



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**UTILIZAÇÃO DO COMPOSTO RESIDUAL DA PRODUÇÃO DE COGUMELOS NA  
FERTILIZAÇÃO DE ALFACE (*Lactuca sativa* L.) E SEU POTENCIAL NA  
BIORREMEDIAÇÃO DE SOLOS**

**LIZ CRISTINA CAMARGO RIBAS**

Florianópolis  
2006



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**UTILIZAÇÃO DO COMPOSTO RESIDUAL DA PRODUÇÃO DE COGUMELOS NA  
FERTILIZAÇÃO DE ALFACE (*Lactuca sativa* L.) E SEU POTENCIAL NA  
BIORREMEDIAÇÃO DE SOLOS**

**Dissertação apresentada ao programa  
de Pós-Graduação em Biotecnologia  
como requisito para obtenção do título  
de Mestre em Biotecnologia – Área de  
Concentração Ambiental.**

Orientadores: Prof<sup>ª</sup> Ph.D Margarida Matos de Mendonça  
Prof. Dr. Carlos Henrique Lemos Soares

LIZ CRISTINA CAMARGO RIBAS

Florianópolis  
2006

**“UTILIZAÇÃO DO COMPOSTO RESIDUAL DA PRODUÇÃO DE  
COGUMELOS NA FERTILIZAÇÃO DE ALFACE (*Lactuca sativa* L.) E  
SEU POTENCIAL NA BIORREMEDIAÇÃO DE SOLOS”**

POR

**LIZ CRISTINA CAMARGO RIBAS**

**Dissertação julgada e aprovada em sua forma final  
pelos Orientadores e membros da Comissão  
Examinadora.**

**Orientadores:**

---

Prof<sup>a</sup>. Ph.D. Margarida Matos de Mendonça  
MIP/CCB/UFSC

---

Prof. Dr. Carlos Henrique Lemos Soares  
BQA/CCB/UFSC

**Comissão Examinadora:**

---

Prof. Dr. Germano Nunes Silva Filho  
MIP/CCB/UFSC

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Regina Vasconcellos Antônio  
BQA/CCB/UFSC

---

Anselmo Benvindo Cadorin  
EPAGRI/SC

---

**Prof. Dr. Mário Steindel – MIP/CCB/UFSC**

**Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da UFSC**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos produtores de cogumelos, que deram a razão e suporte para este trabalho. À professora Margarida, pela orientação e carinho. Aos integrantes do Laboratório de Cogumelos Comestíveis e Medicinais da UFSC, em especial à Carla, Renata e Melissa, pela amizade e pelo auxílio na realização do presente trabalho. Ao professor Carlos, pela orientação, paciência e disponibilidade. À colega Sabrina, pela inestimada amizade e ajuda. Agradeço ao professor Germano e à professora Vetúria, pela orientação nos momentos de dúvida. Ao professor Marcelo (CCA), professora Ana Viana (CCB) e ao Laboratório de Cartografia Digital da UFSC (CFH), por fornecerem subsídios para que este trabalho fosse realizado.

Agradeço especialmente a meus pais, Fernando e Graça, pelo carinho, amor e por darem o suporte essencial para que este trabalho fosse realizado. Também ao meu irmão Fernando, pelo carinho e alegria proporcionada.

Agradeço em especial ao Dan, pelo amor, companheirismo, compreensão e ajuda. Também a seus familiares – Dodi, Neco e Giovana – pelos momentos felizes.

E, em especial, agradeço ao Lucas – este novo ser que chegou na minha vida – e por ter sido privilegiada em trazê-lo ao mundo, permitindo-me crescer e tentar ser melhor do que sou.

Por fim, a todos os seres que conspiraram para a realização deste trabalho.

“O homem que está carregado de conhecimentos, de instrução, que está curvado sob o peso das coisas que aprendeu, nunca é um homem livre. Pode ser um homem altamente erudito, mas sua acumulação de conhecimentos o impede de ser um homem livre, e, por conseguinte, ele é incapaz de aprender”. (*Khishnamurti*)

“Mesmo que habiteis o mundo das formas, a ele não podeis pertencer. Vosso serviço pode levar-vos ao mundo, mas ao mundo não vos podeis consagrar”. (*Trigueirinho*)

## Utilização do composto residual da produção de cogumelos na fertilização de alface (*Lactuca sativa* L.) e seu potencial na biorremediação de solos

### RESUMO

A produção de cogumelos vem aumentando no Brasil, sendo *Agaricus brasiliensis*, *Lentinula edodes* e *Pleurotus ostreatus* três das espécies mais cultivadas. Após a produção são gerados montantes relevantes de resíduos orgânicos pré-degradados (substrato em que o fungo foi cultivado), geralmente descartados como lixo. Este material é denominado “composto residual” da produção de cogumelos (CR), podendo, quando indevidamente disposto no ambiente, causar poluição e desconfigurações ambientais. No presente trabalho, com o objetivo de identificar finalidades e valorizar CRs produzidos em Santa Catarina, avaliou-se a utilização do CR de *A. brasiliensis* (com camada de cobertura à base de solo e de turfa) e de *L. edodes*, como fertilizante orgânico e condicionador de solo no cultivo de alface (*Lactuca sativa*). Também foi avaliado o potencial, concomitante à fertilização, destes CRs e do CR de *P. ostreatus* na biorremediação de solos contaminados por xenobióticos, analisando-se parâmetros microbiológicos, metabólicos e enzimáticos (lacase). Os CRs de *A. brasiliensis*, tanto com camada de cobertura de solo como de turfa, proporcionaram o maior desenvolvimento de *L. sativa* nas concentrações de 5 e 10% (peso seco). Na adição de 10% deste CR, com camada de cobertura à base de turfa e de solo, respectivamente, o peso seco aéreo vegetal foi 2,2 e 2,8 vezes superior ao controle (solo), e 1,3 e 1,7 vezes superior à fertilização química (NPK). Adições mais elevadas (25 e 40%) proporcionaram um menor peso seco de *L. sativa*, mas proporcionaram elevação do teor de proteínas e de clorofila. O CR de *L. edodes*, nas proporções de 5, 10 e 25%, proporcionou um efeito negativo no desenvolvimento de alface, tanto no que se refere ao peso seco e área foliar, como no teor de clorofila e de proteínas. Os CRs dos três fungos selecionados apresentaram uma maior número de microorganismos e uma maior taxa metabólica (respiração microbiana) em relação a outros dois solos avaliados, assim como a manutenção da atividade da lacase ao longo de dois meses (exceção do CR de *L. edodes*, que apresentou atividades muito baixas) – o que contribui para acelerar a biodegradação de xenobióticos no solo. Na análise “in vitro” do potencial dos três fungos para biorremediação de um herbicida comercial à base de atrazina, analisou-se previamente a tolerância às concentrações de 1, 5, 10, 25 e 50µg/ml em meio BDA – constatando o crescimento dos três fungos em todas as concentrações. Na avaliação da biotransformação de atrazina em meio BDA com diferentes valores de pH, todas as espécies transformaram o herbicida, com as maiores taxas para *A. brasiliensis* (31 e 35%) ao final de 30 dias de cultivo – fato que evidencia o potencial das espécies e dos respectivos CRs na biorremediação de solos contaminados com agrotóxicos como a atrazina. Não houve indução da atividade da lacase pela presença de atrazina, porém a enzima pode estar envolvida na biotransformação. Conclui-se que o CR de *A. brasiliensis* apresentou viabilidade para utilização como fertilizante e condicionador de alface, especialmente nas doses de 5 e 10%. O potencial de biorremediação de xenobióticos como atrazina também foi constatado para este CR e para esta espécie fúngica, assim como para as demais (*P. ostreatus* e *L. edodes*).

*Palavras-chave:* Composto residual, cogumelos, fertilização orgânica, biorremediação, agrotóxicos, atrazina, cogumelo-do-sol, shiitake, alface, lacase, *Agaricus brasiliensis*, *Lentinula edodes*, *Pleurotus ostreatus*, *Lactuca sativa*.

## The use of spent mushroom compost on lettuce (*Lactuca sativa* L.) fertilization and its potential on soil bioremediation

### ABSTRACT

Mushroom production is increasing in Brazil with *Agaricus brasiliensis*, *Lentinula edodes* and *Pleurotus ostreatus* as the three most cultivated species. After mushroom production a significant amount of organic residues – substrates colonized by the fungus, pre-decomposed, known as “spent mushroom compost” (SMC) is usually disposed in the environment. These residues, when incorrectly disposed, may cause pollution and several other environmental problems. This work aimed to identify strategies of aggregating value to the SMC produced in Santa Catarina State (Brazil) using SMC from *A. brasiliensis* (with either soil or peat as casing layers) and from *L. edodes* cultivation. The use of SMC in soil fertilization and soil conditioning was tested. Additionally the potential of these SMCs and also the SMC from *Pleurotus ostreatus* in the bioremediation of soils contaminated by xenobiotics was evaluated using microbiological, metabolic and enzymatic (laccase) parameters. SMC from *A. brasiliensis*, either with soil casing layer or the peat casing layer, promoted the highest lettuce growth when 5 and 10% rates (dry weight) were added to the soil. At 10% of these SMCs with peat and soil casing layer, respectively, promoted an increase in the aerial plant dry weight of 2,2 and 2,8 times than the control (soil) and 1,3 and 1,7 times than the chemical fertilizer (NPK). Higher rates (25 and 40%) promoted a lower dry weight of *L. sativa* but improved the protein and chlorophyll level. *L. edodes* SMC, at rates of 5, 10 and 25%, had a negative effect on lettuce growth measured as plant dry weight, leaf area as well as on chlorophyll and protein levels. The SMC from these species showed higher microbial number and metabolic activities (respiration rates) when compared with both soils and also presented a higher laccase activity, characteristics that may be responsible for the improvement of the biodegradation of xenobiotic substances. In the *in vitro* studies of the potential of the three species for bioremediation of a commercial herbicide with atrazine, the tolerance for mycelial growth in PDA media at dosages of 1, 5, 10, 25 and 50 µg/ml was evaluated. It was detected that all species were able to growth at these herbicide rates. The evaluation of atrazine biotransformation in the PDA media, at different pH, showed that all species were able to transform atrazine with highest values for *A. brasiliensis* after 30 days of cultivation (31 and 35%). Although laccase induction was not detected when the herbicide atrazine was included in the media, the enzyme may have some involvement in the biotransformation. We conclude that SMC has a great potential to be used as an organic fertilizer for the production of lettuce with an additional role in the bioremediation of pesticides (atrazine) in soil, with particularly efficient results for the SMC from *A. brasiliensis*.

*Key-words:* Spent mushroom compost (spent compost), mushrooms, organic fertilizer, biorremediation, pesticides, atrazine, cogumelo-do-sol, shiitake, lettuce, laccase, *Agaricus brasiliensis*, *Lentinula edodes*, *Pleurotus ostreatus*, *Lactuca sativa*.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Fórmula estrutural de 2-cloro-4-(etilamino)-6-(isopropilamino)-s-triazina, conhecido como atrazina.....	52
FIGURA 2. Mecanismos de biodegradação da atrazina.....	56
FIGURA 3. Fase de frutificação da produção de <i>A. brasiliensis</i> em composto com camada de cobertura à base de turfa e o CR da produção misturado com a camada de cobertura.....	58
FIGURA 4. Fase inicial da frutificação de <i>L. edodes</i> em cultivo axênico e aspecto do composto residual logo após o cultivo.....	59
FIGURA 5. Mudanças de alface em desenvolvimento – cultivar Babá-de-Verão.....	64
FIGURA 6. Casa de vegetação no interior da qual foi instalado o experimento de avaliação do desenvolvimento de alface em substratos à base de solo e de CR do cultivo de <i>A. brasiliensis</i> e de <i>L. edodes</i> .....	65
FIGURA 7. Região foliar em que foram coletados os fragmentos de tecido para extração e avaliação do teor de clorofila.....	68
FIGURA 8. Composto residual da produção de cogumelos de <i>Agaricus brasiliensis</i> .....	71
FIGURA 9. Composto residual da produção de cogumelos de <i>Agaricus brasiliensis</i> após homogeneização do composto e a camada de cobertura.....	71
FIGURA 10. Composto residual da produção de cogumelos de <i>Lentinula edodes</i> em sistema axênico, utilizado nos experimentos.....	72
FIGURA 11. Composto residual à base de palhas da produção de cogumelos de <i>Pleurotus ostreatus</i> utilizado nas experimentações.....	72
FIGURA 12. Locais onde foram coletados os solos utilizados – de área de cultivo de mandioca e de área com predomínio de gramíneas e espécies vegetais invasoras.....	73
FIGURA 13. Frascos para análise de CO <sub>2</sub> com armadilhas para captura do gás carbônico e titulação da solução de NaOH com HCl para cálculo da quantidade de CO <sub>2</sub> liberado.....	75
FIGURA 14. Atividade da lacase das estirpes de <i>A. brasiliensis</i> e de <i>P. ostreatus</i> utilizadas no presente estudo, em função do pH de reação.....	79
FIGURA 15. Local de coleta do meio de cultura nas placas de Petri para extração e análise da degradação de atrazina.....	85
FIGURA 16. Peso seco total, aéreo de radicular de <i>L. sativa</i> de acordo com diferentes percentagens de CR da produção de <i>A. brasiliensis</i> .....	95

FIGURA 17. Análise de regressão com intervalo de confiança do peso seco aéreo de <i>L. sativa</i> em função do teor de CR de <i>A. brasiliensis</i> com camada de cobertura à base de turfa e de solo.....	97
FIGURA 18. Aspecto visual dos exemplares de <i>L. sativa</i> cultivados em solo, e com 25% de composto residual de <i>A. brasiliensis</i> com camada de cobertura à base de turfa e de solo.....	98
FIGURA 19. Peso seco total, aéreo de radicular de <i>L. sativa</i> de acordo com o teor do CR de <i>L. edodes</i> .....	98
FIGURA 20. Aspecto visual de exemplares de <i>L. sativa</i> cultivados em solo e em diferentes quantidades de composto residual de <i>L. edodes</i> ao final de 70 dias.....	99
FIGURA 21. Área foliar total e da área/folha de <i>L. sativa</i> de acordo com o teor e natureza do CR.....	100
FIGURA 22. Teor de clorofila foliar de <i>L. sativa</i> em função da dose do CR da produção de <i>A. brasiliensis</i> e de <i>L. edodes</i> .....	102
FIGURA 23. Teor de proteínas de <i>L. sativa</i> em função da dose do CR da produção de <i>A. brasiliensis</i> e de <i>L. edodes</i> .....	103
FIGURA 24. Carbono (CO <sub>2</sub> ) liberado em µg/g de solo – solo de gramado e de cultura de mandioca – ou de CR de <i>A. brasiliensis</i> , <i>P. ostreatus</i> e <i>L. edodes</i> .....	111
FIGURA 25. Unidades formadoras de colônias (UFCs) de fungos mesófilos em meio Martin e de bactérias mesófilas em meio Ágar-Nutriente, obtidas do CR de <i>P. ostreatus</i> .....	113
FIGURA 26. Atividade enzimática da lacase ao longo do tempo no CR de <i>A. brasiliensis</i> com pouca e acentuada homogeneização acentuada, e atividade da lacase no CR de <i>P. ostreatus</i> e de <i>L. edodes</i> .....	115
FIGURA 27. Crescimento micelial radial de <i>A. brasiliensis</i> , <i>P. ostreatus</i> e <i>L. edodes</i> em função da concentração de atrazina em meio BDA.....	118
FIGURA 28. Crescimento de <i>A. brasiliensis</i> em meio BDA com 0 e 50µg/ml de atrazina e crescimento de <i>A. brasiliensis</i> , <i>L. edodes</i> e <i>P. ostreatus</i> , em meio com 5µg/ml.....	119
FIGURA 29. Atividade da lacase de <i>A. brasiliensis</i> , <i>P. ostreatus</i> e <i>L. edodes</i> em meio BDA com diferentes concentrações de atrazina (1, 5, 10, 25 e 50µg/ml) no 15° e 30° dia de cultivo.....	120
FIGURA 30. Atividade enzimática da lacase de <i>A. brasiliensis</i> e <i>P. ostreatus</i> em meio BDA com 10µg/ml de atrazina, em função do pH do meio (4,5, 5,5 e 6,5), no 10°, 20° e 30° dia de cultivo.....	123
FIGURA 31. Atividade enzimática da lacase de <i>L. edodes</i> em meio BDA com 10µg/ml de atrazina, em função do pH do meio (4,5, 5,5 e 6,5), no 10°, 20° e 30° dia de cultivo.....	124

FIGURA 32. Crescimento micelial radial de *A. brasiliensis*, *P. ostreatus* e *L. edodes* em meio BDA com 10ug/ml de atrazina de acordo com o valor de pH (4.5, 5.5 e 6.5).....125

FIGURA 33. Porcentagem de biotransformação de atrazina em meio BDA com diferentes valores de pH, em função da espécie fúngica (*A. brasiliensis*, *L. edodes* e *P. ostreatus*) e do tempo de cultivo.....126

FIGURA 34. Porcentagem de biotransformação de atrazina em meio BDA de *A. brasiliensis*, *L. edodes* e *P. ostreatus* em função do pH do meio inicial, no 30º dia de cultivo.....127

FIGURA 35. Cromatogramas evidenciando biotransformação de atrazina “in vitro”, ao final do 30º dia de cultivo.....128

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Produção mundial em 1997 das principais espécies fúngicas produtoras de cogumelos.....	26
TABELA 2. Características químicas e microbiológicas do composto de cultivo de <i>Agaricus brunnescens</i> , antes e após a produção de cogumelos.....	30
TABELA 3. Efeito de diferentes doses de composto residual no nível de nutrientes no solo.....	32
TABELA 4. Composição média do composto residual (CR) da produção de cogumelos na Irlanda.....	33
TABELA 5. Pesquisas publicadas utilizando o CR da produção de culturas de cogumelos como fertilizante/condicionador de diversas culturas vegetais.....	34
TABELA 6. Parâmetros químicos do composto residual da produção de cogumelos em diferentes fases de maturação após o descarte.....	37
TABELA 7. Análise média da composição do CR .....	37
TABELA 8. Consumo médio de agrotóxicos (ingredientes ativos) por unidade de área para alguns países.....	49
TABELA 9. Características físicas e químicas do composto residual da produção de <i>A. brasiliensis</i> com camada de cobertura de turfa e de solo, e do composto residual de <i>L. edodes</i> .....	60
TABELA 10. Características físicas e químicas do solo.....	61
TABELA 11. Composição do solo, recomendações para adubação de alface e quantidade de adubo químico utilizado.....	63
TABELA 12. Composição do meio de cultura Ágar-Nutriente e Martin para enumeração de microorganismos .....	76
TABELA 13. Características dos CRs da produção de cogumelos de <i>A. brasiliensis</i> – com camada de cobertura à base de turfa e de solo – e de <i>L. edodes</i> , assim como do solo utilizado nas xperimentações.....	86
TABELA 14. Características dos substratos formulados com CR de <i>A. brasiliensis</i> – camada de cobertura de turfa e de solo – e de <i>L. edodes</i> , juntamente com o solo.....	89
TABELA 15. Principais características químicas dos CRs utilizados no experimento de fertilização.....	91

- TABELA 16. Comparações entre o solo (controle), adubação química (NPK) e as concentrações mais eficientes dos CRs de *A. brasiliensis*, em relação aos principais parâmetros de crescimento de *L. sativa*.....105
- TABELA 17. Comparações entre o solo (controle), adubação química (NPK) e as concentrações mais eficientes dos CRs de *A. brasiliensis*, em relação ao teor de clorofila e de proteínas solúveis foliares de *L. sativa*.....105
- TABELA 18. Comparações entre o solo (controle), adubação química (NPK) e o efeito da adubação química conjunta com 10% do CR de *A. brasiliensis* com camada à base de turfa, em relação aos principais parâmetros de crescimento de *L. sativa*.....107
- TABELA 19. Comparações entre o solo (controle), adubação química (NPK) e os tratamentos com 10% do CR de *A. brasiliensis* com camada à base de turfa e ao tratamento semelhante com adição de NPK, em relação ao teor de clorofila e de proteínas solúveis foliares de *L. sativa*.....107
- TABELA 20. Umidade, pH e condutividade elétrica do CR de *A. brasiliensis*, *P. ostreatus* e *L. edodes*, comparativamente a dois solos distintos.....108
- TABELA 21. Enumeração de microorganismos por grama de CR da produção de *A. brasiliensis*, *P. ostreatus* e *L. edodes*, e dos dois solos distintos.....113

**SIGLAS E ABREVIATURAS**

$\mu\text{S}/\text{cm}$  – miliSiemens por centímetro

BDA – Batata-dextrose-ágar (meio)

CE – Condutividade elétrica

CR – Composto residual da produção de cogumelos

HPLC – “High Performance Liquid Chromatography”

m/v – massa/volume

MO – Matéria orgânica

ppm – Partes por milhão

SMC – “Spent mushroom compost”

SMS – “Spent mushroom substrate”

v/v – volume/volume

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>17</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>23</b>
1. OBJETIVO GERAL	23
2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>25</b>
1. A PRODUÇÃO DE COGUMELOS	25
1.1. <i>Agaricus brasiliensis</i>	26
1.2. <i>Lentinula edodes</i>	27
1.3. <i>Pleurotus ostreatus</i>	29
2. O COMPOSTO RESIDUAL DA PRODUÇÃO DE COGUMELOS	29
2.1. UTILIZAÇÃO NA AGRICULTURA	31
2.1.1. <i>Lactuca sativa</i> L. (ALFACE) E A UTILIZAÇÃO DO COMPOSTO RESIDUAL NA AGRICULTURA ORGÂNICA	38
2.2. OUTRAS UTILIZAÇÕES	42
2.3. UTILIZAÇÃO NA BIORREMEDIAÇÃO	43
2.3.1. AS ENZIMAS FÚNGICAS ENVOLVIDAS	44
2.3.2. O COMPOSTO RESIDUAL E A BIORREMEDIAÇÃO	45
3. AGROTÓXICOS	48
3.1. ATRAZINA	52
<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>57</b>
1. AVALIAÇÃO DA UTILIZAÇÃO DO COMPOSTO RESIDUAL DA PRODUÇÃO DE COGUMELOS <i>Agaricus brasiliensis</i> E DE <i>Lentinula edodes</i> NO DESENVOLVIMENTO DE ALFACE ( <i>LACTUCA SATIVA</i> )	57
1.1. MATERIAIS	57
1.1.1. COMPOSTOS RESIDUAIS (CRs)	57
1.1.1.1. CR DE <i>A. brasiliensis</i> COM CAMADA À BASE DE TURFA	57
1.1.1.2. CR DE <i>A. brasiliensis</i> COM CAMADA À BASE DE SOLO	58
1.1.1.3. CR DE <i>L.edodes</i>	58
1.1.2. SOLO UTILIZADO NO CULTIVO DE ALFACE	59
1.1.3. CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DOS CRs E DO SOLO	59
1.2. CARACTERIZAÇÃO DOS MATERIAIS (CRs E SOLO)	61
1.2.1. CAPACIDADE DE CAMPO	61
1.2.2. ANÁLISE DO PH	62

