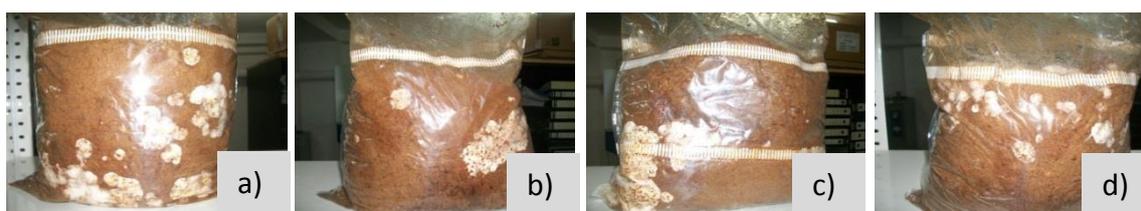


Figura 81: Substratos inoculados com *Pleurotus*. a) e b) *Pleurotus djamor*; c) d) *Pleurotus cornucopiae*.

Ao fim de 7 semanas, os substratos mostraram uma maior colonização, mas o tempo comparativamente aos substratos de palha torna inviável a realização dos substratos à base desta matéria-prima.

A posição dos substratos face aos filtros, não mostrou qualquer diferença. Os substratos na parte inferior do saco, ou seja, distantes do filtro não mostraram diferença na velocidade de crescimento face aos substratos que foram colocados na fração onde estão situados os filtros. A proximidade do fungo aos filtros poderia promover as trocas gasosas de forma mais eficiente

e/ou rápida, resultando numa incubação mais rápida, mas tal não se verificou, tendo-se constatado que a disposição é indiferente.

Os substratos de palha, tanto de *P. djamor* como *P. cornucopiae* foram colonizados como esperado, como pode ser visualizado na Figura 82.



Figura 82: Substratos realizados à base de palha. a) *Pleurotus djamor*, com filtros em contacto com o substrato b) *Pleurotus djamor* com os filtros na parte superior do saco; c) *Pleurotus cornucopiae*.

Ao fim de 4 semanas os substratos de ambas as espécies mostraram a proliferação ao longo de todo o substrato, estando perfeitamente incubados. Semelhante aos substratos à base de serrim, testou-se igualmente a influência da colocação dos filtros face ao substrato. A velocidade de crescimento foi a mesma nos dois casos, mostrando a irrelevância deste ponto, não sendo a proximidade dos filtros um parâmetro significativo para a velocidade de incubação em substratos à base de palha destas espécies.

Ao fim das 4 semanas, expuseram-se os substratos ao oxigénio, abrindo um orifício de cerca de 5 cm². Ao fim 4 dias, surgiram os primórdios. Com as condições ambientais adequadas referidas no ponto 5.4. do presente trabalho, nos 3 dias seguintes obteve-se a frutificação esperada, tal como ilustrado na Figura 83.



Figura 83: Frutificação do *Pleurotus cornucopiae*.

Os substratos apresentaram 3 frutificações, com um intervalo de 3 semanas entre cada uma, onde, no total, obteve-se 24 % de rendimento em ambas as espécies. As produções com substratos à base de palha mostraram-se, assim, muito mais eficazes e previsíveis que os substratos à base de serrim, para ambas as espécies, sendo aconselhável a sua utilização em produções em grande escala.

10.5.2 Produção de *Pleurotus eryngii*

O micélio do *Pleurotus eryngii* cresceu como esperado, tendo-se, ao fim de 4 semanas, concluído o tempo de incubação de cada uma das etapas inerentes à produção do cogumelo, tal como ilustrado na Figura 84.



Figura 84: Produção de *Pleurotus eryngii*. a) Placa de micélio; b) *Spawn mother*; c) *Spawn*; d) Frutificação.

O micélio desenvolve-se de tal forma que acaba por criar uma massa num curto espaço de tempo se não for armazenado no frio de imediato finalizado o seu tempo de incubação. Em contacto com o oxigénio, ou com qualquer contacto físico, esta massa escurece e torna-se desnecessária, pelo que, no momento da inoculação no substrato, deve-se retirá-la e não utilizá-la no processo. Esta massa miceliar surge nos substratos de igual forma, podendo, por vezes, ser confundida como primórdios. No entanto, é importante retirá-la no momento da frutificação, de modo a não atrair pragas nem contaminações, pois esta não tem qualquer utilidade no processo.