<b>1.3. PROCESSAMENTO DOS MATERIAIS</b>	<b>62</b>
<b>1.4. <i>Lactuca sativa</i> E PRODUÇÃO DAS MUDAS</b>	<b>63</b>
<b>1.5. TRATAMENTOS E MONTAGEM DOS EXPERIMENTOS</b>	<b>64</b>
<b>1.6. MANEJO E ACOMPANHAMENTO</b>	<b>66</b>
<b>1.7. AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO DE <i>Lactuca sativa</i></b>	<b>66</b>
<b>1.7.1. AVALIAÇÃO DA ÁREA FOLIAR E DO PESO SECO</b>	<b>67</b>
<b>1.7.2. AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CLOROFILA</b>	<b>67</b>
<b>1.7.3. TEOR DE PROTEÍNAS SOLÚVEIS</b>	<b>68</b>
<b>1.8. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISES ESTATÍSTICAS</b>	<b>69</b>
<b>2. CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS RESIDUAIS DA PRODUÇÃO DE COGUMELOS PARA FINS DE BIORREMEDIAÇÃO DE SOLOS</b>	<b>70</b>
<b>2.1. COMPOSTOS RESIDUAIS (CRs)</b>	<b>70</b>
<b>2.1.1. CR DE <i>A. brasiliensis</i></b>	<b>70</b>
<b>2.1.2. CR DE <i>L. edodes</i></b>	<b>71</b>
<b>2.1.3. CR DE <i>P. ostreatus</i></b>	<b>72</b>
<b>2.2. SOLOS</b>	<b>73</b>
<b>2.3. UMIDADE</b>	<b>73</b>
<b>2.4. AVALIAÇÃO DO pH</b>	<b>73</b>
<b>2.5. AVALIAÇÃO DA CONDUTIVIDADE ELÉTRICA (CE)</b>	<b>74</b>
<b>2.6. LIBERAÇÃO DE GÁS CARBÔNICO (CO<sub>2</sub>)</b>	<b>74</b>
<b>2.7. ENUMERAÇÃO DE MICROORGANISMOS PELA TÉCNICA DE DILUIÇÃO E PLAQUEAMENTO EM SUPERFÍCIE</b>	<b>76</b>
<b>2.8. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA LACASE (EC 1.10.3.2)</b>	<b>77</b>
<b>2.9. DELINEAMENTO E ANÁLISES ESTATÍSTICAS</b>	<b>79</b>
<b>3. AVALIAÇÃO DA BIOTRANSFORMAÇÃO DO HERBICIDA ATRAZINA "IN VITRO" POR <i>A. brasiliensis</i>, <i>L. edodes</i> E <i>P. ostreatus</i></b>	<b>80</b>
<b>3.1. HERBICIDA</b>	<b>80</b>
<b>3.2. MICROORGANISMOS</b>	<b>80</b>
<b>3.3. PREPARO DAS CULTURAS FÚNGICAS MATRIZES PARA O ESTUDO DE BIOTRANSFORMAÇÃO</b>	<b>81</b>
<b>3.4. AVALIAÇÃO "IN VITRO" DA TOLERÂNCIA DE <i>A. brasiliensis</i>, <i>L. edodes</i> E <i>P. ostreatus</i> ÀS DIVERENTES CONCENTRAÇÕES DE ATRAZINA EM MEIO DE CULTURA</b>	<b>81</b>
<b>3.5. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA LACASE DE <i>A. brasiliensis</i>, <i>L. edodes</i> E <i>P. ostreatus</i></b>	<b>82</b>
<b>3.6. AVALIAÇÃO DA BIOTRANSFORMAÇÃO DE ATRAZINA "IN VITRO" EM DIFERENTES VALORES DE pH</b>	<b>83</b>
<b>3.7. DELINEAMENTO E ANÁLISES ESTATÍSTICAS</b>	<b>85</b>

<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>86</b>
<b>1. AVALIAÇÃO DA UTILIZAÇÃO DO CR DA PRODUÇÃO DE COGUMELOS DE <i>A. brasiliensis</i> E <i>L. edodes</i> NO DESENVOLVIMENTO DE ALFACE</b>	<b>86</b>
<b>1.1. ANÁLISES FÍSICAS E QUÍMICAS DOS MATERIAIS</b>	<b>86</b>
1.1.1. ANÁLISE DA CAPACIDADE DE CAMPO E DO PH	86
1.1.2. ANÁLISES QUÍMICAS	90
<b>1.2. AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO DE <i>Lactuca sativa</i></b>	<b>94</b>
1.2.1. PESO SECO	94
1.2.2. ÁREA FOLIAR	100
1.2.3. TEOR DE CLOROFILA E DE PROTEÍNAS SOLÚVEIS	101
<b>1.3. TRATAMENTOS RELEVANTES</b>	<b>104</b>
<b>1.4. EFEITO POTENCIALIZADOR COM NPK</b>	<b>106</b>
<b>2. CARACTERIZAÇÃO DOS CRs PARA FINS DE BIORREMEDIAÇÃO DE SOLOS</b>	<b>107</b>
2.1. CARACTERÍSTICAS FÍSICAS E QUÍMICAS	107
2.2. LIBERAÇÃO DE CO <sub>2</sub> (TAXA DE RESPIRAÇÃO MICROBIANA)	110
2.3. ENUMERAÇÃO DE MICROORGANISMOS	112
2.4. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA LACASE	114
<b>3. AVALIAÇÃO DA BIOTRANSFORMAÇÃO DE ATRAZINA "IN VITRO" POR <i>A. brasiliensis</i>, <i>L. edodes</i> E <i>P. ostreatus</i></b>	<b>117</b>
3.1. AVALIAÇÃO DA TOLERÂNCIA DE <i>A. brasiliensis</i> , <i>L. edodes</i> E <i>P. ostreatus</i> ÀS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ATRAZINA EM MEIO BDA	117
3.2. ATIVIDADE DA LACASE EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ATRAZINA NO EXPERIMENTO DE TOLERÂNCIA	119
3.3. ATIVIDADE DA LACASE E CRESCIMENTO MICELIAL DE <i>A. brasiliensis</i> , <i>L. edodes</i> E <i>P. ostreatus</i> NO EXPERIMENTO DE BIOTRANSFORMAÇÃO DE ATRAZINA EM MEIO BDA COM DIFERENTES VALORES DE PH	122
3.4. AVALIAÇÃO DA BIOTRANSFORMAÇÃO DE ATRAZINA "IN VITRO" EM DIFERENTES VALORES DE PH	125
<b>CONCLUSÕES</b>	<b>130</b>
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS E RECOMENDAÇÕES</b>	<b>134</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>136</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>147</b>

## INTRODUÇÃO

A produção de cogumelos comestíveis e medicinais vem aumentando e se expandindo em todo o mundo, inclusive no Brasil. A produção geralmente utiliza resíduos agro-industriais de natureza lignocelulósica. Finalizada a atividade de produção, é descartado um material denominado “composto residual” (CR), “spent mushroom compost” (“SMC”) ou “spent mushroom substrate” (“SMS”), o qual pode ser definido como um substrato orgânico pré-degradado e ainda colonizado pelo fungo, com seu conteúdo de nutrientes alterado em relação ao substrato inicial de cultivo e com modificações físico-químicas que não proporcionam uma nova safra, economicamente viável, do fungo selecionado.

Alguns autores diferenciam substrato residual (“SMS”) e composto residual (“SMC”): a primeira denominação é utilizada para o substrato residual que não foi submetido a um processo de compostagem previamente ao cultivo fúngico, como ocorre para espécies do gênero *Lentinula* e *Pleurotus*; a segunda denominação geralmente é utilizada para o composto residual da produção de cogumelos do gênero *Agaricus* que, previamente ao cultivo, sofreu um processo de compostagem. Contudo, no presente trabalho, ambos os materiais serão genericamente denominados de composto residual ou CR.

Cada quilograma de cogumelos produzido gera cerca de cinco quilogramas de composto residual (WILLIAMS; McMULLAN; McCaHEY, 2001). Considerando-se a produção mundial de 8 milhões de toneladas de cogumelos anualmente (CHIU et al., 2000), calcula-se que são geradas aproximadamente 40 milhões de toneladas de CR. Considerando-se o baixo valor econômico que apresenta, estima-se que 70 a 80% deste composto são descartados como lixo (SEMPLE; WATTS; FERMOR, 1998). Desta forma, o CR vem se tornando uma expressiva fonte poluidora, causadora de problemas ambientais, promovidas

pelo destino inadequado e deposição irregular no ambiente, de forma acumuladora e impactante.

As indústrias e os produtores de cogumelos em nível mundial estão, no entanto, sendo forçados, tanto pela opinião pública como pelo poder público – mais especificamente pelas leis ambientais – a serem responsáveis por dar um destino adequado ao CR, especialmente focando a sua reciclagem. Alguns métodos para sua utilização estão sendo pesquisados e implementados em diversos países (ZHANG; GONG; LI, 1994). Embora o Brasil não se encontre entre os maiores produtores de cogumelos, como a China, os Estados Unidos, o Japão e alguns países europeus (FAO, 2000), esta atividade deverá se ampliar nas próximas décadas. Dentro deste contexto, encontrar finalidades para o CR pode tornar a atividade de produção de cogumelos no Brasil, desde seu início, ambientalmente sustentável. Além disso, a pesquisa e divulgação de novas aplicações poderão não só contribuir para o reaproveitamento do CR, como também para estimular a agregação de valor comercial, promovendo indiretamente o cultivo e, sobretudo, contribuindo para a manutenção da qualidade ambiental.

Dentre as diversas utilizações já divulgadas para o CR, encontra-se sua aplicação na suplementação animal, na minhocultura, no cultivo de outras espécies fúngicas (RINKER, 2004) e até mesmo como fonte energética (WILLIAMS; McMULLAN; McCahey, 2001). Contudo, sua utilização como fertilizante e condicionador de solos, especialmente na horticultura e floricultura, apresenta-se como uma das possibilidades mais viáveis (MAHER et al., 2000; MAFF, 2004). Esta utilização vem sendo implementada com sucesso (MAHER et al., 2000; CHONG, 2004) por produtores em diversos países, especialmente europeus.

Empregado como fertilizante, o CR fornece nutrientes para as plantas e, como condicionador do solo, melhora suas propriedades físicas e químicas, reduzindo a perda de água por infiltração – por aumentar a capacidade de retenção de umidade –, melhorando a

densidade e a aeração (MAFF, 2004). A adição de CR eleva também o teor de matéria orgânica e melhora a estrutura dos solos (BEYER, 1999; CHANG, 1987; GUO; CHOROVER; FOX, 2001; MAHER et al., 2000). A matéria orgânica, sobretudo aquela composta por lignocelulose parcialmente degradada, ao ser incorporada no solo, é subseqüentemente degradada pela microbiota nativa, gerando o que é conhecido como húmus, constituinte fundamental na fertilidade de solos (CHANG, 1987).

Considerando-se que extensas áreas do território brasileiro incluem solos de baixa fertilidade e que o interesse no uso da fertilização orgânica, em substituição à adubação química, vem se expandindo, o emprego do composto residual da produção de cogumelos pode ser uma alternativa interessante na agricultura. Isso proporcionaria benefícios tanto para os produtores de cogumelos do país, como para os agricultores e consumidores, assim como para o meio ambiente.

Outra alternativa interessante para emprego do CR, adicionalmente à fertilização, é na biorremediação de xenobióticos nos solos, entre os quais destacam-se os agrotóxicos. Esta finalidade é viabilizada em virtude dos principais fungos cultivados – como *Lentinula edodes* (shiitake), *Pleurotus ostreatus* (cogumelo-ostra) e espécies do gênero *Agaricus* (champignon e cogumelo do sol) – serem lignolíticos, produzindo enzimas oxidativas, tais como a lacase, manganês peroxidase e lignina peroxidase, que estão envolvidas na degradação da lignina – uma molécula natural e recalcitrante. Mecanismo semelhante utilizado pelo fungo na degradação da lignina é empregado na degradação de uma gama de poluentes ambientais (HISON, 1991 apud EGGEN; SVEUM, 1999). Como o CR geralmente inclui por longos períodos o fungo que foi cultivado de forma viável, em termos vegetativos, assim como diversas enzimas produzidas pelo fungo, o composto dispõe de potencial para a biorremediação de poluentes ambientais. Dentro desse contexto, já foram publicados resultados promissores, utilizando o CR na degradação de hidrocarbonetos policíclicos

aromáticos (“PAH”) (EGGEN, 1999; LAU; TSANG; CHIU, 2003), de compostos fenólicos (TREJO-HERNANDEZ; LOPEZ-MUNGUIA; RAMIREZ, 2001) como pentaclorofenol (OKEKE et al., 1993), entre outros. Diversos fungos de cultivo também já apresentaram potencial de degradação de diversos xenobióticos em condições “in vitro”, tais como corantes (HATVANI; MÉCS, 2002), hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (EGGEN; SVEUM, 1999) e agrotóxicos, dentre os quais a atrazina (MASAPHY; LEVANON; HENIS, 1993).

O uso do CR na adubação orgânica de culturas vegetais, assim como seu impacto combinado na biorremediação de solos, especialmente no que se refere aos agrotóxicos, pode ser uma alternativa no processo de conversão de cultivos convencionais – à base de adubos químicos e agrotóxicos – para cultivos orgânicos sustentáveis. A utilização do composto pode contribuir para o processo de descontaminação química do solo, facilitando a certificação orgânica dos produtos agrícolas produzidos sob sua adubação, em virtude de propiciar uma redução do período de carência exigido para a detoxificação dos solos, no qual os cultivos ainda não são reconhecidos como orgânicos.

A questão da contaminação dos solos por agrotóxicos e sua descontaminação torna-se mais relevante quando se considera que o Brasil, em 2000, comercializou cerca de 140,5 mil toneladas de ingredientes ativos de agrotóxicos, estando o estado de Santa Catarina em 8º lugar no “ranking” de consumo nacional, com aproximadamente 4,7 mil toneladas utilizadas anualmente (SINDAG, 2003). Considerando ainda que os herbicidas são os agrotóxicos mais empregados – 58,5% do total utilizado – e que em culturas como as de cana-de-açúcar e de milho (culturas base da agricultura brasileira) são empregadas as maiores quantidades, o estudo da degradação de herbicidas empregados nas mesmas se torna importante quando se visa a detoxificação de solos. Dentre os herbicidas empregados nestas culturas estão aqueles formulados com o princípio 2-cloro-4-(etilamino)-6-(propilamino)-s-triazina, mais conhecido como atrazina. Estima-se que 20 mil toneladas dessa substância são

empregadas apenas na cultura canavieira no Brasil. O dado é preocupante na medida em que a atrazina, devido à sua persistência e ao seu potencial de escoamento nos solos, é um potencial contaminador de águas (BREDA, 2004). Nesse contexto, a utilização do CR da produção de cogumelos na biorremediação de solos contaminados com atrazina pode se tornar uma tecnologia interessante, tanto pelas propriedades de adsorção do xenobiótico pelo composto, como pelo potencial de biodegradação. Além disso, devido à sua origem, o CR pode vir a se tornar uma via de descontaminação de solos econômica e de fácil aquisição.

No Estado de Santa Catarina, a produção de cogumelos é realizada próxima a pólos de horticultura, especialmente nos “cinturões” verdes em torno das grandes cidades, como verificado na região de Florianópolis. Este fato viabiliza a utilização do CR como fertilizante para cultivos de interesse olerícola. Dentre as hortaliças de grande consumo no Brasil, encontra-se a alface, *Lactuca sativa* L., sexta hortaliça em importância econômica e oitava em termos de volume produzido (BIASI et al., 1991). De acordo com a EPAGRI (2003), só na região metropolitana de Florianópolis (SC), que compreende 21 municípios, são produzidas cerca de 4,7 mil toneladas de alface por ano, o que envolve aproximadamente 1362 produtores. Desta forma, a utilização do CR como fertilizante para a cultura de alface poderá ser uma forma interessante de valorização deste resíduo.

Dentre os fungos mais cultivados no Brasil e em Santa Catarina, como potenciais de geração de compostos residuais, com viabilidade de utilização, poder-se-ia destacar a espécie *Agaricus brasiliensis* Wasser & Didukh, conhecido popularmente como cogumelo do sol, do qual o Brasil é o maior produtor mundial (BRAGA et al., 1998). Outros cultivos, como de *Lentinula edodes* (shiitake) em sistema axênico e de *Pleurotus ostreatus* (cogumelo-ostra) também se encontram em expansão. Desta forma, estudar os potenciais de utilização dos CRs oriundos da produção dessas espécies fúngicas como fertilizante para o cultivo de alface e

como agente de biorremediação solos contaminados com agrotóxicos – como com o herbicida atrazina – torna-se essencial, especialmente quando se visa:

- evitar e/ou reduzir o impacto ambiental do composto residual da produção de cogumelos, através de sua utilização de forma sustentável;
- valorizar este resíduo, trazendo benefícios para os produtores de cogumelos, a sociedade como um todo e o meio ambiente;
- fornecer informações para viabilizar sua utilização pelos agricultores como fertilizante e condicionador do solo, com possível ação biorremediadora conjunta na degradação de agrotóxicos (atrazina) do solo, especialmente quando se deseja um cultivo orgânico;
- fornecer um possível produto de biorremediação de xenobióticos – para aplicação em solos – de baixo custo e fácil aquisição.

## OBJETIVOS

### 1. Objetivo geral

Avaliar o potencial de utilização do composto residual da produção comercial de cogumelos das espécies *Agaricus brasiliensis* e *Lentinula edodes* como fertilizante e condicionador do solo no cultivo de *Lactuca sativa* L. (alface) e, adicionalmente, avaliar seu potencial na biorremediação de solos contaminados com xenobióticos como agrotóxicos. Neste último caso (biorremediação), avaliar, também, o potencial dos fungos isoladamente, incluindo *Pleurotus ostreatus*, bem como o composto residual de sua produção.

### 2. Objetivos específicos

- Avaliar o efeito da aplicação e da concentração do composto residual de *A. brasiliensis* e de *L. edodes* no solo sobre o desenvolvimento de *Lactuca sativa* (alface), comparativamente à adubação química e ao solo sem adubação, visando avaliar o poder fertilizante destes compostos, analisando-se para isso parâmetros de crescimento (peso seco, parâmetros foliares) e de qualidade vegetal (teor de proteínas e de clorofila).
- Analisar as características nutricionais (químicas) desses compostos, assim como aspectos físicos (capacidade de campo e pH), visando sua aplicação como condicionador de solos.
- Determinar características microbiológicas do composto residual de *A. brasiliensis*, *L. edodes* e de *P. ostreatus* – enumeração de bactérias e fungos, liberação de CO<sub>2</sub> e atividade da enzima lacase – visando ampliar as perspectivas de sua utilização na biorremediação de solos contaminados por xenobióticos, tais como agrotóxicos.
- Avaliar, “in vitro”, a capacidade de biotransformação do herbicida atrazina pelos fungos *A. brasiliensis*, *L. edodes* e *P. ostreatus*, visando ampliar as perspectivas de utilização

do composto residual da produção de cogumelos destas espécies na biorremediação de solos contaminados com agrotóxicos, verificando-se:

- a faixa de tolerância destes fungos a diferentes concentrações de atrazina em meio de cultura BDA (Batata-Dextrose-Ágar), através da avaliação da influência do herbicida no crescimento vegetativo das espécies;
- a biotransformação do herbicida pelas espécies selecionadas em uma das concentrações de tolerância, ao longo do tempo, avaliando a influência do valor de pH inicial do meio e a dinâmica da atividade da enzima lacase sobre a biotransformação.

## REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1. A produção de cogumelos

O uso de microorganismos na valorização de resíduos orgânicos sólidos vem se tornando cada vez mais expressivo mundialmente (CHANG, 1987). Uma dessas utilizações é no cultivo de cogumelos objetivando a produção de biomassa fúngica como fonte de alimentos e de princípios farmacêuticos.

A produção mundial de cogumelos em 1999 foi de aproximadamente 8 milhões de toneladas (CHIU et al., 2000), enquanto que na década de 40 este valor era inferior a 500 mil toneladas (FERREIRA, 1998). O maior produtor é a China, com aproximadamente 510 mil toneladas produzidas em 1998, seguida pelos Estados Unidos, com 390 mil toneladas (FAO, 2000). No Brasil, por outro lado, esta atividade ainda é incipiente, com uma produção anual de 3 mil toneladas (FERREIRA, 1998). Contudo, a intensa atividade agrícola brasileira e, conseqüentemente, os montantes de resíduos agro-industriais resultantes conferem ao país potencial para se tornar um grande produtor de cogumelos.

Em diversos países, os cogumelos são considerados não só uma importante fonte de alimento de grande valor nutritivo e de princípios farmacêuticos, como também uma estratégia de aproveitamento e valorização de resíduos de origem agro-industrial (CHANG, 1984). Esses resíduos são constituídos, em sua maioria, por celulose, hemicelulose e lignina, já que provêm especialmente de materiais vegetais. Em termos ambientais, a ciclagem de nutrientes é de extrema importância para o ecossistema. Tanto a lignina quanto a celulose e a hemicelulose apresentam o carbono como base de suas estruturas moleculares. Desta forma, sua degradação é relevante para o ciclo deste elemento. A degradação da lignina, em especial, proporciona a liberação de substâncias húmicas, as quais agem na estruturação do solo ou como agentes quelantes (CERRI; ANDREUX; EDUARDO, 1992).

As espécies fúngicas com maior produção de cogumelos, em nível mundial, são apresentadas na Tabela 1.

TABELA 1. Produção mundial em 1997, em toneladas e em porcentagem da produção total, das principais espécies fúngicas produtoras de cogumelos comestíveis e/ou medicinais. Fonte: CHANG, 1999.

<b>Espécie</b>	<b>Total (ton)</b>	<b>%</b>
<i>Agaricus brunnescens</i> (= <i>A. bisporus</i> )	1.955.900	31,8
<i>Lentinula edodes</i>	1.564.400	25,4
<i>Pleurotus</i> spp.	875.600	14,2
<i>Auricularia</i> spp.	485.300	7,9

### **1.1. *Agaricus brasiliensis***

*Agaricus brasiliensis* Wasser & Didukh (WASSER et al., 2002) [= *A. blazei* (Murrill) ss. Heineman] (Família: Agaricaceae) é uma espécie fúngica que produz cogumelos comestíveis e medicinais popularmente conhecidos com “Cogumelo do Sol®”, “Cogumelo de Deus”, “Cogumelo Medicinal”, “Cogumelo Piedade”. *Agaricus* de “Murrill” ou ABM (Brasil), “Himematsutake” (Japão), “King Agaricus”, “Almond Portobelo” (Estados Unidos). *A. brasiliensis* é uma espécie nativa das Américas, sendo comumente encontrada no Brasil em regiões serranas de Mata Atlântica do Estado de São Paulo (EIRA, 2003), principalmente no município de Piedade.

Apesar do cultivo comercial de fungos no Brasil restringir-se praticamente ao “champignon”, *Agaricus brunnescens* Peck. [= *A. bisporus* Large (Imbach)], ao shiitake, *Lentinula edodes* (Berk) Pegler, e em menor escala ao shiimeji, *Pleurotus* spp. (EIRA, 2000), as áreas de cultivo e o consumo mundial de *A. brasiliensis* estão em franca expansão. O país é o maior produtor mundial desta espécie, sendo que somente no verão de 1996 e 1997 foram produzidas cerca de 20 toneladas de cogumelos desidratados (BRAGA et al., 1998). Vale ressaltar que a produção em escala comercial dessa espécie começou na década de 80, sendo

um cultivo recente, se comparado aos demais cogumelos como *L. edodes* (shiitake), que possui tradição milenar de produção (FERREIRA, 1998).

*A. brasiliensis* é uma espécie saprófita, que pode ser cultivada em substratos lignocelulósicos como, por exemplo, misturas de palhas e esterco, sendo este substrato previamente compostado, para tornar-se seletivo para o fungo. O composto é subsequentemente submetido a um tratamento térmico – a pasteurização, previamente à inoculação do fungo, para a eliminação da maioria dos microorganismos competidores.

*A. brasiliensis* tem um ciclo de produção de aproximadamente 2 a 3 meses, desde sua inoculação no composto até a primeira colheita, num total de dois a três ciclos de produção. A temperatura ótima para seu crescimento vegetativo fica entre 21 e 27°C (STAMETS, 2000), e a faixa de pH ótima entre 6,5 e 7,0 (EGUCHI; YOSHIMOTO; HIGAKI, 1998; NEVES, 2000), com um crescimento ótimo em 6,8.

## **1.2. *Lentinula edodes***

*Lentinula edodes* (Berkeley) Pegler [= *Lentinus edodes* (Berkeley) Sing] (Família: Pleurotaceae/Agaricaceae) (WASSER; WEIS, 1999; URBEN; CORREIA, 2001) é o segundo cogumelo mais produzido em nível mundial, conhecido popularmente como shiitake. Apresenta outras denominações, como “Xiangyu” (China), “Lentin” (França) (CHEN, 2001), “Cogumelo do Carvalho” (YAMANAKA, 1997) e “Cogumelo Marrom”. É nativo da China, Coreia, Tailândia, Nepal, Norte Borneu, Filipinas, Japão, além de Nova Guiné. Seu habitat natural é, em geral, troncos caídos em decomposição nas florestas úmidas do leste asiático, especialmente de árvores folhosas da família dos carvalhos (*Fagaceae*).

*L. edodes* é um fungo lignocelulolítico, o que lhe confere a capacidade de crescer em resíduos agro-industriais. É um degradador seletivo de lignina – um dos constituintes mais recalcitrantes dos tecidos dos vegetais, o que o torna um fungo especializado na degradação e digestibilidade de resíduos constituídos por este componente. Este fato foi evidenciado num

experimento envolvendo palha de milho, no qual 20% da lignina foi degradada após os primeiros 11 dias e 43% após as primeiras 7 semanas após inoculação com o fungo (SERMANNI et al., 1994).

Há algumas vantagens no cultivo de shiitake em relação à maioria dos demais cogumelos. É um fungo com capacidade para oxidar o complexo lignina-polissacarídeo do substrato, sem tratamento químico ou biológico antecedente (SHARMA, 1990 apud SHARMA, 1991). Desta forma, o substrato não necessita ser previamente fermentado (compostado), o que encurta o tempo do processo produtivo.

O cultivo de shiitake é realizado tradicionalmente em toras de árvores, sendo freqüente, no Brasil, a utilização de toras de *Eucalyptus* spp. Outra forma de cultivo é realizada em substratos formulados com serragem ou palhas (técnica “Jun-Cao”), suplementadas com farelos como de trigo, arroz, milho ou soja. Esta última técnica se assemelha àquelas utilizadas no cultivo dos demais fungos, quando se enfoca a utilização de resíduos agro-industriais e florestais.

O cultivo em toras envolve um ciclo de produção mais demorado do que os demais sistemas, ocorrendo um período mínimo de seis meses entre a inoculação do fungo e o início das frutificações. Já no cultivo em serragem ou palha, o período de cultivo é reduzido pela metade – aproximadamente três meses, dependendo da estirpe (RIBAS, 2003).

O pH ótimo para o desenvolvimento da espécie situa-se em torno de 5 e 6, com valor ótimo em 5,6. A temperatura ideal para o crescimento vegetativo (micelial) varia de 21-27°C, de acordo com a estirpe (STAMETS, 2000).

Com relação à produção brasileira de *L. edodes*, a APAN (Associação de Produtores de Agricultura Natural), ao final de 1995, estimou em 6 toneladas mensais e, em 1997, em 8 toneladas (EIRA, 2003).

### **1.3. *Pleurotus ostreatus***

*Pleurotus ostreatus* (Jaquin ex Fries) Kummer (Família Agaricaceae/Pleurotaceae) é conhecido vulgarmente como “Shimeji”, “Cogumelo Ostra”, “Cogumelo Gigante”, “Hiratake”, “Caetetuba”, (URBEN; CORREIA, 2001) e “Cogumelo Palha”. É encontrado naturalmente em regiões com faixas amplas de temperatura, especialmente em florestas tropicais. Apresenta a capacidade de saprofitizar uma ampla variedade de espécies vegetais (STAMETS, 2000), especialmente troncos de árvores em locais sombreados – como de carvalhos e salgueiros. Cogumelos deste gênero (*Pleurotus*) estão em terceira colocação dentre os mais consumidos em nível mundial (CHANG, 1999).

O crescimento micelial ótimo desta espécie ocorre em 25°C (KONG, 2004), em meio com pH entre 5,5 e 6,5. Apresenta um ciclo de produção curto, de aproximadamente 30 dias desde o início de seu crescimento vegetativo até a primeira colheita, num total de três ou quatro ciclos de produção (STAMETS, 2000). Assim como para *L. edodes*, o substrato para seu cultivo comercial não necessita ser compostado, o que facilita o cultivo. No Brasil, não existem estatísticas sobre a produção e comercialização de *Pleurotus* spp. (EIRA, 2003).

## **2. O composto residual da produção de cogumelos**

O composto residual da produção de cogumelos é um resíduo orgânico, resultante de seu cultivo comercial (GUO et al., 2001). Os principais componentes são palhas parcialmente degradadas, feno, sabugo de milho, esterco de cavalo e de frango, gesso, além de aditivos nutricionais como potassa e superfosfato (GUO; CHOROVER; FOX, 2001). Outros componentes também podem ser utilizados, como o bagaço de cana no cultivo de espécies de *Agaricus* e a serragem no cultivo de *L. edodes*. Alguns suplementos são freqüentemente utilizados, tal como uréia, farelo de trigo, de arroz e de soja.

Algumas características do composto residual de *A. brunnescens* são apresentadas na Tabela 2. Uma das características importantes deste composto, que afeta sua utilização, é a condutividade elétrica. Sharma, Furlan e Lyons (1999) verificaram que ocorreu um aumento na condutividade elétrica do composto após o cultivo do fungo, proporcionada pela elevação do teor de sais (cinzas). Além disso, o CR apresentou um maior número de bactérias do que o composto no início do cultivo.

TABELA 2. Características químicas e microbiológicas do composto de cultivo de *Agaricus brunnescens*, antes e após (composto residual - CR) a produção de cogumelos. Fonte: SHARMA; FURLAN; LYONS, 1999.

<b>Substrato</b>	<b>pH</b>	<b>Condutividade (<math>\mu\text{S}/\text{cm}</math>)</b>	<b>Cinzas (%)</b>	<b>Lipídeos (%)</b>	<b>Bactérias (log células/g composto)</b>
Composto	6,93	3,00	27,70	4,43	9,62
CR	6,12	4,24	34,86	2,83	11,38

<b>Substrato</b>	<b>Lignina (%)</b>	<b>C (%)</b>	<b>H (%)</b>	<b>N (%)</b>
Composto	19,15	34,54	4,54	2,45
CR	24,43	31,01	4,05	2,84

São produzidas aproximadamente 40 milhões de toneladas de CR proveniente das produções de cogumelos em nível mundial, sendo que apenas o Reino Unido contribui com 500 mil t/ano (MAFF<sup>1</sup>, 1994 apud SEMPLE; WATTS; FERMOR, 1998); a Irlanda com 300 mil t/ano (DODD et al., 1998) e o Canadá com 250 mil t/ano (CHONG, 2004). Em todos os casos, o CR deveria ser disposto no ambiente de forma “ambientalmente correta” (“environmental friendly”) (DUGGAN et al., 1998), o que não ocorre na maioria das vezes.

Considerando o princípio “ZERI” (“Zero Emissions Research Initiative”<sup>2</sup>), que propõe encontrar novas atividades que permitam a conversão das fontes de resíduos em fontes de empregos, alimentos, entre outros, a valorização do CR se enquadra na proposta. A utilização sustentável de resíduos lignocelulósicos visando a produção de cogumelos pode

<sup>1</sup> Ministry of Agriculture Fisheries and Food (MAFF) – United Kingdom

<sup>2</sup> www.zeri.org

contribuir para melhorar a qualidade de vida da população, reduzir a emissão de resíduos e agregar valor aos produtos da atividade de cultivo (CHANG, 2003).

### **2.1. Utilização na agricultura**

Em diversos países – especialmente europeus e norte-americanos – o CR já tem sido estudado e utilizado em diversos setores, especialmente na agricultura, como fertilizante e estruturador do solo (RINKER, 2002).

Entre suas características físico-químicas, o CR apresenta baixa densidade ( $300 \text{ kg/m}^3$ ) e elevado conteúdo de água (70%, w/w). É um substrato geralmente uniforme, constituído por matéria orgânica estabilizada. O processo de compostagem – quando presente – e o desenvolvimento do fungo proporcionam a adsorção de nutrientes à fração de matéria orgânica do composto, evitando a lixiviação excessiva desses nutrientes. Em adição, o composto apresenta um pH geralmente elevado (dependendo do fungo cultivado), variando entre 7 e 8, geralmente em torno de 7,3 quando provém do cultivo de espécies do gênero *Agaricus*. Desta forma, ao ser incorporado no solo, o CR geralmente proporciona um aumento do pH, assim como um aumento de sua capacidade de troca catiônica e uma maior agregação (MAFF, 2004).

Dentro deste contexto, o CR constitui um fertilizante com características agronômicas interessantes, especialmente pelo elevado conteúdo de matéria orgânica, podendo ser incorporado ao solo, aumentando a sua capacidade de retenção de água, além de fornecer macro-nutrientes (como N e P) para a nutrição vegetal (DODD et al., 1998). A maioria dos nutrientes, que está ligada aos compostos orgânicos presentes no composto, é liberada lentamente, até 4 a 6 anos após o período de aplicação. Já a taxa de aplicação do composto no solo deve ser determinada em função dos níveis já existentes de nutrientes, da espécie vegetal utilizada, de fertilizações anteriores e do tempo de aplicação (MAFF, 2004). A Tabela 3 apresenta o efeito da dose de composto residual no nível de nutrientes no solo.

TABELA 3. Efeito de diferentes proporções de composto residual (CR) no nível de nutrientes no solo. Fonte: MAHER, 1994.

<b>Doses de CR</b>		<b>pH</b>	<b>P<sup>1</sup></b>	<b>K<sup>1</sup></b>	<b>Mg<sup>1</sup></b>	<b>NO<sub>3</sub>-N<sup>1</sup></b>	<b>CE<sup>2</sup> (mS/m)</b>	<b>MO<sup>3</sup> (%)</b>
<b>kg/m<sup>3</sup>*</b>	<b>t/ha**</b>							
0	0	7,7	11	52	167	31	25	1,62
4,5	25	7,6	17	68	175	38	40	1,89
9	50	7,5	22	116	197	39	55	2,18
18	100	7,3	33	332	232	39	95	2,29
36	200	7,3	39	474	244	39	105	2,35
72	400	7,2	76	1231	325	42	170	2,53

\*material seco (CR); \*\* material fresco.

<sup>1</sup>Níveis de nutrientes avaliados utilizando extrato aquoso na proporção 1:1-1/2 (v/v), e expressado em mg/L de substrato; <sup>2</sup>condutividade elétrica (mS/m), <sup>3</sup>matéria orgânica (%).

Entre os diversos fatores que irão determinar o potencial de utilização deste composto como fertilizante no solo, estão: o conteúdo de nutrientes e de sais; a porosidade; a capacidade de retenção de água; a razão C/N do composto e do solo; a maturidade do composto; a presença e quantidade de sementes de plantas daninhas, insetos e patógenos, assim como o conteúdo de agrotóxicos. Na presença de patógenos no composto, estes poderão ser eliminados por pasteurização, após sua remoção do local de produção.

O composto residual contém, em média, elevado nível de nitrogênio, potássio, fósforo, cálcio e traços de outros elementos, em especial o ferro (CHONG; RINKER, 1994; GERRITS, 1994). De acordo com Maher et al. (2000), o CR apresenta uma composição média de 8 kg de N, 3,9 kg de P e 7,9 kg de K por tonelada de composto residual fresco, como evidencia a Tabela 4. Experimentos em campo tem mostrado que o nitrogênio presente no composto residual é mineralizado em uma taxa aproximada de 15% ao ano. Após 1 ano e meio de maturação (sob condições ambientais), uma pequena fração do nitrogênio e do fósforo foram perdidos, sendo que o conteúdo de potássio foi reduzido significativamente, devido à sua elevada solubilidade e conseqüente perda por lixiviação.

TABELA 4. Composição média do composto residual da produção de cogumelos na Irlanda. Fonte: MAHER; MAGETTE, 1997.

<b>Parâmetros</b>		<b>Matéria seca (%)</b>	<b>Material fresco</b>			
Densidade (kg/m <sup>3</sup> )		-	329			
Matéria seca (%)		-	31,5			
Matéria orgânica		65,0	-			
N		2,55	8,0 <sup>1</sup>			
P		1,24	3,9 <sup>1</sup>			
K		2,50	7,9 <sup>1</sup>			
Ca		7,25	22,8 <sup>1</sup>			
Mg		0,67	2,1 <sup>1</sup>			

<b>pH</b>	<b>CE (µS/cm)</b>	<b>Nutrientes avaliados<sup>2</sup> (mg/L)</b>			
		<b>N-nitrato</b>	<b>N-amoniacal</b>	<b>P</b>	<b>K</b>
6,6	7,500	63	50	32	2,130

<sup>1</sup>kg/ha; <sup>2</sup>Análises realizadas com o extrato aquoso 1:1,5 (v/v – CR/água).

O composto residual detém diversas características comuns a outros compostos orgânicos, tal como densidade relativamente baixa, elevado conteúdo de água, conteúdo moderado de nutrientes e possível concentração desbalanceada destes nutrientes para os vegetais (MAHER et al., 2000). Pesquisas em nível mundial têm sugerido o potencial do uso do CR no cultivo de diversas espécies agrícolas, porém as informações têm sido, muitas vezes, contraditórias, incompletas ou inconclusivas (CHONG, 2004). A Tabela 5 apresenta culturas vegetais que já foram fertilizadas com CR, em estudos científicos (RINKER, 2002).

Em um experimento sobre a utilização do CR como fertilizante e condicionador do solo para a cultura de tomate, em condições de estufa, analisou-se seu efeito na estrutura do solo e na qualidade dos frutos. A adição do composto reduziu a densidade e aumentou a quantidade de matéria orgânica do solo. O CR também propiciou um aumento na aeração do solo, assim como aumentou sua capacidade de retenção de água, sem apresentar efeito negativo na aeração. Adicionalmente, o CR apresentou um efeito positivo nos parâmetros de qualidade do fruto. É provável que a qualidade tenha resultado do maior conteúdo de K do

composto, sendo o elemento responsável pelo aumento do sabor e qualidade dos frutos (MAHER et al., 2000).

TABELA 5. Pesquisas publicadas utilizando o composto residual (CR) da produção de culturas de cogumelos como fertilizante/condicionador de diversas culturas vegetais. Fonte: RINKER, 2002.

Composto residual (CR)	Culturas vegetais			
	Horticultura	Fruticultura	Floricultura	Outras
<i>Agaricus brunnescens</i> (= <i>A. bisporus</i> )	<b>Pepino*</b> ( <i>Celikel;Buyukalaca, 1999</i> ) <b>Tomate*</b> ( <i>Celikel; Tuncay, 1999; Rathier, 1982; Steffen et al., 1994, 1995; Vavrina et al., 1996</i> ) <b>Berinjela*</b> ( <i>Celikel; Tuncay, 1999</i> ) <b>Aspargo, beterraba, couve-flor, repolho, pimentão, aipo, pepino, alface, mostarda, cebola, batata, radichi, feijão-vagem, espinafre, tomate</b> ( <i>Abak; Gul, 1994; Anón, 1979; Faassen et al., 1992; Kaddous; Morgans, 1986; Maher, 1994; Maher et al., 2000; Male, 1981; Massi, 2001 – com. pessoal; Maynard, 1989; Maynard, 1991; Maynard, 1994; Nguyen et al., 1987; Pili et al., 1993; Ranganathan; Selvaseelan, 1997; Rhoads; Oison, 1995; Seivi; Selvaseelan, 1999; Sochtig; Grabbe, 1995; Stephens et al., 1989; Stewart et al., 1998; Schwark, 1985; Wang, 1983; Wang et al., 1984</i> )	<b>Morango</b> ( <i>Sanees; Ingram, 1977</i> ) <b>Maçã</b> ( <i>AntSaoir et al., 2000; Delver, 1982; Delver; Werthein, 1988</i> ) <b>Uva</b> ( <i>Beyer, 2001 – com. pessoal</i> ) <b>Pêssego</b> ( <i>Derkacz, 2002 – com. pessoal</i> ) <b>Ameixa italiana</b> ( <i>Robbins et al., 1986</i> )	<b><i>Chrysanthemum*</i></b> ( <i>Rathier, 1982</i> ) <b>“Easter lilies”*</b> ( <i>Dallon, 1987; White, 1976</i> ) <b><i>Helleborus*</i></b> ( <i>Richter et al, 1980</i> ) <b>Petúnias*</b> ( <i>White, 1976</i> ) <b>Petúnias*</b> ( <i>White, 1976</i> ) <b>Poinsettia*</b> ( <i>White, 1976</i> )	<b>Chá</b> ( <i>Manivel et al., 1994</i> ) <b>“Green Gram”</b> ( <i>Ranganathan; Selvaseelan, 1994</i> ) <b>Milho</b> ( <i>Weber et al., 1997; Wuest; Fahy, 1991; Wuest et al., 1991; Wuest et al., 1995</i> ) <b>Centeio (palha)</b> ( <i>Maher, 1994; Maher et al., 2000</i> )
<i>Lentinula edodes</i>	<b>Tomate</b> ( <i>Lin; Chuen, 1993</i> )	-	-	-
<i>Pleurotus ostreatus</i>	<b>Repolho, berinjela</b> ( <i>Abdallah, 2000</i> ) <b>Alface</b> ( <i>Batista et al., 2000</i> ) <b>Pepino</b> ( <i>Ngyyen et al., 1987</i> )	-	-	-

\* Cultivado em estufa; demais cultivadas no campo.

Na produção de batata em campo, em solo fertilizado com diferentes doses de nitrogênio na forma de nitrato de amônia e cálcio, a aplicação de CR proporcionou um aumento significativo na matéria seca, na colheita intermediária (a segunda colheita), tanto da

parte aérea das plantas quanto dos tubérculos, e aumentou o peso seco e fresco dos tubérculos ao final da colheita. É possível que a adição de matéria orgânica ao solo através do CR, tenha um efeito benéfico na estrutura do solo e em sua atividade microbiológica, o que proporcionou um maior crescimento e obtenção de nutrientes. A adição do composto residual, especialmente em maiores quantidades (64t/ha), aumentou a produção de matéria seca dos tubérculos e a concentração de N e K (MAHER et al., 2000).

Além de ser utilizado na recuperação de solos, foi verificado que o CR pode ser utilizado com sucesso como substituto da turfa como meio de crescimento para plantas (MAHER, 1991). Algumas empresas, tais como a “Melcourt Spent Mushroom Compost<sup>3</sup>”, “Baron Jackson Co. Ltd.<sup>4</sup>”, a “Greely Sand & Gravel<sup>5</sup>” e a “Amgrow Gardening<sup>6</sup>”, comercializam o composto residual da produção de cogumelos, com recomendações para melhorar a estrutura do solo, para aumentar o conteúdo de matéria orgânica, reter água em solos arenosos, sendo enfatizada sua utilização em jardins e sementeiras, sobretudo para plantas ornamentais e hortícolas, ou para recuperação de solos.

Quando aplicado em solos agrícolas, em baixas concentrações, o CR foi benéfico em termos de fertilidade e não representou uma ameaça à qualidade das águas. Quando foi aplicada uma camada de CR de 2,5cm no solo, no cultivo de milho, por exemplo, três vezes por ano, a qualidade da água não foi alterada. Porém, quando uma camada mais espessa foi aplicada, a qualidade das águas foi prejudicada (KAPLAN et al., 1995 apud GUO et al., 2001).

Dependendo da concentração, alguns nutrientes podem ser prejudiciais em termos de condicionamento de solos. Maher et al. (2000), constataram que o CR apresenta teores de potássio (K) e fósforo (P) elevados. Ao analisarem a composição média de 13 amostras de

---

<sup>3</sup> <http://www.melcourt.co.uk>. Acesso: mar/2004

<sup>4</sup> <http://peek-a-boo-bang.wyrdweb.com>. Acesso: mar/2004

<sup>5</sup> <http://www.greelysand.com/default.htm>. Acesso: mar/2004

<sup>6</sup> <http://www.gardenking.com.au>. Acesso: mar/2004

composto residual, verificaram um elevado nível de K inicial (entre os nutrientes solúveis em água) e uma elevada condutividade elétrica. Inicialmente, todo o potássio estava solúvel em água, sendo, portanto, facilmente lixiviado. Foi verificada uma relação entre K e condutividade elétrica, sugerindo que o K no composto residual foi responsável pelo elevado conteúdo inicial de sais.

Estudos laboratoriais demonstram que extratos aquosos do composto residual também apresentam elevadas concentrações de carbono orgânico, K, Ca, Mg, Cl e  $\text{SO}_4$  (CHONG; RINKER, 1994). Contudo, o elevado conteúdo de sais encontrado no composto residual fresco, logo após o fim da produção de cogumelos, limita sua utilização imediata como um meio para o crescimento de plantas (CHONG; RINKER, 1994; GUO et al., 2001). Este fato é resulta da sensibilidade de algumas plantas a elevados teores de sais (BEYER, 1999; CHONG, 2004). Por esta razão, na Pennsylvania, por exemplo, a legislação estabelece que o composto deve permanecer em repouso, sob condições climáticas ambientais, por aproximadamente dois anos antes de ser reutilizado (GUO et al., 2001). Contudo, Chang (1987) recomendou um período de 2 a 3 meses de maturação no campo, antes da aplicação, enquanto Beyer (1999) mencionou 6 meses ou mais. As Tabelas 6 e 7 apresentam a composição química de um composto residual fresco, logo após a produção de cogumelos, e após maturação.