Como ilustrado na Figura 84, obteve-se a frutificação do cogumelo *P. eryngii*. Assim que os substratos se encontraram completamente incubados, arranhou-se ligeiramente a parte superior dos substratos, ainda dentro do saco e, posteriormente, abriram-se os sacos, expondo os substratos ao oxigénio, estando todos expostos às mesmas condições atmosféricas. Manteve-se a 18 °C com humidade de 85 %. Ao fim de 4 dias, visualizaram-se primórdios e, passado 3 dias ocorreu a frutificação. Na Tabela 21 pode-se visualizar os cogumelos obtidos assim como o rendimento.

Tabela 21: Peso dos cogumelos obtidos, kg, e indicação do rendimento do peso dos cogumelos face ao peso do substrato

	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4
<i>Peso cogumelos/g</i>	793	801	804	810
Rendimento	22,66	22,89	22,97	23,14

Os resultados obtidos indicam que as variações das composições utilizadas não foram muito relevantes, tendo-se obtido um rendimento médio de 22,92 % dos 25 % teoricamente esperados.

11. Conclusões

Este trabalho teve como principal objetivo o desenvolvimento do processo de produção de cogumelos, abrangendo especificamente cada etapa, com o intuito de, por fim, alcançar a produção de *Morchella esculenta* e *Macrolepiota procera*. Numa segunda etapa, teve como objetivo o estudo genérico de novos substratos, com o propósito de extrapolar para a produção em grande escala de outras espécies, como *Pleurotus djamor*, *Pleurotus cornucopiae* e *Pleurotus eryngii*.

Para alcançar estes objetivos, desenvolveu-se todo o processo inerente à produção de cogumelos, realizando a repicagem do micélio em placa de *Morchella esculenta* e *Macrolepiota procera*, multiplicação do micélio em meio de cultura, produção de *spawn mother*, produção de *spawn* e produção do substrato.

A multiplicação do micélio em meio de cultura, o *spawn mother* e o *spawn* de *Morchella esculenta* foram produzidos com sucesso. Cada etapa necessita de cerca de 3 a 4 semanas de tempo de incubação, ausente de contaminações. Os substratos realizados foram sujeitos a diferentes induções de frutificação, tais como choque de humidade, exposição ao ar, choque térmico e recorrendo a uma camada de matéria orgânica. Em todos os casos, o substrato acabou eventualmente por contaminar, impedindo a frutificação do mesmo.

O isolamento do micélio, a multiplicação micelar em meio de cultura, o *spawn mother* e o *spawn* de *Macrolepiota procera* foram produzidos com sucesso, assim como os substratos.

O desenvolvimento micelar em diversos substratos para todas as espécies estudadas é possível, desde que se cumpram todos os requisitos necessários na elaboração dos substratos. Verificou-se que a utilização de sacos com filtro é extremamente importante para promover as trocas gasosas que o micélio necessita, nomeadamente a utilização de oxigénio. No entanto, se não se trabalhar de forma metódica e cuidadosa, os filtros poderão encharcar e tornar-se permeáveis aos microrganismos, proporcionando o surgimento de contaminações nos substratos. O controlo da humidade e da densidade no substrato são também fatores bastante importantes para promover o bom desenvolvimento micelar. Se os substratos se encontrarem demasiado densos, o micélio não tem espaço para se desenvolver, nem existe ar disponível entre as partículas para o alojamento do oxigénio, dificultando a multiplicação do micélio. Quando os substratos não são bem prensados, ou as partículas têm grandes dimensões acontece o oposto, ou seja, o micélio tem dificuldade em fazer a união entre as partículas do substrato, pois alimenta-se por absorção

e o volume de ar disponível é demasiado grande, impossibilitando a ligação. Relativamente à água presente no substrato, é muito importante que esta exista, mas em quantidades ótimas. Quando existe muita humidade no substrato, esta provoca um substrato demasiado denso, bloqueando os espaços livres que deveriam existir para a proliferação do micélio. Quando existem défices de humidade no substrato, o fungo demorará mais tempo a propagar-se, podendo mesmo não crescer se a humidade for demasiado baixa.