A aplicação do CR recém descartado (fresco) no solo pode resultar no acúmulo de quantidades excessivas de N, K e P para as plantas. Desta forma, a quantidade a ser aplicada não deverá exceder as necessidades da espécie vegetal selecionada, havendo a necessidade de estudos prévios de composição do solo e do composto.

TABELA 6. Parâmetros químicos do composto residual da produção de cogumelos em diferentes fases de maturação após o descarte. Fonte: LEVANON; DANAI, 1995.

Parâmetros	Período de maturação (meses)			
	0	1	2	3
Umidade (%)	59,4	54,9	46,1	29,2
Cinzas (%)	42,5	52,3	54,7	63,3
MO <sup>1</sup> (%)	57,5	47,7	45,3	36,7
C orgânico (%)	33,3	27,6	24,9	21,2
N (%)	2,1	2,1	1,8	1,5
C/N	15,8	13,1	13,8	14,1
P (%)	0,8	1,0	1,1	1,7
K (%)	2,5	1,0	1,0	0,7
Ca (%)	9,7	10,5	12,2	11,7
Na (%)	0,7	0,16	0,22	0,09
pH	8,1	7,5	7,2	7,0
CE <sup>2</sup> (mmhos/cm <sup>2</sup> )	31,2	9,9	12,5	10,2

<sup>1</sup>Matéria orgânica; <sup>2</sup>condutividade elétrica.

TABELA 7. Análise da composição média do composto residual (CR) da produção de cogumelos. Fonte: BEYER, 1999.

Componentes	CR fresco – após produção (% matéria seca)	CR maturado – 16 meses após produção (% matéria seca)
Na	0,21 – 0,33	0,06
K	1,93 – 2,58	0,43
Mg	0,45 – 0,82	0,88
Ca	3,63 – 5,15	6,27
Al	0,17 – 0,28	0,58
Fe	0,18 – 0,34	0,58
P	0,45 – 0,69	0,84
Amônia – N,NH <sub>4</sub>	0,06 – 0,24	0,00
N orgânico	1,25 – 2,15	2,72
N total	1,42 – 2,05	2,72
pH	5,8 – 7,7	7,1

Quando o composto é incorporado ao solo, a população microbiana presente pode converter as proteínas do composto em amônia, sendo este aumento inicial de amônia tóxico para diversas plântulas. Desta forma, os principais fatores limitantes para a utilização do CR são o conteúdo de sais, a produção de amônia após sua incorporação ao solo e as mudanças de pH durante o período de maturação no ambiente. Algumas plantas toleram solos com elevada concentração de sais, e outras toleram elevados níveis de amônia. Contudo, ambos os fatores são gradualmente reduzidos pela incorporação prévia ao cultivo vegetal do CR no solo, ou quando este é deixado em repouso no ambiente por algum tempo (MAFF, 2004) – período em que ocorre a lixiviação de diversos íons.

Segundo Maher et al. (2000), um outro problema do CR consiste no mesmo poder ser uma fonte de nitrogênio de baixa liberação. A suplementação com este elemento, especialmente através da fertilização química – que fornece os nutrientes de forma mais disponível e imediata – resulta em uma maior produtividade vegetal. Contudo, este tipo de fertilização é interessante em um primeiro momento para o vegetal, mas não a longo prazo e para a manutenção da cultura.

### **2.1.1. *Lactuca sativa* L. (alface) e a utilização do composto residual na agricultura orgânica**

A produção de hortaliças no Brasil vem aumentando ao longo dos anos, assim como sua produtividade. De acordo com a FAO-FAOSTAT<sup>7</sup>, a área cultivada de hortaliças no Brasil entre 1984-2004, praticamente se manteve constante, em cerca de 800 mil hectares (EMBRAPA, 2005a). Contudo, a produção aumentou aproximadamente 1,6 vezes no mesmo período, chegando, em 2004, a 16.086 mil toneladas (EMBRAPA, 2005b). Esta estatística mostra um aumento na produtividade das hortaliças de 12,4 t/ha em 1984 para 20,7 t/ha em

---

<sup>7</sup> FAO-FAOSTAT Database Results. Disponível em: <<http://www.apps.fao.org>>. Acesso em: fev. 2005 (Pesquisa: Embrapa Hortaliças 2005)

2004 (EMBRAPA, 2005c), resultado do desenvolvimento de sistemas de cultivos mais produtivos.

A alface (*Lactuca sativa* L.), pertencente à família Asteraceae (Composta), está entre as dez hortaliças mais apreciadas para consumo “in natura” no Brasil. Estima-se que são plantados anualmente 110 mil hectares de alface, com uma produção aproximada de 91 toneladas (EMBRAPA, 2005d). A alface é a hortaliça folhosa de maior valor comercial no Brasil, e as regiões Sul e Sudeste são as maiores consumidoras. A maioria dos cultivares é adaptada a clima ameno, sendo apropriadas para cultivos no outono e inverno (MOREIRA; FONTES; CAMARGOS, 2001).

A alface é uma hortaliça folhosa, herbácea, que apresenta diversidade de formas: o tipo asparagus é caracterizado pelo talo grosso e folhas pontudas; o tipo romana possui folhas em formato oblongo, dispostas perpendicularmente em posição vertical, enquanto o tipo “manteiga” apresenta folhas que se prendem ao caule fechando-se na forma de cabeça (CONTI, 1994 apud MAISTRO, 2001). A alface é classificada comercialmente, segundo o “Programa Horti & Fruti Padrão” da Secretaria e Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, em Americana, Crespa e Lisa, além de Mimososa e Romana. De acordo com dados do CEAGESP para 2000-2004, o tipo Crespa foi o mais comercializado no Estado de São Paulo (TRANI et al., 2005).

Existem diversos cultivares de alface, como Gizele, Grand Rapids, Hortência, Marisa, PiraRoxa, Red Fire, Renata, Vera, Verônica, Vanda (crespas); Elisa, Karla, Lídia, Regina (lisas); Irene, Laurel, Lorca, Raider, Tainá (americanas); Roxane, Salad Bowl (mimosas); Lent a Monter, Mirella, Paris Island Cós (romanas) (TRANI et al., 2005). Existem diversos outros cultivares, como Brasil 48, Grand Rapids, Vitória Verde Clara, Brasil 303, Maravilha das Quatro Estações, Great Lakes China (SANTOS; CASALI; MIRANDA, 1998), “Babá-de-Verão”, entre outros.

De acordo com Figueira (1982), o preparo das mudas para o cultivo de alface normalmente é realizado em sementeiras, sendo estas transplantadas 20 a 30 dias após a semeadura, quando já apresentam de 4 a 6 folhas e uma altura média de 8 a 10cm. O pH do solo de cultivo deve ser corrigido previamente para um valor entre 6 e 6,8, em virtude de ser a faixa de pH ótima para o desenvolvimento de *L. sativa*. Já a colheita da alface é realizada após 70-90 dias de cultivo, quando a “cabeça” atinge o seu máximo de desenvolvimento, desde a semeadura.

De acordo com Barros (1979), a qualidade da alface varia de acordo com características do solo, tanto em relação aos seus aspectos químicos como físicos. A fertilização resulta em maiores rendimentos e num produto mais uniforme e de maior valor comercial. Contudo, o crescimento da alface e como consequência o acúmulo de nutrientes é lento até cerca de 30 dias após a emergência, aumentando rapidamente após este período. Apesar de absorver quantidades relativamente pequenas de nutrientes quando comparada com outras culturas, por apresentar um ciclo de cultivo curto, a alface pode ser considerada exigente em termos nutricionais, especialmente na fase final do ciclo. Sendo a produção composta basicamente por folhas, a cultura responde à fertilização nitrogenada, nutriente que requer um manejo especial por ser facilmente lixiviável e pelo fato da cultura absorver cerca de 80% do total extraído nas últimas quatro semanas de crescimento (KATAYAMA, 1993; SMITH; HADLEY, 1989). A cultura também responde a elevados teores de umidade no solo (MACIEL, 1968 apud SANTOS et al., 2001).

O cultivo de hortaliças com adubos orgânicos vem aumentando nos últimos anos, devido principalmente ao aumento da demanda de produtos orgânicos pela população, como também pelos elevados custos dos adubos minerais e pelos efeitos benéficos da matéria orgânica em solos intensivamente cultivados por métodos convencionais (ASANO, 1984 apud SANTOS et al., 2001; RODRIGUES, 1990).

A adubação orgânica, além de melhorar a estrutura do solo, apresenta um elevado efeito residual, ao contrário da fertilização química. Aumentos de produtividade de alface em função do aumento de níveis de matéria orgânica são relatados por diversos autores. No entanto, há também estudos que comprovam que elevadas adições de composto orgânico podem conduzir à salinização do solo, limitando a produção devido à excessiva concentração de íons (SANTOS; CASALI; MIRANDA, 1998).

O fornecimento excessivo de nitrogênio em forma disponível, embora possa promover um adequado crescimento vegetativo, pode ser prejudicial à qualidade nutricional da alface, devido ao acúmulo de nitrato nas folhas, o que pode causar problemas à saúde humana quando ingerido em excesso (MAYNARD et al., 1976 apud KATAYAMA, 1993). De acordo com Rodrigues (1990), a utilização de composto orgânico na cultura da alface propicia um menor acúmulo de nitrato na planta pelo fato da liberação do N do composto ser mais gradual. Por outro lado, a adição de uma fonte de N prontamente disponível facilita a absorção e o acúmulo de nitratos na planta.

Normalmente a adubação orgânica é realizada com esterco de animais. De acordo com Raiz et al. (1997), recomenda-se para o plantio de alface uma adubação orgânica com 60-80 t/ha de esterco de curral ou um quarto dessa quantidade de esterco de galinha. Como alternativa, o CR apresenta potencial para ser empregado como um adubo em culturas agrícolas orgânicas, desde que adequadamente produzido e manejado.

De acordo com a Instrução Normativa N° 7 (1999) do Ministério da Agricultura, que dispõe sobre as normas para a produção de produtos orgânicos vegetais e animais no Brasil, entre os adubos e condicionadores permitidos, quando adquiridos fora da unidade produtora, poderia se destacar o esterco composto, a biomassa vegetal, alguns resíduos industriais, microorganismos – desde que não sejam organismos geneticamente modificados (OGMs) –, assim como aminoácidos e enzimas não oriundas de OGMs. Dentro deste

contexto, o CR da produção de cogumelos poderia perfeitamente se enquadrar dentro do grupo dos fertilizantes visando uma produção agrícola orgânica. Evidentemente que o manejo dos produtores de cogumelos durante o cultivo deverá seguir moldes orgânicos, como a não utilização de agrotóxicos, objetivando evitar contaminações do CR.

## **2.2. Outras utilizações**

O CR pode ser empregado na alimentação animal (CHANG, 2003), especialmente como suplemento para ruminantes. Esta possibilidade se deve ao fato do fungo pré-degradar o substrato, utilizando-o como nutriente e aumentando sua digestibilidade. Além disso, o composto residual, por apresentar biomassa fúngica, é uma fonte de proteínas.

A utilização de palha de algodão como alimento para o gado, após sua utilização na produção de *Pleurotus* sp., foi relatada por Silanikove et al. (1988, apud ZHANG; GONG; LI, 1994). Adamović et al. (1998), ao realizarem um trabalho sobre a biodegradação de palha de trigo por *P. ostreatus* e seu uso na dieta do gado, concluíram que o composto residual da produção desta espécie poderia ser utilizado como parte da dieta destes animais. Verificaram que o consumo do composto, misturado com a ração do animal, não poderia ultrapassar os 17% da matéria seca diária. Adicionalmente, o CR do cultivo de *A. brunnescens*, formulado com palha de trigo, foi utilizado com sucesso na dieta de carpas (*Cirrhina mirigala*) (RINKER, 2002).

O composto pode também ser empregado como substrato para a minhocultura e para o crescimento/cultivo de outras espécies fúngicas (CHANG, 1987; RINKER, 2002). A incineração do CR como fonte de energia tem sido discutida como uma das alternativas para sua utilização (MAHER et al., 2000; WILLIAMS; McMULLAN; McCahey, 2001), especialmente na Europa. Contudo, no Brasil, cujos solos são em sua maioria pobres, seu uso como fertilizante parece ser a estratégia de utilização mais apropriada. A combustão do CR

pode gerar poluentes atmosféricos, enquanto sua aplicação como fertilizante, de forma sustentável – não veiculando excesso de nutrientes – é uma alternativa ecológica interessante.

O composto residual pode ainda ser empregado como um agente no controle de fitopatógenos, tal como na sarna da macieira (CR de *A. brunnescens*) e no controle de nematóides (CR de *P. ostreatus*) (RINKER, 2002). É susceptível de ser empregado na produção de biogás e, juntamente com esterco animal em um biodigestor, produzir um condicionador de solo de qualidade (CHANG, 1987).

### **2.3. Utilização na biorremediação**

A biorremediação é um processo que utiliza sistemas biológicos para remoção ou degradação de poluentes. A biorremediação pode ser viabilizada “in situ” ou “ex situ” – onde, neste caso, ocorre em biorreatores ou pilhas de composto (ALEXANDER, 1994 apud LAW et al., 2003).

Dentro desta estratégia, grande ênfase tem sido dada aos processos de tratamento de resíduos que empregam bactérias, uma vez que são amplamente utilizados em inúmeras aplicações industriais, inclusive no tratamento de resíduos. No entanto, algumas limitações restringem a utilização de bactérias quando se têm condições de estresse ambiental, como baixos teores de nutrientes, baixos valores de pH, elevadas concentrações do contaminante e baixa atividade de água. Além disso, as bactérias apresentam baixa eficiência na degradação de compostos insolúveis em água, ou ligados ao solo, e seu sistema enzimático pode ser induzido somente na presença do contaminante. Sendo assim, baixos níveis do contaminante, ainda indesejáveis, podem ser insuficientes para induzir a produção ou a atividade das enzimas desses organismos, diminuindo significativamente o processo de biodegradação.

Por outro lado, os fungos apresentam uma série de características que os tornam interessantes na aplicação em sistemas de biorremediação. São capazes de crescer sob as condições de estresse ambiental que limitam o crescimento bacteriano. Além disso, o modo de

crescimento dos fungos – induzido quimiostaticamente em direção à fonte de carbono orgânico, através do alongamento e ramificação das hifas, permite a colonização de áreas extensas. Desta forma, o contato superficial com o contaminante é otimizado, aumentando a sua biodisponibilidade e, conseqüentemente, a sua biodegradação (DUPONT et al., 1997 apud MATHEUS, 2003).

### **2.3.1. As enzimas fúngicas envolvidas**

O cultivo em escala comercial de diversas espécies fúngicas é efetuado geralmente em substratos lignocelulósicos. É importante considerar que a utilização desses substratos requer a síntese de enzimas hidrolíticas e oxidativas que convertam componentes específicos, tal como a celulose, hemicelulose e lignina, em compostos assimiláveis, de baixo peso molecular (BUSWELL; CAI; CHANG, 1993; BUSWELL et al., 1996).

A lignina (um dos constituintes mais abundantes dos tecidos vegetais) é um polímero aromático estável, com estrutura polifenólica (ALEXANDER, 1980; CERRI; ANDREUX; EDUARDO, 1992), considerada uma substância recalcitrante, cuja degradação é difícil de ser alcançada. Este fato se deve à sua estrutura molecular complexa e por serem poucas as espécies de microorganismos que sintetizam as enzimas necessárias para a realização deste processo (LINDENFELSER et al., 1979 e ZADTRAZIL, 1979, apud KAKEZAWA, MINURA, TAKAHARA, 1990).

Alguns fungos denominados de “podridão branca” ou “white-rot”, como os dos gêneros *Lentinula* e *Pleurotus*, utilizados na produção de cogumelos, além de outros, como os do gênero *Agaricus*, são capazes de despolimerizar a lignina. Enquanto estes fungos sintetizam enzimas hidrolíticas para a degradação da celulose (como as glucanases,  $\beta$ -glucosidades) e da hemicelulose (como a xilanase), a degradação da lignina é realizada por enzimas oxidativas, as quais não atuam diretamente na quebra da molécula, devido a sua grande estabilidade e complexidade, mas na formação de radicais através da sua oxidação, os

quais irão desestabilizá-la gradativamente para posterior quebra. Entre as enzimas produzidas por estes fungos para a degradação da lignina estão a lignina peroxidase (Lip), a peroxidase dependente de manganês (MnP) ou manganês peroxidase e a lacase (BUSWELL; CAI; CHANG, 1993; BUSWELL et al., 1996; SILVA; MILAGRES, 2003). Em geral, estas enzimas oxidam compostos fenólicos e aminas aromáticas (FARHANGRAZI et al., 1994 apud HEINZKILL et al., 1998).

Diversos poluentes persistentes apresentam estrutura molecular semelhante à da lignina, sendo que enzimas lignolíticas produzidas por certos fungos podem degradar estes xenobióticos, em virtude de não serem específicas. Dentro deste contexto, vários trabalhos vêm evidenciando a degradação de poluentes por fungos ou por suas enzimas isoladas. Dentre eles, a degradação de compostos fenólicos (BURTON et al., 1998; TREJO-HERNANDEZ; LOPEZ-MUNGUIA; RAMIREZ, 2001) como fenóis clorados (GRABSKI; GRIMEK, BURGESS, 1998), pentaclorofenol (PCP) (SEMPLE; FERMOR, 1997; MATHEUS, 2002) e bifenilas policloradas – PCB (RUIZ-AGUILAR et al., 2002). Também podem degradar herbicidas organoclorados como o 2,4-D e o diuron (ESPOSITO et al., 1996; MELO, 2003), o herbicida atrazina (UETA et al., 1999), hexaclorobenzeno (HCB) (MELO, 2003), creosoto – fração da destilação do alcatrão, constituída de hidrocarbonetos, fenóis e outros compostos aromáticos (EGGEN; SVEUM, 1999).

### **2.3.2. O composto residual e a biorremediação**

A utilização do composto residual na biorremediação, especialmente de solos, apresenta diversas vantagens. Primeiramente, é uma fonte econômica de inóculo fúngico. Em segundo lugar, reduz a quantidade de resíduos produzidos pela indústria/produtores de cogumelos, contribuindo para a preservação do meio ambiente e a redução dos impactos ambientais resultantes do descarte inadequado e acúmulo desse material, assim como na recuperação de áreas contaminadas com xenobióticos recalcitrantes. E, por último, o

composto residual pode ser uma fonte de renda adicional para os produtores de cogumelos (OKEKE et al., 1993), estimulando seu sucesso no setor e a expansão da atividade.

Diversos trabalhos utilizando o CR na biorremediação de compostos tóxicos e recalcitrantes já foram realizados. Eggen (1999), por exemplo, verificou a degradação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (“PAH”) em solos contaminados com creosoto, utilizando o composto residual da produção de *Pleurotus ostreatus* e adicionando óleo de peixe como surfactante. Após 7 semanas de incubação, em temperatura ambiente, 86% do total de 16 PAHs foram degradados. Utilizando-se 5% do CR de *P. pulmonarius*, foi possível detectar a remoção degradativa completa de quatro diferentes PAHs no solo, em apenas 2 dias, sob condições laboratoriais. As amostras com PAHs, tratadas com o composto residual, tiveram suas toxicidades reduzidas ou removidas significativamente, sendo que estes resultados demonstraram um potencial para a utilização deste composto residual na biorremediação “ex situ” (LAU; TSANG; CHIU, 2003).

A degradação do pentaclorofenol, um xenobiótico utilizado como preservativo da madeira e persistente no ambiente, foi detectada em num experimento utilizando-se o composto residual da produção de *P. pulmonarius*. A adição de cerca de 5% do composto residual removeu 89% de 100 mg/L de pentaclorofenol em dois dias (LAW et al., 2003). Chiu et al. (1998) também analisaram a utilização do composto residual da produção de *P. pulmonarius* na remoção de pentaclorofenol em suspensão em um meio mínimo. O máximo da eficiência de remoção do composto foi em torno de 95% após 3 dias de incubação. Okeke et al. (1993), utilizando o composto residual da produção de *L. edodes* em serragem, verificaram uma degradação de pentaclorofenol em solos em torno de 60, 57 e 44%, após 21 dias de incubação (1:5 – composto:solo, p/p), variando de acordo com a estirpe do fungo.

Um dos mecanismos pelos quais ocorre a biorremediação de xenobióticos pelo CR inclui a bio-sorção do xenobiótico concomitante a sua degradação, pelo consórcio de

enzimas provenientes de diversos microorganismos. Isto ocorre porque o composto não apresenta apenas o fungo cultivado, como também outros microorganismos adquiridos durante o processo a produção.

Shojaosadati e Elyasi (1999) avaliaram a utilização do CR (não especificada a espécie fúngica) como biofiltro para H<sub>2</sub>S em lodo da indústria de couro. Em poucas horas, mais de 99% de eficiência na remoção de H<sub>2</sub>S foi alcançada no topo do biofiltro. Experimentos utilizando o composto residual da produção de *A. brunnescens* na purificação de substratos contaminados com pesticidas já foram realizados, incluindo a degradação de carbaril, 1-naftol (KUO; REGAN; 1992, 1999, apud RINKER, 2004), assim como de carbamato (KUO; REGAN, 1998; REGAN, 1994 apud RINKER, 2004).

Alguns estudos têm sido realizados visando a utilização do CR como fonte de enzimas, especialmente lignolíticas – as quais são interessantes no tratamento de efluentes industriais e de resíduos tóxicos. O CR apresenta um amplo espectro de enzimas extracelulares produzidas pelo fungo, durante o seu crescimento, utilizadas pelo mesmo para a degradação do substrato (BALL; JACKSON, 1995), assim como para a defesa contra predadores/competidores e como resposta às condições de estresse. Trejo-Hernandez, Lopes-Munguia e Ramirez (2001), por exemplo, utilizaram o composto residual de *A. brunnescens* como fonte bruta de lacase, através de extração aquosa, para a oxidação de compostos fenólicos, obtendo resultados interessantes (de até 90-100% de degradação em 24h para certos compostos). Ball e Jackson (1995) também realizaram um estudo com a utilização do composto residual de *A. brunneceus* para a extração e enzimas como endoxilanase, endoglucanase, lignina peroxidase, fenol oxidase (lacase), entre outras, objetivando encontrar uma fonte econômica das mesmas para diversas aplicações.

### 3. Agrotóxicos

O solo é utilizado para produzir mais de 90% da alimentação humana. Devido à presença de competidores das culturas, assim como de predadores e patógenos, a utilização de pesticidas tem se tornado comum no manejo de plantas, insetos e fungos economicamente importantes (MONTEIRO, 1997).