As espécies que não necessitam dum encharcamento para frutificar como o *P. ostreatus*, *P. eryngii*, *P. cornucopiae* e *P. djamor*, desde que se cumpram as boas condições ambientais, conseguem alcançar a produção de cogumelos. Por outro lado, espécies que necessitem de um encharcamento para frutificar, como a *M. esculenta* e *M. procera*, necessitam de condições mais restritas nas salas de produção, tais como, esterilizar a água de rega e a utilizada para encharcar o substrato, desinfetar a sala com produtos químicos mais agressivos, promover um gradiente de pressão e utilizar filtros HEPA no equipamento de ventilação.

Conclui-se também que os cogumelos são um bom aliado no combate à poluição, na medida em que podem ser utilizados resíduos agroflorestais na formulação de substratos, diminuindo assim muitos desperdícios que não têm qualquer finalidade. As lamas provenientes das ETAR são também um problema ambiental e estas poderão ser utilizadas como substrato para a produção de cogumelos, se o processo for otimizado, dado ter-se verificado o crescimento miceliar. No entanto, será necessário um controlo rigoroso das características nutricionais, principalmente nos cogumelos obtidos em substratos à base de lamas, para confirmar se não possuem nenhum constituinte prejudicial à saúde humana.

12. Perspetivas

Após a realização deste trabalho e face aos resultados obtidos, é possível enumerar vários trabalhos futuros, nomeadamente continuar com a tentativa de produção de substratos para a produção de *Morchella esculenta* e *Macrolepiota procera*, tentando outras matérias-primas, assim como o modo de indução de frutificação; recorrer a testes em salas piloto com ventilação com filtros HEPA, com gradientes de pressão, sistemas de desinfeção, controlo de humidade e temperatura, evitando contaminações de modo a atingir-se resultados fidedignos.

A realização de substratos ricos em nutrientes, propositalmente alterados, seguidos de análise química do cogumelo obtido, de forma a aferir sua constituição seria enriquecedora. Devido ao crescimento do micélio por absorção, poderá dar origem a cogumelos enriquecidos de nutrientes, sabor, ou outras características desejadas. Poder-se-á valorizar ainda mais este produto presente na alimentação humana, sendo uma mais-valia ainda maior para o seu consumidor.

As propriedades esperadas de micélio poderão também facilitar a sua aplicação na produção de alimentos, como um aditivo de sabor para produtos altamente processados.

Por fim, sendo possível obter-se o corpo frutífero de substratos à base de lamas, face à sua composição, é necessário aferir a composição dos cogumelos, avaliando se diferem dos cogumelos produzidos com substratos à base de palha, e perceber se ocorreu a absorção de componentes prejudiciais para a saúde

Bibliografia

-
- [1] P. Stamets, "Mycelium running: How mushrooms can help save the world," US, Library of congress Cataloging , 2005, pp. 13-15.
- [2] P. F. Hamlyn, "Cultivation of Edible Mushrooms on Cotton Waste," *The Mycologist*, vol. 3(4), pp. 171-173, 1989.
- [3] "Species Fungorum," [Online]. Available: <http://www.speciesfungorum.org/Names/GSDspecies.asp?RecordID=287857>. [Acedido em 11 11 2013].
- [4] N. Harsh e K. Joshi, "Mushrooms: The vegetable of the future," *Science and Technology*, n.º S&T for Rural India and Inclusive Growth, 2008.
- [5] S. Ferrador, Interviewee, *Bioinvitro*. [Entrevista]. Setembro 2013.
- [6] E.-V. R. María, T.-M. Sylvie, D.-A. Irma e V.-M. Alethia, "Disposable diapers biodegradation by the fungus *Pleurotus ostreatus*," *Waste Management*, vol. 31, p. 1683–1688, 2011.
- [7] M. B. S. Marques, "Diversidade e Ecologia dos Macrofungos do Jardim Botânico da Universidade de Coimbra," Faculdade de Ciência Universidade do porto, 2012.
- [8] C. S. e. Silva, "NaturData," [Online]. Available: <http://naturdata.com/artigos-gerais/42-opiniao/9-o-misterioso-mundo-dos-cogumelos>. [Acedido em 29 Julho 2013].
- [9] P. Stamets, "Magnificent Mushrooms: The Cast of Species," em *Mycelium Running: How Mushrooms Can Help Save the World*, Ten Speed Press, 2005, pp. 262-264.
- [10] "Training Manual on Mushroom Cultivation Technology," Asian and pacificente for agricultural engineering and machinery (APCAEM).
- [11] C. J. McNeill, "International Code of Nomenclature," *Eighteenth International Botanical Congress Melbourne*, 2011.
- [12] F. X. Martins, *Cogumelos, Mirandela*: João Azevedo Editor,, 2004.
- [13] C. S. e. Silva e R. Louro, "NaturLink," [Online]. Available: <http://naturlink.sapo.pt/Natureza-e-Ambiente/Agricultura-e-Floresta/content/Os->