Os agrotóxicos fazem parte de um conjunto de tecnologias associadas ao processo de modernização da agricultura, ocorrido a partir da década de 60 – processo conhecido como “Revolução Verde”. O objetivo principal era aumentar a produtividade da agricultura para atender os desafios da demanda mundial crescente de alimentos. Com o uso generalizado dos agrotóxicos, em diferentes condições ambientais, diversos problemas começaram a ser diagnosticados, tais como a ocorrência de resíduos de pesticidas em alimentos, a contaminação de solos e águas, o efeito em organismos não-alvo, o surgimento de organismos resistentes, doenças iatrogênicas, ressurgência de pragas e a intoxicação de trabalhadores rurais (CAMPANHOLA; BETTIOL, 2002).

De acordo com o Decreto nº 4.074 da legislação brasileira, de 4 de janeiro de 2002, que regulamenta a Lei nº 7802/1989, os defensivos agrícolas, ou agrotóxicos, são produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou plantadas, e de outros ecossistemas e de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como as substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento (AQUINI; FERMINO, 2000; MANOLE, 2004).

O mercado mundial desses compostos foi avaliado em cerca de UD 30,56 bilhões, em 1996 (FAO, 1999 apud CAMPANHOLA; BETTIOL, 2002). Quanto ao Brasil, no início

da década de 90, o valor anual de agrotóxicos comercializados encontrava-se em torno de UD 959 milhões, atingindo em 1998 a cifra de UD 2,5 bilhões, o que representa um aumento de 163% no período (CAMPANHOLA; BETTIOL, 2002). A indústria de agrotóxicos disponibiliza hoje ao agricultor brasileiro aproximadamente 2011 produtos formulados com registro no Ministério da Agricultura, sendo cerca de 650 herbicidas, 550 inseticidas, 340 fungicidas, 260 acaricidas, 60 nematicidas, além de outros 140 produtos (LUCHINI; ANDRÉA, 2002).

No país, a evolução do consumo de agrotóxicos teve um aumento de 16 mil toneladas em 1964 para cerca de 60 mil toneladas em 1991, enquanto a área ocupada com lavouras agrícolas expandiu cerca de 28 para 50 milhões de hectares, no mesmo período. Isso significa um aumento de 276,2% no consumo de agrotóxicos para um aumento comparado de 76% em área cultivada, sendo o que o país representa o quarto maior mercado mundial de agrotóxicos.

O Brasil ocupa o oitavo lugar no ranking de consumo médio de ingrediente ativo de agrotóxicos por hectare (Tabela 8), o que pode ser considerado expressivo, pois a extensa área cultivada dilui a elevada quantidade de agrotóxicos utilizada (CAMPANHOLA; BETTIOL, 2002).

TABELA 8. Consumo médio de agrotóxicos (ingredientes ativos) por unidade de área para alguns países. Fonte: SINDAG, 2003.

<b>Países / quantidade aplicada (kg/ha)</b>			
1) Holanda / 17,5	3) Itália / 7,6	5) Alemanha / 4,4	7) Reino Unido / 4,4
2) Bélgica / 10,7	4) Grécia / 6	6) França / 4,4	8) Brasil / 3,6

Apesar do emprego desses produtos, as perdas atribuídas a pragas e doenças não sofreram reduções drásticas, enquanto que os ganhos com produtividade foram relativamente restritos. Por outro lado, problemas de contaminação de alimentos, do ambiente, e casos de intoxicação de agricultores aumentaram significativamente (CAMPANHOLA et al., 1998

apud CAMPANHOLA; BETTIOL, 2002). A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (“EPA”), constatou recentemente a presença de 46 diferentes pesticidas em águas subterrâneas de 26 estados americanos, sendo a maioria destes produtos herbicidas (MONTEIRO, 1997). Já a Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou, em 1990, que deveriam ocorrer no mundo, anualmente, cerca de 3 milhões de casos de intoxicação aguda, mais de 700 mil casos de efeitos adversos crônicos, como distúrbios neurológicos, cerca de 75 mil casos de câncer por exposição e 220 mortes (TRAPÉ, 2002).

Os agrotóxicos interferem não só na saúde humana como no comportamento de organismos benéficos da natureza, como é o caso das bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico para as plantas e dos fungos micorrízicos, que estimulam o desenvolvimento e conferem resistência à certas espécies vegetais (CHAMPANHOLA; BETTIOL, 2002).

No que se refere à aplicação dos agrotóxicos no campo, sabe-se que menos de 50% de um agrotóxico aplicado por avião atinge a área alvo, sendo o restante perdido no meio ambiente. A quantidade de agrotóxico que realmente atinge a praga ou o patógeno é inferior a 1% do total aplicado, o que significa que 99% ou mais vão para o ambiente (PIMENTEL, 1998 apud CHAMPANHOLA; BETTIOL, 2002).

O comportamento de agrotóxicos no ambiente é influenciado por diversos fatores, tais como: volatilidade, método de aplicação, tipo de formulação e hidrossolubilidade do composto; características do solo e das plantas; adsorção das moléculas às partículas do solo; persistência e mobilidade dos compostos e condições climáticas ambientais. Uma vez no ambiente, seus resíduos podem se tornar um risco para todo o agroecossistema, sendo que os processos físicos, químicos e biológicos empregados no tratamento desses resíduos nem sempre são eficientes.

A adsorção dos agrotóxicos no solo é um processo importante no comportamento desses compostos, pois está diretamente relacionada com a translocação, persistência,

mobilidade e bioatividade dos compostos nos solos e plantas ali presentes. A adsorção de agrotóxicos no solo tem importância principalmente por relacionar-se diretamente com os processos de disponibilidade para a atividade da substância, disponibilidade para o ataque microbiano e biodegradação, e, inversamente, com a possibilidade de lixiviação no solo e potencial de poluição de águas superficiais e subterrâneas. Além disso, sua ocorrência pode variar de forma expressiva em função das diferentes propriedades físicas e químicas dos solos, tais como: conteúdo orgânico, pH, quantidade e tipos de argilas, dentre outros (LUCHINI; ANDRÉA, 2002).

O conceito de persistência de agrotóxicos está associado à possibilidade de degradação destes compostos pela população microbiana. Esta degradação pode ocorrer diretamente, quando o agrotóxico funciona como substrato de crescimento e energia, servindo como fonte de nutrientes para a comunidade microbiana obter energia para a produção de biomassa. Por outro lado, o agrotóxico pode ser cometabolizado, isto é, sofrer degradação desde que se supra o meio com uma fonte de energia, porque os microrganismos transformam o composto, mas não obtêm energia no processo.

Sob o ponto de vista prático, a degradação pode ser conceituada como todo o tipo de alteração da substância ativa que modifica suas propriedades originais, através de processos bióticos e/ou abióticos. Os agrotóxicos podem ser degradados no solo por uma (ou várias) das vias seguintes: microbiana, química e fotoquímica. A degradação microbiana tem sido indicada como o principal fator de degradação de agrotóxicos no solo, sendo realizada principalmente por fungos e bactérias, que são os microrganismos mais abundantes neste ambiente (LUCHINI; ANDRÉA, 2002). A função dos microrganismos na transformação de pesticidas vem, há tempo, sendo demonstrada em trabalhos de laboratório, comparando-se as proporções de degradação entre solos colonizados e esterilizados.

A atividade microbiana é maior quando se adiciona ao solo matéria orgânica vegetal do que quando somente se adicionam nutrientes, como, por exemplo, glicose. A adição de material vegetal possibilita a degradação por cometabolismo. Em outras palavras, a energia derivada de outros nutrientes adicionados leva ao metabolismo de pesticidas, do qual pouca ou nenhuma energia é obtida (ANDERSON, 1984 apud MONTEIRO, 1997). A razão de se adicionarem restos vegetais como nutrientes foi baseada na hipótese de que o aumento da razão C/N do solo pela adição destas fontes (ricas em C) poderia estimular a atividade microbiana, sendo que a depleção de nitrogênio no solo induziria o ataque microbiano a fontes menos disponíveis de N, como alguns pesticidas (FELSOT; DZANTOR, 1990 apud MONTEIRO, 1997).

### 3.1. Atrazina

Atrazina ou 2-cloro-4-(etilamino)-6-(isopropilamino)-s-triazina é uma substância química, utilizada como princípio ativo em diversas formulações de herbicidas. Pertencente ao grupo químico das triazinas (RODRIGUES; ALMEIDA, 1995), apresenta a fórmula estrutural apresentada na Figura 1. A substância apresenta uma solubilidade entre 28 a 33 mg/L (ppm) a 20°C, peso molecular de 215,7, uma constante de dissociação ( $pK_a$ ) entre 1,60 e 1,70 (FANG; RADOSEVISH; FUHRMANN, 2001), densidade de 1,187g/cm<sup>3</sup> e pressão de vapor de  $3,0 \times 10^{-7}$  mm Hg a 20°C (RODRIGUES; ALMEIDA, 1995).

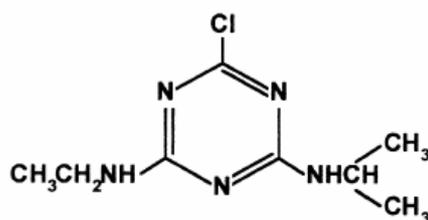


FIGURA 1. Fórmula estrutural de 2-cloro-4-(etilamino)-6-(isopropilamino)-s-triazina, conhecido como atrazina. Fonte: FANG; RADOSEVISH; FUHRMANN, 2001.

A atrazina é um dos herbicidas triazínicos mais empregados na agricultura, sendo utilizado há mais de 30 anos. Nos Estados Unidos, por exemplo, representa 12% (mais de 40 mil toneladas) de todos os pesticidas empregados nas culturas de milho, sorgo, cana e abacaxi. O Brasil – com as culturas de cana e milho na liderança – também emprega quantidades elevadas de herbicidas triazínicos (UETA et al., 1999). Os herbicidas formulados à base de atrazina, registrados no Brasil, são empregados em diversas culturas anuais e perenes para o controle de plantas daninhas latifoliadas e algumas gramíneas. Entre as culturas em que estes herbicidas são utilizados, destacam-se as culturas de milho, cana-de-açúcar, banana, café, citros, maçã, sorgo, dentre outras.

Como herbicida, a atrazina inibe a fotossíntese, por impedir a reação de Hill no Fotossistema II (fotólise da água) e por bloquear alguns processos enzimáticos. As plantas sensíveis emergem, tornando-se cloróticas e morrem. A seletividade fisiológica das espécies tolerantes lhes é conferida por possuírem enzimas com capacidade de metabolizarem o produto. Já a adsorção na planta é essencialmente radicular e moderadamente foliar. O intervalo de segurança em todas as culturas é de 45 dias entre a última aplicação e a colheita dos produtos comestíveis. Já as dosagens de aplicação deste produto nas lavouras variam de acordo com a espécie vegetal, o tipo de formulação do produto, a textura do solo e a época de aplicação (RODRIGUES; ALMEIDA, 1995).

Considerando-se que 1ha representa duas mil toneladas de solo arável (BARTZ, 1994) e que a concentração de aplicação do princípio ativo (atrazina) varia de 2 a 4 kg/ha (RODRIGUES; ALMEIDA, 1995), a concentração máxima a ser encontrada no solo, após uma aplicação, é de aproximadamente 1-2 ppm

Em geral, as formulações à base de atrazina - de 500 g/L e 800 g/L, pertencem em termos toxicológicos à classe III (faixa azul), sendo consideradas medianamente tóxicas (ANVISA, 2004; RODRIGUES; ALMEIDA, 1995). Contudo, dentro da classificação

ambiental, a maioria das formulações pertence à classe II – produto muito perigoso ao meio ambiente (ANVISA, 2004). Em animais expostos à atrazina já se observaram danos ao fígado, rins e coração. Também se tem demonstrado, em animais, que a atrazina provoca alterações hormonais que afetam a ovulação e a capacidade de reprodução. De acordo com a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA), foi estabelecido um limite de no máximo 3 µg de atrazina/L de água potável.

A atrazina pode ser adsorvida pelos colóides da argila e matéria orgânica. O processo é reversível, dependendo da umidade, temperatura e pH do solo, não sendo muito lixiviável. A persistência média de atrazina no solo, de acordo com as doses recomendadas, varia de 5 a 7 meses nas condições climáticas tropicais e subtropicais. Quando utilizada em doses elevadas, como esterilizante do solo, a persistência ultrapassa 12 meses. A atrazina apresenta baixa volatilidade e sensibilidade à fotodecomposição (RODRIGUES; ALMEIDA, 1995).

Existem numerosos trabalhos sobre a biodegradação de atrazina e suas vias, além de outros processos relacionados. Este fato resulta de que o herbicida vem sendo empregado há mais de 30 anos, além de ser, provavelmente, o mais utilizado na maioria dos países (GHOSH; PHILIP, 2004).

A degradação da molécula de atrazina no solo é essencialmente microbiana, mas também ocorrem mecanismos químicos e físicos, com metabolização idêntica àquela que ocorre nas plantas. Primeiramente a atrazina é metabolizada a hidroxiatrazina e aminoácidos; ocorre a ruptura do anel heterocíclico da hidroxiatrazina, dealquilação da cadeia lateral e hidrólise do grupo amino (RODRIGUES; ALMEIDA, 1995). Alguns microorganismos têm demonstrado capacidade de biodegradar parcialmente ou totalmente a molécula, levando à formação de NH<sub>3</sub> e CO<sub>2</sub> (Figura 2) (UETA et al., 1999).

A mineralização completa da atrazina por um único microorganismo não é comum, enquanto que consórcios de duas ou mais espécies são mais eficientes no processo (RASODEVICH et al., 1995). A degradação parcial da molécula por fungos, tais como *Aspergillus fumigatus* e *Rhizopus stolonifer* já foi relatada, embora a maioria das ações microbianas relatadas inclua bactérias do gênero *Rhodococcus*, *Nocardia*, *Bacillus* e, principalmente, *Pseudomonas* (UETA et al., 1999). Contudo, a degradação de atrazina já foi obtida utilizando-se fungos lignocelulotíticos de cultivo de cogumelos, tal como *P. pulmonarius*. Apenas 32% do total de radioatividade, aderida na forma de atrazina marcada ( $^{14}\text{C}$  do anel aromático) a um substrato sólido à base de palha de trigo e de algodão foram recuperados 2 semanas após a colonização do substrato pelo fungo. Já para o substrato não colonizado, foram recuperados 70% da radioatividade, evidenciando-se que o tratamento com o fungo foi mais eficiente na degradação do composto (MASAPHY; LEVANON; HENIS, 1996).

Da degradação de atrazina realizada por *P. pulmonarius* em cultura líquida, houve a produção especialmente de metabólitos dealquilados, como deetilatrizona, deisopropilatrizona, deetil-deisopropilatrizona, além de hidroxipropilatrizona (MASAPHY; LEVANON; HENIS, 1993). Já a degradação por *Phanerochaete chrysosporium*, fungo de podridão branca, conhecido por sua capacidade de degradação de xenobióticos, reduziu a concentração de atrazina em 48% em 4 dias, em um meio de cultivo, produzindo especialmente hidroxiatrizona, deetilatrizona, deetilhidroxiatrizona e deisopropilatrizona (MOUGIN et al., 1994).



## MATERIAIS E MÉTODOS

### 1. Avaliação da utilização do composto residual da produção de cogumelos *Agaricus brasiliensis* e de *Lentinula edodes* no desenvolvimento de alface (*Lactuca sativa*)

#### 1.1. Materiais

##### 1.1.1. Compostos residuais (CRs)

Dois tipos de CR de *A. brasiliensis* foram adquiridos de produtores de Santa Catarina: o primeiro proveniente de um cultivo com camada de cobertura à base de turfa e o segundo de um cultivo com camada à base de solo. O CR de *L. edodes* foi coletado em uma propriedade com cultivo axênico na Grande Florianópolis (SC). Todos os compostos foram coletados imediatamente após o término da produção de cogumelos.

##### 1.1.1.1. CR de *A. brasiliensis* com camada à base de turfa

O CR foi proveniente de um cultivo misto, tanto em camas como em sacos de 10kg, o qual incluiu o composto colonizado misturado com a camada de cobertura, constituída por uma mistura de turfa preta, denominada comercialmente de “Turfa COG”, da empresa Turfa Fértil, de Santa Catarina. Este CR foi coletado de uma propriedade no município de Biguaçu (SC) – Figura 3A.

O composto inicial, utilizado na produção de cogumelos foi formulado especialmente com palhas (trigo, arroz e/ou milho), suplementado com uréia ou outra fonte nitrogenada, além de corretivos. Foi submetido à compostagem para estabilização do material, seguida por pasteurização antes da inoculação do fungo.

O CR passou por um período de maturação de cerca de seis meses (armazenado em sacos, em temperatura ambiente) entre o final da produção de cogumelos e sua utilização no experimento, armazenado em sacos (Figura 3B) em temperatura ambiente.



FIGURA 3. Fase de frutificação da produção de *A. brasiliensis* em composto com camada de cobertura à base de turfa (A) e o composto residual da produção misturado com a camada de cobertura (B,b).

#### 1.1.1.2. CR de *A. brasiliensis* com camada à base de solo

O CR foi produzido em uma propriedade localizada no município de Tijucas (SC), sendo fornecido pelo produtor já misturado à camada de cobertura, composta por solo (argiloso). Este composto foi submetido a um período de maturação (dentro de sacos, em temperatura ambiente) de 30 dias do final da produção de cogumelos até sua utilização no experimento.

A formulação do composto e seu processamento até o início do cultivo de cogumelos foram idênticos aos do composto apresentado no item 1.1.1.1.

#### 1.1.1.3. CR de *Lentinula edodes*

O CR de *L. edodes* foi coletado de um produtor de shiitake do município de Três Riachos (SC), ainda na forma de blocos – forma como se encontrava no cultivo (Figura 4). Estes blocos pesavam originalmente 2,5 kg (substrato colonizado) e foram adquiridos pelo produtor de uma empresa comercial no município de Poá (SP). Sua formulação para o cultivo

continha serragem suplementada com farelos e corretivos. O período de maturação do CR antes da utilização nos experimentos foi de cerca de 30 dias.



FIGURA 4. Fase inicial da frutificação de *L. edodes* em cultivo axênico (A) e aspecto do composto residual (B) logo após o cultivo.

### 1.1.2. Solo utilizado no cultivo de alface

O solo utilizado foi coletado no município de Santo Amaro da Imperatriz (SC), próximo a uma área de cultivo de milho. O município é um dos principais integrantes do cinturão verde da região de Florianópolis.

Este solo foi classificado como Neossolo Flúvico (Solo Aluvial pela classificação antiga), com influência da proximidade de um riacho, apresentando textura arenosa (78%).

### 1.1.3 Características físico-químicas dos CRs e do solo

Algumas características físico-químicas dos compostos residuais utilizados nos experimentos são apresentadas na Tabela 9.

TABELA 9. Características físicas e químicas do composto residual da produção de *A. brasiliensis* com camada de cobertura de turfa e de solo, e do composto residual de *L. edodes*.

Parâmetro	Composto residual (CR)					
	Cultivo de <i>A. brasiliensis</i> com camada à base de turfa		Cultivo de <i>A. brasiliensis</i> com camada à base de solo		Cultivo de <i>L. edodes</i>	
	Matéria úmida	Matéria seca	Matéria úmida	Matéria seca	Matéria úmida	Matéria seca
pH em CaCl <sub>2</sub>	7,4	-	8,1	-	4,2	-
Densidade (g/cm <sup>3</sup> )	0,70	-	0,84	-	0,20	-
Umidade total	48,92	0,00	48,92	0,00	18,63	0,00
Matéria orgânica total (%)	26,52	51,92	10,82	15,17	74,04	90,99
M.O. compostável (%)	25,77	50,45	7,77	10,89	73,84	90,75
Carbono total (%)	14,73	28,84	6,01	8,42	41,13	50,55
Carbono orgânico (%)	14,32	28,03	4,32	6,06	41,02	50,41
Resíduo mineral total (%)	24,56	48,08	60,52	84,83	7,33	9,01
Resíduo mineral solúvel (%)	17,59	34,44	9,61	13,47	5,71	7,02
Nitrogênio total (%)	0,93	1,82	0,50	0,70	0,48	0,59
Fósforo (P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> ) total (%)	0,92	1,80	0,75	1,05	0,47	0,58
Potássio (K <sub>2</sub> O) total (%)	0,69	1,35	0,65	0,91	0,14	0,17
Cálcio (Ca) total (%)	5,61	10,98	1,09	1,53	2,09	2,57
Magnésio (Mg) total (%)	0,37	0,72	0,18	0,25	0,20	0,25
Enxofre (S) total (%)	0,90	1,76	0,53	0,74	0,08	0,10
Relação C/N (C total e N total)	16/1	16/1	12/1	12/1	86/1	86/1
Relação C/N (C orgânico e N total)	15/1	15/1	9/1	9/1	86/1	86/1

Análises realizadas pela Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP): Av. Pádua Dias, 11, CP.09, Piracicaba, SP, Cep 13418-900; home-page: <http://www.esalq.usp.br>. Análise detalhada no ANEXO 1.

Algumas características físico-químicas do solo utilizado no cultivo de alface são apresentadas na Tabela 10.

TABELA 10. Características físicas e químicas do solo.

<b>Parâmetro</b>	<b>Solo</b>
Textura (1)	Classe 4 (16% argila)
Textura (2)*	Areia grossa 42 %
	Areia fina 36 %
	Areia total 78%
	Silte total 8%
	Argila total 14 %
pH	5,2 (baixo)
Índice SMP	6,0
Fósforo	14,5 ppm (médio)
Potássio	35 ppm (muito baixo)
Matéria orgânica	1,8 % (baixo)
Cálcio	1,9 (baixo) cmolc/L
Magnésio	0,6 (médio) cmolc/L
Sódio – Na	4 ppm
Cap. troca cátions CTC	6,17 cmolc/L (média)
Saturação de bases - V	42,25 % (baixa)

\* Análise realizada pela Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP): Av. Pádua Dias, 11, CP.09, Piracicaba, SP, Cep 13418-900; home-page: <http://www.esalq.usp.br>. Demais análises: Laboratório da Companhia Integrada de Desenvolvimento Agrícola de SC (CIDASC): Rod. Admar Gonzaga, 1588, CP.256, Florianópolis, SC, Cep 88034-001; home-page: <http://www.cidasc.sc.gov.br>  
Análise detalhada no ANEXO 2, com parâmetros de granulometria e referências de interpretação.

## **1.2. Caracterização dos materiais (CRs e solo)**

### **1.2.1. Capacidade de campo**

A determinação da capacidade de campo dos compostos residuais e do solo foi realizada de acordo com a técnica para determinação em campo de Bernardo (1989). Para tal, 200mL do CR e do solo foram colocados em tubetes de 250mL, em triplicata para cada material (CRs e solo). Os materiais foram umidificados até o ponto de saturação e, após 24h, alíquotas de 50g de cada amostra foram colocados para secar em estufa, a 65°C, durante 72 h. A quantidade de água necessária para se atingir a capacidade de campo foi obtida calculando a percentagem de água retida em cada material, após o intervalo de 24h, sob condições climáticas ambientais.