- Cogumelos-Diversidade-e-Ecologia?bl=1. [Acedido em 2013 Julho 29].
- [14] C. R. Voisey, "Intercalary growth in hyphae of filamentous fungi," *British Mycological Society*, vol. 24, p. 123 e131, 2014.
- [15] W. Wozniak, "Production and quality appraisal of mycelium of parasol mushroom *Macrolepiota procera*," *Kerva polonika*, vol. 55, 2009.
- [16] A. b. principles, states the purpose of saprotrophs and their internal nutrition, as well as the main two types of fungi that are most often referred to, as well as describes, visually, the process of saprotrophic nutrition through a diagram of hyphae, referring to the Rhi.
- [17] E. Gerhardt, em *Guia de Los Hongos*, Espanha, 2009, p. 32.
- [18] E. Gerhardt, J. Vila e X. Llimona, *Hongos de Espana y de Europa*, Barcelona: Omega, 2006.
- [19] P. Prasad, K. Chauhan, L. S. Kandari, R. K. Maikhuri, R. P. Aditya Purohit e B. a. K. S. Rao, "Morchella esculenta (Guchhi): Need for scientific intervention for its cultivation in Central Himalaya," *Current Science*, vol. 82, pp. 1098-1100, 9 Maio 2002.
- [20] W. D. G. Henrickson, "a scientific approach to a policy on commercial collecting of wild fungi," *Mycologist*, vol. 11, pp. 90-91, Maio 1997.
- [21] C. Duncan, N. Pugh, D. Pasco e S. Ross, "Isolation of a galactomannan that enhances macrophage activation from the edible fungus *Morchella esculenta*," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002.
- [22] B. Nitha e K. Janardhanan, "Aqueous-ethanolic extract of morel mushroom mycelium *Morchella esculenta*, protects cisplatin and gentamicin induced nephrotoxicity in mice," *Food and Chemical Toxicology*, vol. 46, 2008.
- [23] N. Rotzoll, A. Dunkel e T. Hofmann, "Activity-guided identification of (S)-malic acid 1-O-D-glucopyranoside (morelid) and gamma-aminobutyric acid as contributors to umami taste and mouth-drying oral sensation of morel mushrooms (*Morchella deliciosa* Fr.)," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 53, 2005.
- [24] J. Ying, X. Mao, M. Q. Y. Zong e H. Wen, "Icones of Medicinal Fungi from China," *Science Press*, pp. 38-45, 1987.
- [25] O. RT, em *Mushrooms of Western North America*, California, University of

- California Press, 1979, p. 36.
- [26] D.J.Royse e B. May, "Interspecific allozyme variation among *Morchella* spp. and its inferences for systematics within the genus.," *Biochemical Systematics and Ecology*, vol. 18, pp. 475-479, 1990.
- [27] P. Guler e O. Arkan, "Cultural Characteristics of *Morchella esculenta* Mycelium on Some Nutrients," *Turk J Biol*, p. 783-794, 2000.
- [28] D. Pilz, McLain e S. Alexander, Ecology and management of morels harvested from the forests of western North America, Portland, 2007.
- [29] P. Stamets, "The morels: land-fish mushrooms of the genus *Morchella*.,," *Gourmet and Medicinal Mushroom*, pp. 401-418, 1993.
- [30] T. J. Leonard e T. J. Volk, "Production of Specialty Mushrooms in North America: Shiitake and Morels," em *Frontiers in Industrial Mycology*, 1992, pp. 1-23.
- [31] T. Brock, "Studies on the nutrition of *Morchella esculenta* fries".
- [32] E. Garnweidner, "155 *Macrolepiota procera*," em *Gran Guia de la Naturaleza Setas*, Espanha, Editorial Everest, S.A., 2005, p. 86.
- [33] P. Kalač, "Chemical composition and nutritional value of European species of wild growing mushrooms: A review," *Food Chemistry*, vol. 113, p. 9-16, 2009.
- [34] I. Ferreira, J. Vaz, M. Vasconcelos e A. Martins, "Compounds from wild mushrooms with antitumor potential," *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, vol. 10, pp. 424-436, 2010.
- [35] I. C. Ferreira, L. Barros e R. M. Abreu, "Antioxidants in Wild Mushrooms," *Current Medicinal Chemistry*, vol. 16, pp. 1543-1560, 2009.
- [36] Â. Fernandes, L. Barros, J. C. Barreira, A. L. Antonio, M. Beatriz, Oliveira, A. Martins e I. C. Ferreira, "Effects of different processing technologies on chemical and antioxidant parameters of *Macrolepiota procera* wild mushroom," *LWT - Food Science and Technology*, vol. 54, pp. 493 - 499, 2013.
- [37] Â. Fernandes, J. C. Barreira, A. L. Antonio, M. B. P. Oliveira, A. Martins e I. C. Ferreira, "Effects of gamma irradiation on chemical composition 1 and antioxidant potential of processed samples of the wild mushroom *Macrolepiota procera*," *Food Chemistry*, 2013.

- [38] J. Falandysz, M. Gučia e A. Mazur, "Content and bioconcentration factors of mercury by Parasol Mushroom *Macrolepiota procera*," *Journal of Environmental Science and Health*, vol. 42, p. 735–740, 2007.
- [39] J. Falandysz, T. Kunito, R. Kubota, M. Gučia, A. Mazur, J. Falandysz e S. Tanabe, "Some mineral constituents of Parasol Mushroom (*Macrolepiota procera*)," *Journal of Environmental Science and Health*, vol. 43, p. 187–192, 2008.
- [40] J. L. G. Henriques, "Frade (*Macrolepiota procera*) comestível e o falso frade (*Macrolepiota venenata*) venenoso. Precauções e sinais de identificação obrigatória," Direção Regional de Agricultura e Pescas do Centro, Fundão, 2012.
- [41] M. W. Beug, "An Overview of Mushroom Poisonings in North America," *The Mycophile*, vol. 45, pp. 4-5, 2004.
- [42] J. L. Brandão, J. Pinheiro, D. Pinho, D. C. d. Silva, E. Fernandes, G. Fragoso e A. S. M.I. Costa, "Intoxicação por cogumelos em Portugal," *Acta Med Port*, vol. 24, pp. 269-278, 2011.
- [43] D. Benjamin, "Gastrointestinal syndrome," em *Mushrooms: poisons and panaceas - a handbook for naturalists, mycologists and physicians*, New York, WH Freeman and Company, 1995, p. 351–377.
- [44] E. C. Vellinga, "Chlorophillum Great Britain," *Field Mycology Volume*, vol. 7, 2006.
- [45] H. García, S. Fernández e C. Sánchez, "Fatal *Lepiota brunneoincarnata* poisoning," *An Med Intern*, vol. 19, p. 322, 2002.
- [46] P. Hernández, C. Córdoba, C. Calveras, F. Enciso, F. Marco e F. Martínez, "*Lepiota brunneoincarnata* fatal intoxication," *An Med Interna*, vol. 18, p. 481, 2001.
- [47] F. Serrano, "Setas y sitios," [Online]. Available: <http://www.setasy sitios.com>. [Acedido em 31 10 2013].
- [48] Bioinvitro, *Catálogo dos fungos*, Gandra, 2013.
- [49] D. Royse, T. Rhodesa, S. Ohga e J. Sanchez, "Yield, mushroom size and time to production of *Pleurotus cornucopiae* (oyster mushroom) grown on switch grass substrate spawned and supplemented at various rates," *Bioresource Technology*, vol. 91, n.º 1, pp. 85-91, 2004.
- [50] Mycelia, *Incubation and ripening phase climate conditions*, Bélgica, 2012.