### 1.2.2. Análise do pH

A avaliação do pH de cada composto residual foi realizada de acordo com Tedesco et al. (1995). Três amostras de 10g do composto foram misturadas durante 30 minutos, cada uma, com 50mL de água destilada. Utilizando-se o sobrenadante foi avaliado o pH, utilizando-se pHmetro. O pH do solo também foi determinado de acordo com Tedesco et al. (1995), sendo realizado o mesmo procedimento descrito para o CR, excetuando-se o fato de se ter utilizado o extrato de 10g de solo em 10mL de água destilada para as análises.

### 1.3. Processamento dos materiais

O solo coletado foi peneirado (poro: 0,5cm) para homogeneização e retirada de fragmentos maiores de matéria orgânica. O pH do mesmo foi corrigido com calcita (91,78%  $\text{CaCO}_3$  – Brasilminas) para valor em torno de 6,0 – 6,8, visto ser este o pH ideal para o desenvolvimento de *Lactuca sativa* (FIGUEIRA, 1982). Para tanto, foi realizada uma curva de calagem preliminar, reagindo durante 10 dias 50mL de cada material (umidade de 70-80%) com doses de 0 a 0,5g de calcita. Os valores de pH dos CRs também foram ajustados para o mesmo valor, quando originalmente inferiores a 6,0, sendo corrigidos com base nas respectivas curvas de calagem.

A correção do pH do solo foi realizada aproximadamente 25 dias antes de sua mistura com os CRs. Já a correção do pH dos CRs foi realizada 15 dias antes da mistura. Após misturar o solo com diferentes proporções de CR, conforme cada tratamento, a mistura permaneceu em repouso durante 40 dias, para maior estabilização do material, ocorrendo subsequente o plantio das mudas de alface.

A adubação química com NPK do solo dos tratamentos pertinentes incluiu uréia (44% N), superfosfato triplo (37%  $\text{P}_2\text{O}_5$ ) e sulfato de potássio (48%  $\text{K}_2\text{O}$ ).

Na Tabela 11 é apresentada a composição química do solo selecionado para o experimento, a recomendação para adubação química da alface (BARTZ, 1994) considerando a concentração química elementar, e ainda a recomendação do adubo químico utilizado. Nos cálculos, considerou-se que a camada arável de 1 hectare corresponde a 2 mil toneladas de solo (FONTES, 1999).

A adubação química dos tratamentos pertinentes foi realizada 10 dias antes do plantio das mudas de alface (KATAYAMA, 1993).

TABELA 11. Composição do solo, recomendações para adubação de alface (BARTZ, 1994) e quantidade de adubo químico utilizado.

<b>Parâmetros do solo selecionado</b>	<b>Composição do solo (% peso seco)</b>	<b>Recomendação elementar<sup>1</sup></b>	<b>Recomendação de fertilizante químico</b>
Matéria orgânica	1,8 % (baixo)	0,05g N/kg solo	0,114g uréia / kg solo
Fósforo	14,5 ppm (médio)	0,035g P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> /kg solo	0,095g de superfosfato triplo / kg solo
Potássio	35 ppm (muito baixo)	0,10g K <sub>2</sub> O/kg solo	0,210g de sulfato de potássio / kg solo

<sup>1</sup>Com base na composição do solo.

#### **1.4. *Lactuca sativa* e produção das mudas**

O cultivar de *Lactuca sativa* L. utilizado nas experimentações foi a “Babá de Verão” (sementes ISLA PAK - sem defensivos agrícolas), de folhas lisas. Este cultivar foi selecionado com base nas temperaturas durante o período experimental, pela tolerância a temperaturas típicas de verão e pelo plantio ser recomendado durante todo o ano.

Para a obtenção das mudas, a alface foi semeada em bandejas, em um substrato formulado com 27% do solo selecionado e 73% de solo comercial adubado (“Solo Fértil”), em volume. O plantio foi realizado no início de novembro, durante a primavera.

Foram realizadas regas diárias das mudas (Figura 5) até a instalação do experimento, quando as plântulas já apresentavam 30 dias.



FIGURA 5. Mudanças de alface (*L. sativa*) com aproximadamente 20 dias de desenvolvimento, cultivar Babá-de-Verão.

### 1.5. Tratamentos e montagem do experimento

As proporções do CR em relação ao solo, nos diversos tratamentos pertinentes, foram estabelecidas em porcentagem, considerando-se o peso seco de ambos os materiais. Para tal, calculou-se a umidade de cada material, secando-se em estufa a 65°C amostras de 100g de cada material, durante três dias, em triplicata. Subseqüentemente foi efetuada a relação entre matéria seca e matéria úmida sendo, assim, possível a utilização dos materiais sem a secagem prévia, prevenindo-se desta forma possíveis alterações físicas decorrentes do processo.

Foram definidos quatorze tratamentos que representaram os diferentes tipos de substratos nos quais foi avaliado o desenvolvimento das mudas de *L. sativa*. Estes tratamentos foram:

- Solo sem adubação (controle);
- Solo com adubação química NPK;
- Solo com 5, 10, 25 e 40% de CR da produção de *A. brasiliensis* com camada de cobertura à base de turfa;
- Solo com 5, 10, 25 e 40% de CR da produção de *A. brasiliensis* com camada de cobertura à base de solo;

- Solo com 5, 10 e 25% de CR da produção de *L. edodes* em sistema axênico;
- Solo com adubação química NPK com a adição de 10% do CR da produção de *A. brasiliensis* com camada de cobertura à base de turfa, visando a análise do poder potencializador do CR na adubação NPK.

Os substratos foram colocados em vasos plásticos com capacidade de 1 litro, 700g de substrato seco em cada vaso, sendo que alíquotas de 50g de cada substrato foram secas previamente a 65°C durante três dias, em triplicada, para determinação da umidade. A umidade de cada substrato (tratamento) no experimento foi a da capacidade de campo, calculada com base na capacidade de campo de cada componente (solo e CR).

Após serem colocados os substratos nos vasos, as mudas de alface foram transplantadas, uma por vaso, no início de dezembro. Foram realizadas 6 repetições (vasos) para cada tratamento. Os vasos foram mantidos em casa de vegetação durante o desenvolvimento das mudas (Figura 6).

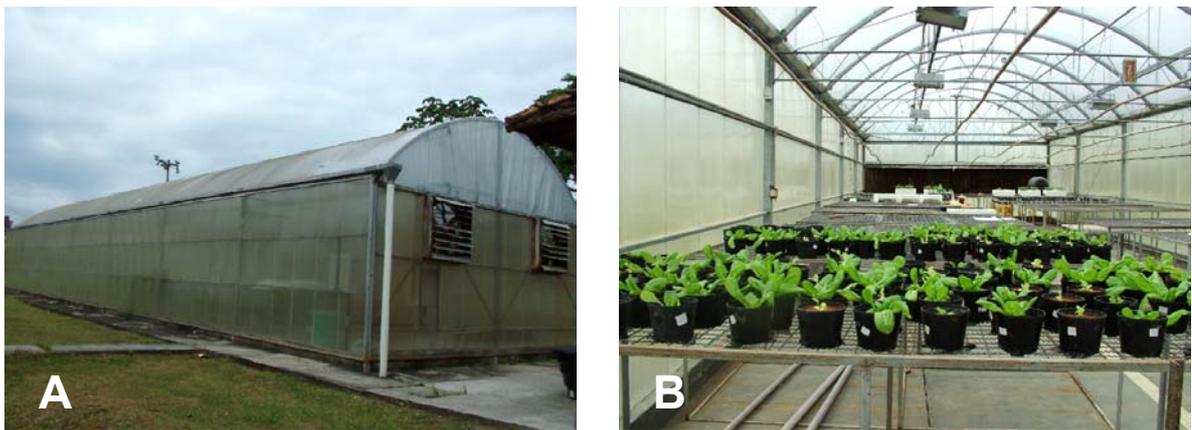


FIGURA 6. A) Casa de vegetação no interior da qual foi instalado o experimento de avaliação do desenvolvimento de alface em substratos à base de solo e CR do cultivo de *A. brasiliensis* e *L. edodes*. B) Aspecto das mudas de alface em diferentes substratos ao final de 50 dias de cultivo, desde a sementeira.

### **1.6. Manejo e acompanhamento**

Durante o experimento foram realizadas regas diárias até a máxima retenção de água de cada substrato. Para tal, colocou-se uma folha plástica na parte inferior externa de cada vaso. Quando iniciava a escorrimento da água da sobre a folha, após uma rega gradual – com um fluxo reduzido de água –, a rega era cessada. Foi ainda realizada a troca aleatória da posição dos vasos em duas datas, após 15 e 25 dias de cultivo em casa de vegetação, com o intuito de reduzir a interferência de condições ambientais localizadas, como o efeito bordadura.

Os vasos foram mantidos na casa de vegetação durante 40 dias, totalizando-se 70 dias de cultivo – tempo adequado para que a alface atinja seu desenvolvimento máximo (FIGUEIRA, 1982). As avaliações dos parâmetros referentes ao desenvolvimento vegetal foram obtidas após a retirada das mudas com 70 dias de crescimento.

O pH dos substratos foi avaliado antes e após o cultivo, conforme metodologia descrita no item 1.2.2.

### **1.7. Avaliação do desenvolvimento de *Lactuca sativa***

Os parâmetros de desenvolvimento avaliados dos espécimes de *L. sativa* foram:

- Matéria seca total das plantas, de acordo com o tratamento;
- Matéria seca da parte aérea e das raízes;
- Número de folhas por planta;
- Área foliar total e área foliar média por folha;
- Concentração de clorofila nas folhas;
- Teor de proteínas solúveis da parte aérea.

### **1.7.1. Avaliação da área foliar e do peso seco**

Foram retiradas todas as folhas de quatro plantas (repetições) de *L. sativa* de cada tratamento, sendo o perímetro de cada folha transferido para folha de papel, visando a avaliação da área foliar média de cada planta. Para tal, utilizou-se um planímetro digital (Digiplan – HAPP), do Laboratório de Cartografia Digital do CFH / UFSC.

Após a determinação dos perímetros foliares, tanto a porção aérea como radicular foram secas em estufa a 55°C, durante 3 a 4 dias. Subseqüentemente foi mensurado o peso seco total médio de cada planta em cada tratamento, o peso seco da parte aérea (parâmetro importante em nível comercial) e o peso seco radicular, utilizando-se 6 repetições para cada tratamento para estas avaliações.

### **1.7.2. Avaliação da concentração de clorofila**

A dosagem da clorofila foi realizada selecionando-se folhas íntegras e com coloração verde intenso dentre as cinco folhas externas de cada planta. Retângulos, com área previamente determinada, foram retirados da região central de cada folha fresca, coletada ao final do experimento. A região amostrada encontrava-se equidistante da nervura central e da borda externa da folha, como mostra a Figura 7, obtendo-se 50mg de tecido vegetal.

Os 50mg de tecido vegetal foram macerados em 4mL de solução de acetona (80%, v/v) e colocados em tubos graduados, sendo acrescentada a quantidade de solução evaporada durante o processo de maceração. A suspensão foi, então, centrifugada durante 10 minutos (4500 rpm) e o sobrenadante utilizado para mensurar o teor de clorofila (HISCOX; ISRAELSTAM, 1979; FERMINO JÚNIOR, 2004).

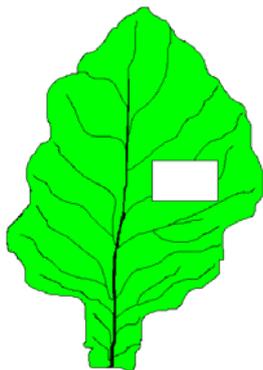


FIGURA 7. Região foliar utilizada para extração e avaliação do teor de clorofila.

O teor de clorofila foi mensurado de acordo com Arnon (1949), determinando-se, com espectrofotômetro (JENWAY 6100), a absorvância do extrato de acetona da folha de cada espécime, a 663nm para a clorofila “a” e a 645nm para a clorofila “b”. O cálculo para a obtenção do teor das clorofilas pelo peso fresco foliar (mg/mg) foi realizado utilizando-se as seguintes fórmulas:

$$\text{Clorofila a} = \{[12,7 \times (A663)] - [2,69 \times (A645)]\} \times \text{Vol(mL)} / [\text{peso(mg)} \times 1000]$$

$$\text{Clorofila b} = \{[22,9 \times (A645)] - [4,64 \times (A663)]\} \times \text{Vol(mL)} / [\text{peso(mg)} \times 1000]$$

$$\text{Clorofila total} = \text{Clorofila a} + \text{Clorofila b}$$

Onde: A=absorvância

Foram realizadas três repetições, que consistiam na avaliação da clorofila presente em folhas de três plantas de cada tratamento. Os procedimentos de dosagem foram realizados dentro do menor tempo possível (5 a 10 minutos), visando diminuir perdas de clorofila por oxidação no processo.

### 1.7.3. Teor de proteínas solúveis

A dosagem de proteínas solúveis foi realizada para a parte aérea da planta, utilizando-se folhas previamente secas em estufa a 55°C, durante 3 dias. As folhas secas de cada planta foram trituradas/pulverizadas, sendo posteriormente retirada uma alíquota de

50mg desse material. Esta alíquota foi macerada com 5mL de tampão fosfato pH 6,5 (0,1M) e, em seguida, centrifugada durante 12 minutos (4500rpm).

Para análise do teor de proteínas solúveis, extraídas após maceração, utilizou-se o método colorimétrico descrito por Bradford (1976). Para tal, foi realizada uma curva padrão, utilizando-se albumina bovina dissolvida no mesmo tampão fosfato da extração (pH 6,5 – 0,1M). A mistura, que consistia em 50 $\mu$ L do extrato foliar e 2,5mL de solução de Comassie Blue, foi agitada e, após 5 minutos, lida a uma absorbância a 595nm, em espectrofotômetro.

Foram realizadas três repetições para cada tratamento, ou seja, três extratos, cada um proveniente de uma planta (repetição), sendo as análises realizadas em duplicata.

### **1.8. Delineamento experimental e análises estatísticas**

Os vasos foram dispostos na casa de vegetação utilizando-se um delineamento completamente casualizado, sendo realizadas duas trocas aleatórias de posição dos mesmos durante o experimento, como já mencionado (item 1.6.).

As comparações entre os tratamentos, para todos os parâmetros, foram realizadas por análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Newman's Keuls, com  $p < 0,05$ . Foram utilizadas 6 repetições (plantas) para as análises de peso seco total, aéreo e radicular e do número de folhas; 4 repetições para avaliação da área foliar e 3 repetições, tanto para a avaliação do teor de clorofila como de proteínas solúveis.

Para o peso seco aéreo das plantas em função da concentração de CR foi também realizada análise de regressão, a fim de analisar o padrão de resposta frente à fertilização com o CR.

## **2. Caracterização dos compostos residuais da produção de cogumelos para fins de biorremediação de solos**

### **2.1. Compostos residuais (CRs)**

Foram coletados os CRs da produção de três espécies fúngicas: *Agaricus brasiliensis*, *Lentinula edodes* e *Pleurotus ostreatus*. Estes compostos foram mantidos durante todas as análises dentro de sacos plásticos abertos, em caixas de isopor. As avaliações foram imediatamente iniciadas após a coleta dos compostos.

#### **2.1.1. CR de *Agaricus brasiliensis***

O composto residual de *A. brasiliensis* foi coletado em uma propriedade localizada Florianópolis (SC). O composto foi adquirido no final de junho de 2005, após o final do ciclo produtivo. Este composto foi produzido com palhas e sabugo de milho, além de suplementos e corretivos típicos de substratos para *Agaricus*, sendo também compostado antes do cultivo do fungo. Durante o cultivo utilizou-se camada de cobertura à base de turfa de Santa Catarina, “Turfa Cog D”, da empresa Florestal AS, de Arroio do Silva (SC). O composto foi inoculado aproximadamente três meses antes da data de coleta do composto residual e a camada de cobertura colocada aproximadamente 20 dias após a inoculação. No composto foram obtidos dois fluxos de produção de cogumelos, sendo o terceiro inibido pelas condições climáticas (baixas temperaturas).

Foram coletadas três amostras, cada uma obtida de uma cama de produção distinta, tal como se apresenta na Figura 8. As amostras foram homogeneizadas para as análises, misturando-se também o composto com o material componente da camada de cobertura – Figura 9.



FIGURA 8. Composto residual da produção de cogumelos de *Agaricus brasiliensis*. A) c – “cama” onde o composto foi disposto para a produção de cogumelos e onde foram coletadas as amostras para análise; B) a – exemplo de amostra coletada, t – camada de cobertura à base de turfa (escuro), cr – composto residual colonizado pelo fungo (esbranquiçado, abaixo da camada de cobertura).

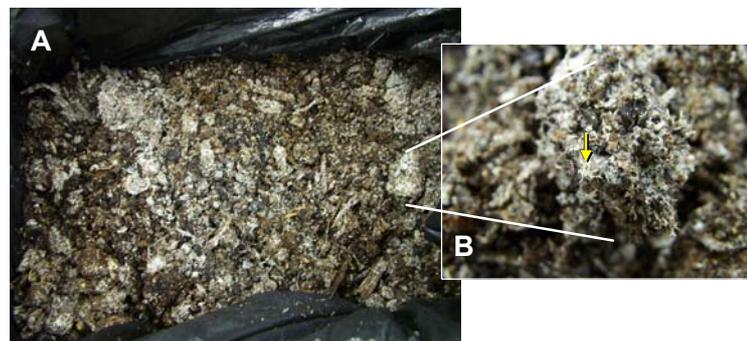


FIGURA 9. Composto residual da produção de cogumelos de *Agaricus brasiliensis* após homogeneização do composto com a camada de cobertura. A) Aspecto geral; B) Ampliação de A – seta mostrando micélio ainda viável.

### 2.1.2. CR de *Lentinula edodes*

O CR da produção de *Lentinula edodes* em sistema axênico foi obtido de um produtor do município de Três Riachos (SC). O substrato era constituído por serragem de eucalipto suplementada com farelo de trigo (10-20%), além de corretivos como calcário e gesso. O substrato foi inoculado aproximadamente quatro meses antes do término da produção. O final do último fluxo de produção – de um total de três – ocorreu em meados de julho, sendo o composto residual coletado 15 dias após o término da produção.

Foram selecionados 3 blocos distintos para a realização das análises, sendo mantidos íntegros até o início das experimentações (Figura 10).

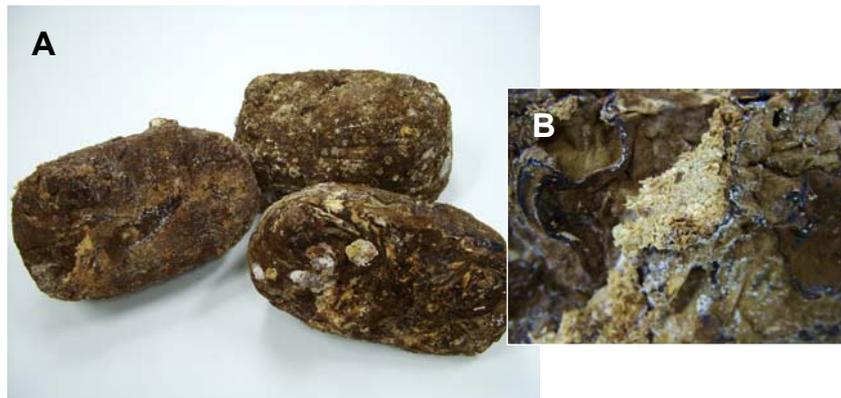


FIGURA 10. Composto residual da produção de cogumelos de *Lentinula edodes* em sistema axênico, utilizado nos experimentos (A); detalhe do composto (B).

### 2.1.3. CR de *Pleurotus ostreatus*

O CR da produção de cogumelos de *P. ostreatus* foi coletado de um produtor do município de Santo Amaro da Imperatriz (Grande Florianópolis – SC), sendo constituído por palha de arroz sem suplementação, tal como mostra a Figura 11. O composto foi previamente pasteurizado antes do cultivo do fungo, o qual foi realizado dentro de sacos de polipropileno com 3-4 kg de substrato. A colheita ocorreu durante dois meses, com uma média de 500-700g de cogumelos em cada saco de cultivo.

O CR foi coletado no final da produção, ou seja, dois meses após a inoculação, no início de julho de 2005.



FIGURA 11. Composto residual à base de palhas da produção de cogumelos de *Pleurotus ostreatus* utilizado nas experimentações em A e ampliação em B.

## 2.2. Solos

Foram coletados dois tipos de solos: um de uma área de cultivo de mandioca (*Manihot* sp.) e outro de uma área com predomínio de gramíneas e algumas espécies invasoras (Figura 12). Foram coletadas três amostras de cada solo em áreas de aproximadamente 20cm<sup>2</sup>, da superfície até 20cm de profundidade, em regiões distintas de cada terreno. Estas três amostras foram utilizadas nas análises.

Os solos foram analisados com o intuito de se verificar como a incorporação de CR poderia modificar suas características, promovendo a biorremediação de xenobióticos.



FIGURA 12. Locais onde foram coletados os solos utilizados; A) área de cultivo de mandioca; B) área com predomínio de gramíneas e espécies vegetais invasoras; a,b) regiões de coleta.

## 2.3. Umidade

A umidade dos materiais (solo e CRs) foi avaliada 24 horas após a coleta. Três amostras de 50g de cada um dos materiais foram secadas em estufa a 65°C, durante três dias, calculando-se a partir da matéria seca a percentagem de umidade.

## 2.4. Avaliação do pH

A avaliação do pH de cada composto residual e do solo foi realizada de acordo com Tedesco et al. (1995), em triplicata, como já mencionado (item 1.2.2).

## **2.5. Avaliação da condutividade elétrica (CE)**

A avaliação da condutividade elétrica – parâmetro de quantificação da salinidade – foi realizada de acordo com Tedesco et al. (1995) para solos, e de acordo com Guerrini e Trigueiro (2004) para os CRs, com modificações – maior tempo de homogeneização em água destilada. Esta avaliação teve como intuito complementar e explicar parte dos resultados do experimento de fertilização de alface, visando utilização do CR na biorremediação de solos adicionalmente à fertilização.

A condutividade de todos os materiais foi avaliada em triplicata, utilizando-se extratos aquosos na proporção de 1:5 (material:água destilada). Foram realizadas medidas de CE dos materiais úmidos e também dos materiais secos/triturados, para se detectar potenciais alterações em razão da umidade.

Para tal foram colocados 25mL de cada material em erlenmeyers com 250mL de volume, dentro dos quais se adicionaram 125mL de água destilada, seguindo-se de agitação a 70rpm em mesa agitadora (Nova Técnica; NT-145) durante 1 hora para os solos, 4 horas para os CRs úmidos e 5 horas para os CRs secos. Após a agitação, centrifugou-se cada extrato durante 15min, a 2000rpm. Avaliou-se então a CE do sobrenadante, utilizando-se um condutivímetro (Instrutherm, CD-860), a qual foi expressa em miliSiemens por centímetro (mS/cm).

## **2.6. Liberação de gás carbônico (CO<sub>2</sub>)**

A taxa diária de liberação de gás carbônico (CO<sub>2</sub>) foi avaliada durante 10 dias para os três CRs e dos dois solos, de acordo com a técnica de Stotzky (1965). Esta avaliação teve como objetivo evidenciar o possível incremento da atividade microbiana do solo pela adição de CR.

Para cada composto residual, foram pesadas três alíquotas de 50g, sendo que cada uma foi colocada dentro de frascos de vidro de (600mL) com tampa. Para o solo foi utilizado o mesmo procedimento, excetuando-se o peso de cada unidade amostral, que foi de 100g. Dentro de cada frasco foi colocado um béquer de 50mL com 20mL de uma solução de NaOH 0,5N. Foram feitas provas em branco (PB) em triplicata, que consistiram em frascos desprovidos de material no seu interior, incluindo apenas o béquer com a solução – Figura 13A.

Os frascos foram hermeticamente fechados e mantidos em estufa a 25°C. Após 24h, cada béquer foi retirado do frasco, sendo adicionados 2mL de uma solução de cloreto de bário (50%) e 3 gotas de solução alcoólica de fenolftaleína (3%). A solução de NaOH foi então titulada com HCl, com idêntica normalidade (0,5N) – Figura 13B. O CR ou o solo foi então revolvido para aplicação de novo tratamento – até o total de 10 dias.

De acordo com Stotzky (1965), o CO<sub>2</sub> liberado foi calculado utilizando-se a seguinte fórmula:

$$\text{mgC (CO}_2\text{)} = (\text{B}-\text{V}).\text{N.E}$$

V= volume de ácido utilizado na titulação da base (NaOH) do tratamento;

B = volume de ácido utilizado na titulação da base da PB (prova em branco);

N = normalidade do ácido;

E= equivalente grama de carbono = 6



FIGURA 13. Frascos para análise de CO<sub>2</sub> (A) com armadilhas (béquer com solução de NaOH) para captura do gás carbônico – frasco extrema esquerda: prova em branco. Titulação da solução de NaOH com HCl de mesma normalidade (B) para cálculo da quantidade de CO<sub>2</sub> liberado.

A armadilha de NaOH para captura do CO<sub>2</sub> liberado é explicada pela formação de carbonato (CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>), com consumo de hidroxilas (OH<sup>-</sup>), de acordo com a seguinte equação de equilíbrio (ZIBILSKA, 1994):  $CO_2 + 2Na^+ + 2OH^- \rightleftharpoons CO_3^{2-} + 2Na^+ + H_2O$

## 2.7. Enumeração de microorganismos pela técnica de diluição e plaqueamento em superfície

Foram enumerados os microorganismos viáveis, suscetíveis de crescimento em meio Ágar-Nutriente e meio Martin (Tabela 12), de acordo com Wollum II (1982).

TABELA 12. Composição do meio de cultura Ágar-Nutriente e Martin para enumeração de microorganismos.

Meio de cultura	Composição
Ágar-Nutriente ( <i>Contagem bacteriana</i> )	3,0g NaCl 3,0g Extrato de carne 1,0g Peptona 15,0g Ágar 1000 mL Água destilada
Martin ( <i>Contagem fúngica</i> )	1,0g K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,5g MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O 5,0g Peptona 10,0g Dextrose 0,3g Rosa de Bengala 15,0g Ágar 1000mL água destilada

Seguiu-se então o procedimento definido por Silva Filho e Oliveira (2004), utilizando-se a “técnica de plaqueamento em superfície”. Dez gramas de solo ou CR foram colocados, sob condições assépticas em um erlenmeyer de 250mL esterilizado. Adicionaram-se 100mL de água destilada esterilizada, gradativamente, sendo o material homogeneizado e submetido à agitação durante 1 hora, a 70rpm. Foram feitos dois extratos para cada material, os quais foram misturados ao final da agitação. Com o extrato resultante foram feitas

diluições seriadas em água destilada, até  $10^6$ , também em duplicata. Ao final, diluições semelhantes de um mesmo material foram misturadas para serem plaqueadas.

Utilizou-se o meio Ágar-Nutriente em placas de Petri (10mL) para o cultivo de bactérias e meio Martin para o cultivo de fungos. Foram utilizadas as diluições de  $10^4$  a  $10^6$  para o plaqueamento de bactérias mesófilas e diluições de  $10^2$  a  $10^5$  para o plaqueamento de bactérias termófilas. Para a contagem de fungos mesófilos, utilizaram-se as diluições de  $10^1$  a  $10^5$ .

Dentro de capela de fluxo laminar, adicionaram-se à superfície do meio de cada placa 100 $\mu$ L da diluição desejada, utilizando-se uma alça de Drigalski para espalhar o líquido até a completa absorção pelo meio. Foram realizadas três repetições (placas) para cada diluição, em cada tratamento.

As placas foram incubadas em posição invertida a 24°C para a enumeração das bactérias e fungos mesófilos, e a 45°C para as bactérias termófilas, de acordo com Sharma e Kilpatrick (2000).

Foram selecionadas as diluições para enumeração efetiva de bactérias e de fungos que proporcionaram o desenvolvimento de 30 a 300 UFCs.

### **2.8. Avaliação da atividade da enzima lacase (EC 1.10.3.2)**

A atividade da enzima lacase foi avaliada para os CRs e os solos (armazenados nas condições especificadas) durante 2 meses, a cada 15 dias. Para tal, 5g de solo ou composto residual foram macerados com 10mL de água destilada. Foram realizados três extratos de cada material, utilizando-se três amostras de regiões distintas e extremas de cada material. Cada extrato foi centrifugado durante 15 minutos, a 6500rpm, sendo o sobrenadante utilizado para a avaliação da atividade enzimática.

A atividade da lacase foi monitorada em espectrofotômetro (JENWAY 6100), a 525nm, através da oxidação da siringaldazina ( $\epsilon = 65.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) durante 1 minuto de

reação, de acordo com Ander e Eriksson (1976). Utilizou-se um tampão específico para se avaliar a atividade da lacase para cada espécie fúngica: tampão fosfato de sódio (0,1M) pH 7,0 para *A. brasiliensis*, tampão tartarato de sódio (0,1M) pH 5,5 para *P. ostreatus* e pH 4,2 para *L. edodes*. O pH do tampão utilizado para avaliar a atividade da lacase de *L. edodes* foi o mesmo proposto por Ander e Eriksson (1976), por ser o pH ideal para a atividade, de acordo com a literatura (LEATHAM, STAHMANN, 1981; MAKKAR et al., 2001). Contudo, para as lacases de *A. brasiliensis* e *P. ostreatus*, a escolha do valor de pH do tampão baseou-se em testes preliminares de caracterização destas lacases (RIBAS et al., 2005), como mostra a Figura 14.

Foram realizadas duas avaliações de atividade enzimática para cada um dos três extratos de cada tratamento.

Mistura de reação:

- 500 $\mu$ L do extrato do meio de cultura;
- 475 $\mu$ L de tampão;
- 25 $\mu$ L de solução de siringaldazina (500 $\mu$ g/mL de etanol).

Para cálculo da atividade enzimática:

$$\text{Abs} = c \cdot d \cdot \epsilon$$

$$c = \text{Abs} / \epsilon$$

c = concentração

d = 1 (caminho ótico)

**Abs** = absorvância em 525nm

$\epsilon$  = 65000 M<sup>-1</sup> (absortividade)

(Multiplica-se o valor encontrado pelo fator de diluição).

Uma unidade enzimática (U) foi determinada como a quantidade de produto formado pela oxidação da siringaldazina em  $\mu$ M/minuto. A atividade da lacase foi mensurada em U por grama de cada material.

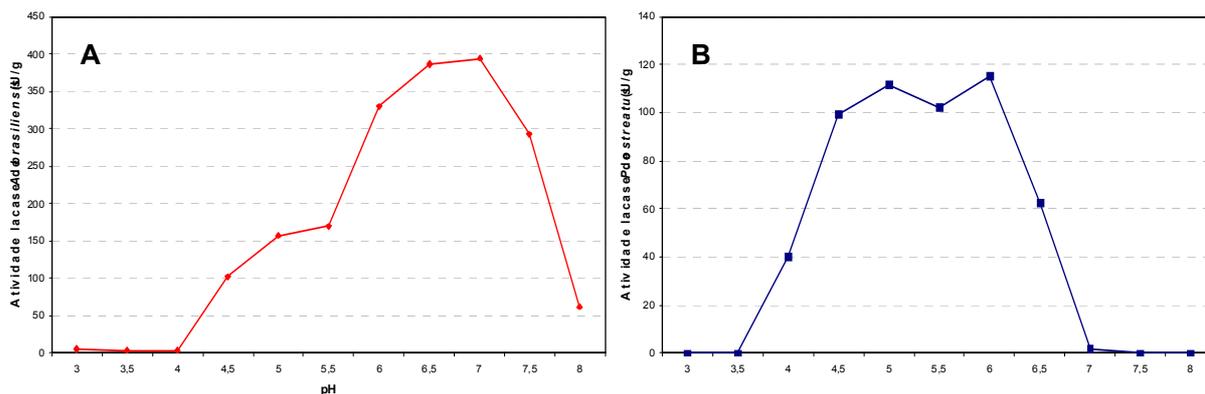


FIGURA 14. Atividade da lacase das estirpes de *A. brasiliensis* (A) e de *P. ostreatus* (B) utilizadas no presente estudo, em função do pH de reação (RIBAS et al., 2005). U =  $\mu\text{M}/\text{min}$  por grama de meio de cultura BDA. Testes realizados em triplicata (3 extrações – 2 medidas por extração). Tampões utilizados nas reações: tampão tartarato para valores de pH entre 3,0 e 5,5; tampão fosfato para valores entre 6,0 e 8,0.

É importante ressaltar que diferentes estirpes de uma mesma espécie fúngica podem apresentar lacases distintas, com valores de pH ótimos de atuação diferentes.

## 2.9. Delineamento e análises estatísticas

Em todas as avaliações as amostras foram aleatórias e a disposição das repetições totalmente casualizada.

Tanto para a liberação de  $\text{CO}_2$  como para atividade da enzima lacase foram realizadas curvas ao longo do tempo, sendo apresentado o intervalo de confiança (95%) dos valores. Como mencionado, foram realizadas três repetições (frascos) para cada análise de  $\text{CO}_2$  e seis repetições para a avaliação da atividade da enzima lacase (três extratos e duas avaliações para cada um, em cada tratamento).

Na enumeração dos microorganismos foram realizadas três repetições (placas) para cada material/diluição. As comparações entre o número de unidades formadoras de colônias (UFCs) foi realizada através de análise de variância (ANOVA), seguida pelo Teste de Tukey ( $p < 0,05$ ), utilizando-se para tal o logaritmo dos valores na base 10, devido heterogeneidade de variâncias.

### 3. Avaliação da biotransformação do herbicida atrazina “in vitro” por *A. brasiliensis*, *L. edodes* e *P. ostreatus*

#### 3.1. Herbicida

Os estudos de biotransformação foram realizados para o princípio ativo [2-cloro-4-(etilamino)-6-(isopropilamino)-1,3,5-triazina], conhecido como atrazina. Para tal, utilizou-se um produto comercial (herbicida) como fonte da substância, o “Primólieo” (Syngenta), constituído por 40% (m/v) de atrazina e o restante por materiais inertes. De acordo com a classificação toxicológica presente no rótulo do herbicida comercial, este é enquadrado no grupo IV: pouco tóxico, sendo recomendado para a cultura do milho. Contudo, existem formulações com atrazina que são classificadas no grupo I: extremamente tóxico. Ainda de acordo com os dados do herbicida Primólieo (rótulo) e da ANVISA, este é considerado muito perigoso ao meio ambiente, altamente persistente e tóxico aos organismos aquáticos (algas e microcrustáceos).

#### 3.2. Microorganismos

*Agaricus brasiliensis* Wasser & Didukh [= *A. blazei* (Murrill) ss. Heineman], *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler e *Pleurotus ostreatus* (Jaquin ex Fr.) Kummer foram selecionadas por serem três das principais espécies fúngicas mais cultivadas no Brasil para a produção de cogumelos comestíveis e medicinais.

Foram utilizadas a estirpe UFSC-51 de *A. brasiliensis* e a estirpe UFSC-17 de *L. edodes*, pertencentes à Coleção de Fungos Comestíveis e Medicinais do Departamento de Microbiologia e Parasitologia da Universidade Federal de Santa Catarina. Ambas as estirpes vêm sendo amplamente empregadas no cultivo de cogumelos na região sul do Brasil, especialmente no Estado de Santa Catarina. A estirpe de *P. ostreatus* utilizada nas experimentações foi adquirida com o Laboratório de Bioquímica e Biotecnologia de Fungos,

do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Santa Catarina, onde estudos de atividade enzimática e de degradação de efluentes já foram realizados com este fungo.

### **3.3. Preparo das culturas fúngicas matrizes para o estudo de biotransformação**

O meio de cultura utilizado para o crescimento de *A. brasiliensis*, *L. edodes* e *P. ostreatus*, para a obtenção de culturas matrizes, foi o meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA). O pH foi ajustado para 5,5, tanto para *L. edodes* como para *P. ostreatus*, e 6,8 para *A. brasiliensis*, utilizando-se para tal objetivo uma solução 1N de HCl ou de NaOH, dependendo do valor de pH inicial. A solução foi então esterilizada em autoclave, a 121°C e a 1 kgf/cm<sup>2</sup>, durante 25 minutos.

O meio foi vertido em placa de Petri (9cm de diâmetro), 20mL/placa, e inoculado após solidificação, no centro, com um círculo de 1cm de diâmetro com culturas estoque de cada espécie, as quais foram em seguida incubadas em estufa BOD, a 24°C, durante 25 dias, antes da instalação dos experimentos. Essas foram assim as culturas matrizes que foram utilizadas nos experimentos que avaliaram a tolerância e a capacidade de degradação da atrazina pelas três espécies, em condições “in vitro”.

### **3.4. Avaliação “in vitro” da tolerância de *A. brasiliensis*, *L. edodes* e *P. ostreatus* às diferentes concentrações de atrazina em meio de cultura**

A tolerância das três espécies fúngicas à atrazina foi avaliada pela capacidade de crescimento destes fungos em meio BDA, com as seguintes concentrações do herbicida: 0 (controle); 1; 5; 10; 25 e 50 µg/mL. Estas concentrações foram selecionadas por serem superiores às proporcionadas pela aplicação de apenas uma dose recomendada do herbicida no solo (ver revisão bibliográfica, item 3.1), em virtude de doses expressivas de atrazina poderem ser encontradas, devido aplicações consecutivas e acumulativas.

O pH do meio foi ajustado para 6,8 para *A. brasiliensis* e para 5,5 para *L. edodes* e *P. ostreatus*, sendo então esterilizado, como mencionado anteriormente. O herbicida (produto comercial) com atrazina foi incorporado aos meios estéreis, atingindo as concentrações selecionadas. Os meios foram então vertidos nas placas de Petri (9cm de diâmetro), colocando-se 20mL de meio em cada placa.

Após a solidificação dos meios, círculos de aproximadamente 1cm de diâmetro das culturas matrizes de cada fungo foram utilizados para a inoculação dos meios – um círculo por placa. Estas foram então incubadas em estufa BOD, a 24°C, até a colonização completa do meio (10-20 dias). Foram realizadas 4 repetições (placas) para cada tratamento (concentração/fungo).

A avaliação da capacidade de crescimento dos fungos nas diferentes concentrações de atrazina em meio BDA foi realizada através da análise do crescimento micelial radial. Para tal, linhas perpendiculares foram traçadas na porção inferior e externa das placas de Petri, com o interseção no centro da placa, exatamente onde os círculos das culturas matrizes foram depositados. Sobre estas linhas, foi avaliado o crescimento micelial radial a cada 48h, em milímetros, até a completa colonização da superfície do meio de cultura nas placas.

### **3.5. Avaliação da atividade enzimática da lacase de *A. brasiliensis*, *L. edodes* e de *P. ostreatus***

A atividade da enzima lacase (EC 1.10.3.2) foi mensurada para os meios de cultura (BDA) com diferentes concentrações de atrazina (0, 5, 10, 25 e 50µg/mL), ao final do 15º e 30º dia de incubação, para as três espécies fúngicas utilizadas no experimento de tolerância à atrazina.

No experimento de biotransformação, cuja concentração de atrazina foi de 10µg/mL, a avaliação da atividade enzimática foi realizada ao final de 10, 20 e 30 dias de incubação, sendo mensurada para cada tratamento (fungo/pH).

Para a dosagem enzimática, foi realizada uma extração aquosa da lacase presente no meio de cultura. Para isso, 0,5g do meio de cultura foi macerado com 3mL de água, centrifugado a 4500rpm, sendo o sobrenadante utilizado para mensurar a atividade. Todas as atividades foram mensuradas em triplicata, que compreendia a extração de 3 placas distintas de um mesmo tratamento (repetições), sendo as medidas de atividade a média de duas medidas para cada extração.

A atividade da lacase foi monitorada a 525nm, através da oxidação da siringaldazina ( $\epsilon = 65.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) durante 1 minuto de reação, de acordo com Ander e Eriksson (1976), como já descrito (item 2.8). A atividade foi avaliada em U por grama de meio de cultura.

### **3.6. Avaliação da biotransformação de atrazina “in vitro” em diferentes valores de pH**

Após a avaliação do efeito da concentração de atrazina no crescimento de *A. brasiliensis*, *L. edodes* e *P. ostreatus*, foi avaliado para estes fungos, na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ , a influência do pH na possível biodegradação da atrazina. Os valores de pH selecionados foram: 4,5, 5,5 e 6,5. A concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$  foi escolhida por ser uma concentração intermediária entre as concentrações testadas e cuja tolerância pelas espécies fúngicas foi satisfatória.

O meio BDA foi utilizado para o estudo do efeito dos diferentes valores de pH. O produto comercial com atrazina foi incorporado nos meios estéreis, visando obter a concentração desejada. Cada placa de Petri (9cm diâmetro) incluiu 20mL dos meios com diferentes valores de pH.

Foram realizadas 4 repetições (placas) para cada valor de pH, para cada espécie fúngica selecionada. Após a solidificação do meio, círculos de 1cm de diâmetro das culturas matrizes de cada fungo foram colocados na região central das placas, como descrito

anteriormente. As placas foram então incubadas em estufa BOD, a 24°C, durante 30 dias. Placas com meio BDA sem inoculação do fungo, para cada valor de pH escolhido, foram utilizadas como parâmetro para se avaliar a porcentagem de biotransformação pelo fungo.

Ao longo desse período, o crescimento micelial radial dos fungos nos meios com os diferentes valores de pH também foi avaliado, utilizando-se a metodologia descrita anteriormente. Placas com meio BDA, com os valores de pH definidos e inoculadas com as três espécies, sem o princípio ativo, como anteriormente descrito, foram utilizadas como controle, com o propósito de avaliar comparativamente o crescimento micelial radial na presença e na ausência do herbicida, na concentração de 10µg/mL.

A biotransformação foi monitorada por cromatografia líquida de alta eficiência ou “HPLC” (módulo de cromatografia líquida Shimadzu LC-10AS; detector UV-VIS Shimadzu SPD-10A; registrador Shimadzu C-R6A), utilizando coluna C18, Supersil ODS 5µm (4,4mm x 150 mm), fase móvel acetonitrila e água (60:40, v/v), fluxo de 0,6 mL/min e detector UV/VIS a 220nm, sendo avaliada a concentração do princípio ativo (atrazina) após 10, 20 e 30 dias, comparando-se os tratamentos controles e os tratamentos inoculados com os fungos.

A extração de atrazina do meio de cultura para análise em HPLC foi realizada com metanol. Neste caso, 0,5g do meio de cultura com o crescimento fúngico (Figura 15) foi macerado com 2,5mL de metanol, sendo as amostras submetidas a ultrassonicação durante 12 minutos e então congeladas a -10°C, até o final do cultivo em placas – com a obtenção total das amostras – para então análise através de HPLC. Foi realizada uma extração para cada cultura (placa), sendo estas as unidades amostrais. Foram feitas duas repetições (extrações) para cada tratamento no 10<sup>o</sup> e no 20<sup>o</sup> dia de cultivo, sendo, no entanto, efetuadas três repetições no 30<sup>o</sup> dia.

Para análise, as amostras descongeladas foram centrifugadas a 10000g durante 5 minutos, e então injetadas no aparelho de HPLC para análise da concentração de atrazina.

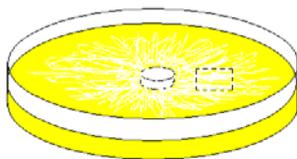


FIGURA 15. Local de coleta do meio de cultura nas placas de Petri para extração e análise da degradação de atrazina (área tracejada).

Para a confirmação do tempo de retenção da atrazina na corrida cromatográfica e determinação da sua concentração, foi utilizada uma curva de calibração (método da padronização externa) com atrazina padrão (95%), em metanol. O tempo de retenção da atrazina, dentro das condições mencionadas de fluxo e coluna, foi de aproximadamente 5 minutos.

### **3.7. Delineamento e análises estatísticas**

Em todos os experimentos as placas foram dispostas de forma totalmente casualizada dentro da estufa BOD, sendo a posição alterada em cada medida (a cada 2 dias).

Para avaliação do crescimento micelial radial foram realizadas curvas de crescimento, sendo comparado o crescimento micelial final entre os tratamentos para cada fungo, utilizando-se ANOVA, seguida pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Foram realizadas quatro repetições (placas) para cada tratamento nesta avaliação.

Foram realizadas curvas de atividade da enzima lacase em função da concentração de atrazina e do tempo, com os intervalos de confiança dos valores (95%), referentes a 6 repetições (três extrações e duas medidas de atividade para cada uma).

A comparação da taxa de biotransformação da atrazina extraível foi avaliada para o 30<sup>o</sup> dia de cultivo, através de ANOVA, seguida pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ), com as médias baseadas em três repetições.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 1. Avaliação da utilização do CR da produção de cogumelos de *A. brasiliensis* e de *L. edodes* no desenvolvimento de alface

#### 1.1. Análises físicas e químicas dos materiais

##### 1.1.1. Análise de capacidade de campo e do pH

A Tabela 13 apresenta os resultados da análise da capacidade de campo e do pH inicial dos materiais utilizados, assim como o valor de pH após a correção destes materiais com calcita para valores adequados ao desenvolvimento de *L. sativa* (6,0 – 6,8).

TABELA 13. Características dos CRs da produção de cogumelos de *A. brasiliensis* – com camada de cobertura à base de turfa e de solo – e de *L. edodes*, assim como do solo utilizado nas experimentações, em termos de capacidade de campo, pH original e pH após correção para a formulação dos substratos para os experimentos.

Composto residual (CR)	Capacidade de campo (%)	pH original	pH após correção <sup>1</sup>
CR <i>A. brasiliensis</i> camada turfa <sup>2</sup>	58,73 ± 1,68	8,06 ± 0,01	7,55 ± 0,03
CR <i>A. brasiliensis</i> camada solo	41,40 ± 6,46	5,79 ± 0,26	6,05 ± 0,08
CR <i>L. edodes</i>	77,30 ± 2,23	4,40 ± 0,02	6,39 ± 0,02
Solo	23,27 ± 2,58	5,23 ± 0,03	6,51 ± 0,04

<sup>1</sup>pH após 20 dias da correção com calcita. Médias baseadas em três repetições.