- [51] R. Y. Zhanga, D. D. Hub, X. T. Maa, S. G. Li, J. G. Gua e Q. X. Hu, "Adopting stick spawn reduced the spawn running time and improved mushroom yield and biological efficiency of *Pleurotus eryngii*," *Scientia Horticulturae*, vol. 175, p. 156–159, 2014.
- [52] A. E. R. Estrada, M. d. M. Jimenez-Gasco e D. J. Royse, "Improvement of yield of *Pleurotus eryngii* var. *eryngii* by substrate supplementation and use of a casing overlay," *Bioresource Technology*, vol. 100, p. 5270–5276, 2009.
- [53] Mycelia, "Mycelia mushroom spawn laboratory," Abril 2014. [Online]. [Acedido em Abril 2014].
- [54] Mycelia, *Cleanroom production training*, Bélgica, 2012.
- [55] S. microsac, *Microsac Gas-permeable bags*, Bélgica, 2014.
- [56] P. Stamets e J. Chilton, "Preparation of Grain Spawn," em *The Mushroom Cultivator: A Practical Guide to Growing Mushrooms at Home*, Washington, Agarikon Press, 1983, pp. 59 - 62.
- [57] Mycelia, *First introduction to substrate production*, Bélgica, 2012.
- [58] Mycelia, *Substrate production farm layout*, Bélgica, 2012.
- [59] A. P. d. Azevedo, "Contributo para o conhecimento e divulgação da Pleuroticultura," Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, 1987.
- [60] Mycelia, *Biological approach incubation ripening and fructification*, Bélgica, 2012.
- [61] Mycelia, *Autoclaving process and Steam*, Bélgica, 2012.
- [62] Mycelia, *Cooling and heating*, 2012.
- [63] Mycelia, *Building technics*, Bélgica, 2012.
- [64] Mycelia, *Racks and shelves*, Bélgica, 2012.
- [65] Mycelia, *Pests, diseases and other problems*, Bélgica, 2012.
- [66] J. T. Fletcher e R. H. Gaze, "Moulds that Compete with Mushrooms," em *Mushroom Pest and Disease - A Colour Handbook*, UK, Manson Publishing, 2008, pp. 84-89.
- [67] H. y. (. o. Helsinki), "Reason discovered for the toxicity of indoor mould," *Science*

Daily, 2012.

- [68] B. H., R. DP., L. HS, S. MD, P. SC, R. CM, M. RL e B. BA., "Endophytic Trichoderma isolates from tropical environments delay disease onset and induce resistance against *Phytophthora capsici* in hot pepper using multiple mechanisms," *Mol Plant Microbe Interact.* , p. 628, 2011.
- [69] L. Hatvani, "Mushroom pathogenic Trichoderma species: occurrence, biodiversity, diagnosis and extracellular enzyme production," *University of Szeged*, n.º Ph.D. School of Biology , 2008.
- [70] N. Horowitz, "Fifty years ago: the Neurospora revolution," *Genetics*, 1991.
- [71] e. a. Sung Mi Shim, "The Characteristics of Cultural Conditions for the Mycelial Growth of *Macrolepiota procera*," *Mycobiology*, vol. 33, pp. 15-18, 2005.
- [72] Ower, "Cultivation of *Morchella*". United States Patente 4.757.640 , 19 Julho 1988.
- [73] N. N. D. f. S. Reference, "National Agricultural Library," Agricultural Reserach Service, [Online]. Available: <http://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/2975?qlookup=11240&format=Full&max=25&man=&facet=&new=1>. [Acedido em 2013 Julho 23].
- [74] J. Kynast, "Autoclaving process and Steam," em *Mycelia*, Bélgica, 2012.
- [75] F. Calleda, *Lepiota brunneoincarnata*, Giugno, 2008.
- [76] J. Erjavec, J. Kos, M. Ravnikar, T. Dreo e J. Sabotic, "Proteins of higher fungi – from forest to application," *Trends in Biotechnology*, vol. 30, pp. 259-273.
- [77] "Catalogue of Life: 2013 Annual Checklist," [Online]. Available: <http://www.catalogueoflife.org/annual-checklist/2013/details/species/id/8459386>. [Acedido em 11 11 201].
- [78] G. Alvarado-Castillo, "Obtenção de esclerócios de Morilla (*Morchella esculenta*) em diferentes meios de cultivo.," *Scielo*, vol. 33, pp. 532-536, 2008.
- [79] V. a. Leonard, 1989.

Anexos



CENTRO PARA
A VALORIZAÇÃO
DE RESÍDUOS

Relatório de Análise N.º: CVR / 018 / 2010

ANÁLISE QUÍMICA

Resultados expressos em base seca

Parâmetros	Métodos Analíticos	Especificação 1	Especificação 2	Resultados
Análise Elementar	—	—	—	—
Carbono (%)*	A/V	—	—	20,2
Hidrogénio (%)*	A/V	—	—	2,79
Azoto (%)*	Condutividade Térmica	—	—	1,45
Enxofre (%)*	A/V	—	—	0,17
Poder Calorífico Inferior (J/g)*	M.I.; CEMTS 14918.2005	—	—	7,10E+03
Carbónica Química de Oxigénio (mg/l)*	Refluxo Fechado	—	—	141

Footnote 1:

M.I. - Regulamento (CE) 2002/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 25 de Fevereiro, relativo ao Tratamento de Resíduos de Materiais Plásticos; CEMTS - Regulamento (CE) 2002/2005 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 25 de Fevereiro, relativo ao Tratamento de Resíduos de Materiais Plásticos; CEMTS - Regulamento (CE) 2002/2005 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 25 de Fevereiro, relativo ao Tratamento de Resíduos de Materiais Plásticos.

A especificação de um resultado com o símbolo (*) é identificada como sendo inferior ao Limite de Qualificação para esse parâmetro, pelo método referido.

* Ensaio subcontratado e não acreditado; ** Ensaio subcontratado e acreditado;

Rua de Francos, 350
Azarém
4800-042 Guimarães, Portugal
Telefone: +351 253 510 020
Fax: +351 253 510 029
geral@cvrresiduos.pt
www.cvrresiduos.pt

N.º Contribuinte: 505 812 657

A RESPONSÁVEL TÉCNICA

Bernardo Eivo

O DIRECTOR DO LABORATÓRIO

Jorge Araújo

DATA DE EMISSÃO 22-12-2010

Anexo II: Caracterização das lamas de ETAR



Tabela 2: Metodologias analíticas e resultados (amostra "Alvarenga")

DESIGNAÇÃO DA AMOSTRA (CLIENTE): ALVARENGA			
PARÂMETRO	METODOLOGIA ANALÍTICA	UNIDADE	RESULTADOS
Determinação da matéria seca 105°C (*)	DIN EN 12880	% (w/w)	14,5
Azoto Amónicoal (NH4) (*)	DIN 38406-E5	% (w/w) a.o.	0,217
Azoto Amónicoal (NH4) (*)	DIN 38406-E5	% (w/w) m.s.	1,50
Matéria orgânica (*)	DIN EN 12879	% (w/w) a.o.	11,0
Matéria orgânica (*)	DIN EN 12879	% (w/w) m.s.	75,9
Azoto Kjeldahl (*)	EN 13342	% (w/w) a.o.	1,01
Azoto Kjeldahl (*)	EN 13342	% (w/w) m.s.	6,97
Azoto Nitróo (*)	Methods Book for the analysis of compost	% (w/w) a.o.	< 0,001
Azoto Nitróo (*)	Methods Book for the analysis of compost	% (w/w) m.s.	< 0,007
pH (*)	DIN EN 12176	-	7,3
Análise de elementos químicos através de digestão com água regia de acordo com a EN 13948:			
Chumbo (*)	EN ISO 11885	mg/kg m.s.	49
Cádmio (*)	EN ISO 11885	mg/kg m.s.	1,8
Cálcio (*)	EN ISO 11885	mg/kg m.s.	8.600
Crómio total (*)	EN ISO 11890	mg/kg m.s.	39
Potássio (*)	EN ISO 11885	mg/kg m.s.	2.500
Cobre (*)	EN ISO 11885	mg/kg m.s.	330
Magnésio (*)	EN ISO 11885	mg/kg m.s.	3.000
Níquel (*)	EN ISO 11885	mg/kg m.s.	27
Fósforo (*)	EN ISO 11885	mg/kg m.s.	15.000
Mercurio (*)	EN ISO 16772	mg/kg m.s.	0,13
Zinco (*)	EN ISO 11885	mg/kg m.s.	850
Parâmetros microbiológicos:			
<i>Escherichia coli</i> (**)	ISO 15649-2:2001	ufc/g	160.000
<i>Salmonella spp</i> (**)	ISO 6579:2002/AmD 1:2007	-	Positivo/ 50g

a.o. - amostra original

m.s. - matéria seca

(*) Análise do parâmetro subcontratada a laboratório externo com método no âmbito da acreditação da EN ISO IEC 17025

(**) Análise do parâmetro subcontratada a laboratório externo com método fora do âmbito da acreditação da EN ISO IEC 17025

Elaborado por: Assinatura: _____ Data: _____

Responsável: Assinatura: _____ Data: _____

S.W.E – ESTE RELATÓRIO NÃO PODE SER REPRODUZIDO, A NÃO SER NA ÍNTEGRA, SEM AUTORIZAÇÃO POR ESCRITO DO SEU RESPONSÁVEL