<sup>2</sup>CR não corrigido com calcita, devido pH elevado.

Analisando-se a capacidade de campo dos CRs de *A. brasiliensis* com camada à base de turfa e de solo, assim como o CR de *L. edodes*, verificou-se que a retenção de umidade foi, respectivamente, 2,5, 1,8 e 3,3 vezes maior do que aquela verificada no solo. Isto evidencia a capacidade do CR de melhorar a estrutura do solo, diminuindo as perdas de nutrientes por lixiviação (MAHER et al., 2000; MAFF, 2004). O CR de *L. edodes* apresentou a maior capacidade de campo em virtude de sua natureza, composto especialmente por fibras da madeira – com um elevado teor de MO. Já a capacidade de campo do CR de *A. brasiliensis*

com camada de cobertura à base de turfa foi aproximadamente 1,4 vezes superior ao CR do mesmo fungo com camada de cobertura à base de solo, provavelmente em decorrência da natureza da camada de cobertura. A turfa dispõe de uma maior capacidade de retenção de água em relação a maioria dos solos, mesmo argilosos, como foi o caso do solo utilizado como camada de cobertura do CR avaliado.

A faixa de pH ideal de um composto orgânico deve estar entre 6,0 e 7,5, o que é um indicativo de sua qualidade e maturidade, especialmente quando se enfatiza a fertilização (ALEXANDER, 1994; Woods End Research Laboratory, 2000). Valores elevados podem causar inibição da atividade dos microorganismos fixadores de nitrogênio (Woods End Research Laboratory, 2000), o que não é interessante em termos de fertilidade vegetal.

Analisando-se o pH dos materiais, verificou-se que o pH inicial do CR de *A. brasiliensis* com camada de cobertura à base de turfa apresentou-se em torno de 8,0. Contudo, este composto não foi submetido à correções de pH para valores entre 6,0 e 6,8, para evitar fator adicional de interferência experimental. Porém, após a correção dos demais CRs e do solo – aproximadamente 20 dias –, o pH deste composto baixou para 7,6, praticamente na faixa recomendada para fertilizantes orgânicos. Este fato foi evidenciado por Levanon e Danai (1995), que avaliaram o pH do CR ao longo do tempo, constatando que, de 0 a 3 meses após sua produção, o pH baixou de 8,1 para 7,0. Entretanto, as condições de armazenamento do CR no presente trabalho não foram semelhantes àsquelas utilizadas por esses pesquisadores. O decréscimo no valor de pH verificado pelos autores provavelmente ocorreu devido à lixiviação de alguns nutrientes (íons) durante o processo de maturação no ambiente, enquanto que o CR utilizado no presente experimento foi mantido abrigado de fatores ambientais externos – como chuvas e interperies. Desta forma, o ligeiro decréscimo no pH verificado no presente trabalho decorreu do processo de estabilização do material, após a homogeneização

do CR com sua respectiva camada de cobertura, uma vez que este composto já havia sido coletado há 6 meses quando foram iniciados os experimentos.

Na decomposição da matéria orgânica, mais especificamente durante o processo de compostagem para a produção de substratos para o cultivo de cogumelos, o pH tende inicialmente a diminuir, devido à acumulação de ácidos orgânicos, como resultado da fermentação. Após o estabelecimento de condições aeróbicas, os ácidos orgânicos são utilizados e um aumento do pH do composto é observado. Depois disso, um decréscimo no pH é verificado até aproximadamente a neutralidade, o que é típico em um processo de compostagem (INBAR et al., 1990). Esta última etapa poderia estar ocorrendo no CR de *A. brasiliensis* com camada de turfa, em virtude de uma possível compostagem menos eficiente.

O CR de *A. brasiliensis* com camada à base de solo apresentou um pH inicial de aproximadamente 5,8, sendo que após a correção o pH foi elevado para 6,1. Contrariamente ao CR do mesmo fungo com camada de cobertura de turfa, verificou-se que o pH original do CR com camada à base de solo foi consideravelmente inferior.

De acordo com a literatura, o CR da produção de espécies do gênero *Agaricus* geralmente apresenta um pH básico, variando entre 7 e 8. Contudo, esta faixa de pH pode variar, dependendo da natureza do composto e de sua camada de cobertura. Beyer (1999) constatou valores de pH do CR logo após sua produção variando entre 5,8 e 7,7. Maher e Magette (1997) indicaram um valor em torno de 6,6. Desta forma, o pH dos CRs de *A. brasiliensis* analisados encontravam-se no intervalo dos valores de referência.

Já o CR de *L. edodes* apresentou o pH em torno de 4,4, sendo que após sua correção o pH elevou-se para 6,4. Os valores de pH baixos são esperados após a produção de *L. edodes* em sistema de cultivo axênico. Stamets (2000) mencionou um decréscimo no pH inicial do substrato, de aproximadamente 5,5, para 3,5 – 4,5 antes da primeira frutificação.

Ribas (2003), avaliando as variações de pH durante o cultivo de *L. edodes* em condições axênicas, verificou um decréscimo no pH de 5,5 para 3,5 – 4,0 após o cultivo.

A Tabela 14 apresenta as características dos substratos utilizados para avaliação do desenvolvimento de alface em termos de pH antes e após o cultivo, assim como a capacidade de campo inicial estimada dos substratos.

TABELA 14. Características dos substratos formulados com CR da produção de cogumelos (CR) de *A. brasiliensis* (*Ab*) – camada de cobertura à base de turfa e de solo – e de *L. edodes* (*Le*), juntamente com o solo, em termos de valores de pH antes e após o cultivo em casa de vegetação de *Lactuca sativa*, assim como a capacidade de campo inicial estimada.

Substrato	pH antes do plantio	pH após plantio das mudas (40 dias)	Capacidade de campo inicial estimada (%)
CR <i>Ab</i> -camada turfa 5% <sup>1</sup>	7,59 ± 0,06	7,48 ± 0,03	25,04
CR <i>Ab</i> - camada turfa 10%	7,65 ± 0,01	7,49 ± 0,01	26,82
CR <i>Ab</i> - camada turfa 25%	7,66 ± 0,02	7,57 ± 0,05	32,14
CR <i>Ab</i> - camada turfa 40%	7,67 ± 0,01	7,50 ± 0,01	37,45
CR <i>Ab</i> - camada solo 5%	6,11 ± 0,18	5,92 ± 0,07	24,18
CR <i>Ab</i> - camada solo 10%	6,03 ± 0,59	5,79 ± 0,35	25,08
CR <i>Ab</i> - camada solo 25%	5,71 ± 0,06	6,03 ± 0,21	27,80
CR <i>Ab</i> - camada solo 40%	5,62 ± 0,01	6,00 ± 0,14	30,52
CR <i>Le</i> 5%	8,69 ± 0,08	8,21 ± 0,02	25,97
CR <i>Le</i> 10%	8,89 ± 0,03	8,14 ± 0,18	28,67
CR <i>Le</i> 25%	9,00 ± 0,01	8,39 ± 0,08	36,78
Solo	6,38 ± 0,01	6,44 ± 0,01	23,27
NPK <sup>2</sup>	6,47 ± 0,04	5,61 ± 0,13	23,27
CR <i>Ab</i> -turfa 10% + NPK	7,61 ± 0,01	7,46 ± 0,03	26,82

<sup>1</sup>Percentagem em peso seco do composto residual em relação ao solo.

<sup>2</sup>Adução química com fontes de N, P e K.

Em geral, não houve alterações significativas nos valores de pH dos substratos após o cultivo de *L. sativa*, evidenciando uma estabilidade do material, influenciada pela calcita (corretivo), quando presente. Excepcionalmente, o CR de *L. edodes* corrigido (pH 6,4), ao ser incorporado no solo (pH 6,5), elevou o pH do substrato para 8-9 (Tabela 14), possivelmente em razão de interação iônica com o substrato.

Avaliando a capacidade de campo estimada dos substratos formulados, verificou-se que a incorporação dos CRs ao solo elevou sua capacidade de retenção de água, com

conseqüente manutenção de nutrientes e melhoria de sua estrutura – característica importante para o condicionamento e a fertilidade de solos.

### **1.1.2. Análises químicas**

De acordo com Inbar et al. (1990), a maturidade dos compostos orgânicos afeta criticamente seu desempenho na agricultura. Esta característica é de fundamental importância quando os compostos são aplicados em curto prazo antes do plantio, e menos importante quando estes compostos são aplicados previamente no solo, onde a decomposição continua ocorrendo. Os compostos imaturos conduzem a uma elevada atividade microbiana no solo após sua incorporação, potencialmente causando deficiência de oxigênio e uma variedade de problemas indiretos de toxicidade para as plantas (ZUCCONI et al., 1981).

A razão C/N é freqüentemente utilizada como um dos índices de maturidade de um composto, da sua taxa de decomposição, fornecendo informação importante sobre o composto e o manejo requerido quando for incorporado ao solo (WATSON, 2003; Woods End Research Laboratory, 2000). Dentro deste contexto, um decréscimo da razão C/N de inicialmente 35-40/1 ou mais elevada (no caso de resíduos madeireiros) para um nível em torno de 18-20/1 indica um avançado grau de estabilização (ZUCCONI; BERTOLDI, 1987 apud INBAR et al., 1990). De acordo com o Woods End Research Laboratory (2000), o composto é considerado adequado para aplicação quando a razão C/N atingir 17/1 ou valores inferiores. Por outro lado, razões C/N excessivamente baixas causam toxicidade às plantas pela liberação de amônia (INBAR et al., 1990).

De acordo com as análises dos CRs utilizados no experimento, tanto o CR de *A. brasiliensis* como camada à base turfa como o CR com camada à base de solo apresentaram-se aparentemente estáveis, com razões C/N de 15/1 e 9/1 (Tabela 15), respectivamente. Apesar de apresentarem razões baixas, estes CRs não dispõem de potencial para liberação de amônia, em virtude da baixa concentração de nitrogênio. Entretanto, o CR da produção de *L.*

*edodes* apresentou uma razão C/N elevada, em torno de 86/1, o que reflete um baixo grau de degradação do material. Este CR apresenta uma menor porcentagem de degradação em comparação ao CR de *A. brasiliensis*, em virtude de não ser previamente compostado e pela natureza do material (menor teor de nitrogênio).

TABELA 15. Principais características químicas dos CRs utilizados no experimento de fertilização.

Parâmetro	Composto residual (CR)		
	CR <i>A. brasiliensis</i> – camada turfa	CR <i>A. brasiliensis</i> – camada solo	CR <i>L. edodes</i>
MO total (%)	51,92	15,17	90,99
C total (%)	28,84	8,42	50,55
N total (%)	1,82	0,70	0,59
P (P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> ) total (%)	1,80	1,05	0,58
K (K <sub>2</sub> O) (%)	1,35	0,91	0,17
C/N	15/1	9/1	86/1

Análises (baseadas na matéria seca) realizadas pelo Laboratório da Companhia Integrada de Desenvolvimento Agrícola de SC (CIDASC): Rod. Admar Gonzaga, 1588, CP.256, Florianópolis, SC, Cep 88034-001; home-page: <http://www.cidasc.sc.gov.br>).

Geralmente compostos orgânicos com razão C/N superior a 30/1 requerem suplementação com nitrogênio quando adicionados ao solo com objetivo de fertilização. A adição de nitrogênio é fundamental em virtude da rápida multiplicação dos microorganismos, os quais consomem o N do solo, podendo causar deficiência deste macronutriente para a planta (INBAR et al., 1990; WATSON, 2003). Desta forma, o CR de *L. edodes* deveria ter sido suplementado com N antes de sua utilização como fertilizante. Sem suplementação o resíduo tem potencial de ação negativa no desenvolvimento vegetal.

A diminuição da razão C/N e o aumento da concentração de cinzas são reflexos da decomposição da matéria orgânica e da estabilização do composto (HSU; LO, 1999). Desta forma, concentrações extremamente elevadas de MO não são desejáveis em compostos para fertilização direta, pelo grau de imaturidade do composto, assim como concentrações demasiadamente baixas de MO, em virtude desse parâmetro representar um componente

importante em termos de fertilidade e de melhoramento da estrutura dos solos. De acordo com Alexander (1994), a porcentagem ideal de MO de um composto orgânico deve estar em torno de 35-45%. Materiais como a turfa preta (espanhola), conhecida como condicionador, fertilizante e substrato para vegetais, dispõe de cerca de 47% de MO (PARDO; JUAN; PARDO, 2003). A porcentagem de MO do CR de *A. brasiliensis* com camada de cobertura à base de turfa encontrou-se próxima da faixa ideal – 52%. Por outro lado, a o teor de MO do CR de *A. brasiliensis* com camada de cobertura à base de solo foi consideravelmente menor, em torno de 15% (Tabela 14). Este fato foi provavelmente um reflexo da diluição proporcionada pela camada de cobertura à base de solo, pobre em nutrientes (ao contrário da turfa), pois os dois CRs apresentavam praticamente a mesma composição. Além disso, o CR com camada à base de turfa foi coletado primeiramente, devendo portanto dispor de um teor de MO menor. Por outro lado, o teor da MO do CR de *L. edodes* foi demasiadamente elevado, em torno de 90%, refletindo o grau de imaturidade desde composto para ser incorporado ao solo, objetivando uma fertilização imediata. O teor de C, por sua vez, seguiu o mesmo padrão da MO, em virtude de ser base de suas estruturas moleculares.

Tanto a concentração de macronutrientes como de micronutrientes são importantes para o desenvolvimento vegetal e conseqüentemente seus teores em compostos orgânicos visando à fertilização. N, P, K, Ca, Mg e S são considerados macronutrientes e expressos em porcentagem, enquanto que outros elementos, como Mn, Zn e Cu, são considerados micronutrientes, e expressos em mg/kg (ppm). Todos são importantes para as plantas, mas usualmente os macronutrientes são mais focados (WATSON, 2003) em termos comerciais de fertilização agrícola. O nitrogênio, por exemplo, pode ser encontrado em duas formas significantes no composto: forma inorgânica, como N-nitrato e N-amoniacal, e forma orgânica, quando ligado a moléculas orgânicas – como a maioria do N de compostos orgânicos. Contudo, compostos imaturos podem conter uma maior concentração de N-

amoniaco do que compostos estáveis. Enquanto que as formas inorgânicas estão prontamente disponíveis para a absorção das plantas, as formas orgânicas dependem da velocidade dos microorganismos de degradarem o composto (HADAS; PORTNOY, 1994), transformando-as em formas inorgânicas.

De acordo com Alexander (1994), o teor de N ideal de compostos orgânicos deve estar entre 1,0 e 2,0%. O CR de *A. brasiliensis* com camada de turfa apresentou um valor dentro da faixa apresentada, em torno de 1,82%, enquanto o valor do CR do mesmo fungo, com camada à base de solo, foi de 0,70% - menos da metade do valor anterior, porém próximo da faixa estabelecida. É interessante ressaltar o papel do fator de diluição proporcionado pela camada de cobertura à base de solo. Entretanto, o CR residual de *L. edodes* apresentou uma concentração de N baixa, de 0,59%, o que pode ser prejudicial em termos de fertilidade, especialmente pelo seu teor de C elevado (50%).

Comparativamente, uma amostra de turfa preta (espanhola) apresentou 1,17% de N, enquanto que os teores de N de casca de pinus compostada e da fibra de madeira foram, respectivamente, de 0,4% (assemelhando-se ao teor de N do CR de *L. edodes*) e 0,09% (PARDO; JUAN; PARDO, 2003). Pesquisas com CR, especialmente aquelas utilizadas na Europa, apresentam teores mais elevados de N na matéria seca, como 2,1% (LEVANON; DANAI, 1995); 2,55% (MAHER; MAGETTE, 1997) e 2,84% para o CR de *A. brunnescens* (SHARMA; FURLAN; LYONS, 1999). Contudo, Beyer (1999) apresentou uma faixa variando de 1,42% a 2,5%, na qual se enquadraria o CR de *A. brasiliensis* com camada de turfa. É provável que o baixo teor encontrado esteja relacionado à concentração inicial de N no composto, à natureza da fonte, assim como ao processo de compostagem – onde grande porcentagem de nitrogênio pode ter sido volatilizada na forma de amônia.

Em relação ao fósforo e ao potássio, Alexander (1994) propõe um intervalo ótimo entre 0,6-0,9% de P e 0,2-0,5% de K para compostos orgânicos. Os CRs de *A. brasiliensis*

com camada à base de turfa e de solo apresentaram valores de P acima da faixa, de 1,80% e 1,05%, respectivamente, mostrando que esses CRs poderão ser fontes eficientes deste nutriente. Esses CRs apresentaram também elevadas concentrações de K – 1,35% e 0,91%, respectivamente. De acordo com Maher (1994), solos condicionados com CR podem apresentar elevada concentração de P e K, indicando que este composto pode ser uma fonte eficiente destes nutrientes. Já as concentrações de P e K do CR de *L. edodes* praticamente ficaram dentro da faixa esperada, de 0,58% e 0,17%, respectivamente. Comparativamente, Pardo, Juan e Pardo (2003) detectaram baixos teores de P na turfa preta (espanhola), em torno de 0,06%, e 0,2% de K.

Deve-se levar em consideração que, em compostos orgânicos, o K é mais rapidamente disponibilizado, numa taxa inicial de 80% do total, enquanto que a taxa inicial de P disponibilizado é de 25-75%, com as percentagens mais elevadas em solos ácidos (Woods end Research Laboratory, 2000).

## **1.2. Avaliação do desenvolvimento de *Lactuca sativa***

### **1.2.1. Peso seco**

Variações no peso seco total, aéreo e radicular dos espécimes de *L. sativa* foram detectadas em função da dose de CR de *A. brasiliensis* com camada de cobertura à base de turfa e de solo, em relação à quantidade de solo, como mostra a Figura 16.

Avaliando o desenvolvimento das plantas nos tratamentos com CR de *A. brasiliensis*, observou-se um aumento no peso seco de todos os parâmetros quando a adição foi de 5 e 10% em relação ao controle, com diminuição do crescimento para doses superiores. Os tratamentos com 10% desse CR com camada de cobertura à base de turfa e de terra, proporcionaram, respectivamente, um aumento no peso seco aéreo de 2,2 e 2,8 vezes em relação ao controle (solo), e de 1,3 e 1,7 vezes em relação à fertilização química. Este

resultado evidencia que a adição do CR favoreceu o desenvolvimento vegetal, porém doses iguais ou superiores a 25% foram inibitórias para alguns dos principais parâmetros do desenvolvimento.

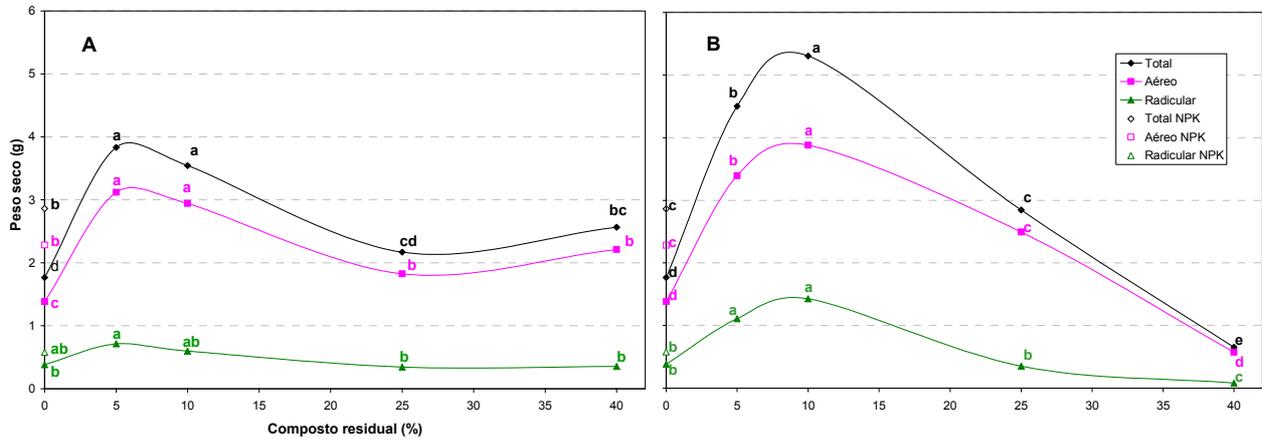


FIGURA 16. Peso seco total, aéreo e radicular de *L. sativa* de acordo com diferentes porcentagens de CR da produção de *A. brasiliensis*. A) Composto residual com camada de cobertura de turfa; B) composto residual com camada de cobertura de solo. Comparações (letras minúsculas) realizadas por ANOVA/Newman-Keuls ( $p < 0,05$ ). Médias com base em 6 repetições.

O aumento no crescimento das plantas com 5 e 10% desses CRs pode estar relacionado com o aumento da capacidade de retenção de água no solo, o melhoramento de sua estrutura e o fornecimento de fontes de N, P, K e MO. Já a diminuição do crescimento para doses mais elevadas de CR provavelmente ocorreu devido à elevação da condutividade elétrica do solo (CE) acima do nível adequado para o desenvolvimento de *L. sativa*. A elevada CE do CR de *A. brasiliensis* foi constatada subsequente (item 2.1), fato que corrobora com a explicação apresentada.

Inadequadas doses de compostos orgânicos utilizadas na fertilização de culturas vegetais e aumento da CE em nível superior ao ideal foram relatados por diversos autores, especialmente quando se trata do composto residual da produção de cogumelos. Em um experimento em vasos, em casa de vegetação, avaliando-se o efeito das concentrações de 5, 10, 15, 25 e 30% de CR (v/v) misturado à turfa – com turfa utilizada como controle – no desenvolvimento de tomate, verificou-se que na primeira colheita, não foi verificada grande

diferença entre o peso das plantas cultivadas com doses de CR de até 20%. Contudo, adições superiores proporcionaram redução no crescimento vegetal. Em outro experimento, na primeira colheita de palha de centeio, houve uma resposta positiva na produtividade com adições de CR equivalentes a 50 t/ha. Porém, para doses mais elevadas, houve um declínio no crescimento, provavelmente devido à elevação da CE (MAHER, 1994).

Desta forma, as proporções de CR a serem aplicadas em cada cultura, assim como a quantidade a ser reaplicada anualmente devem ser adequadamente definidas, a fim de se evitarem problemas de salinidade. Apesar da incorporação antecipada do CR no solo propiciar a redução ou eliminação do efeito negativo da CE, é importante ainda atentar para as conseqüências que estas incorporações poderão ter na poluição de lençóis freáticos e de cursos de água adjacentes, em virtude do excesso sais lixiviados.

No que se refere à possibilidade de substituição da fertilização química (NPK) pela adubação com o CR de *A. brasiliensis* (camada à base de turfa e de solo), verificou-se que a adição de 5 e 10% deste composto podem substituir a adubação NPK, com parâmetros de peso seco superiores e expressivos em nível comercial. Além disso, o apelo da sociedade moderna pela agricultura orgânica contribui de forma positiva para a substituição da fertilização química pela orgânica, mesmo quando as produtividades forem semelhantes.

A Figura 17 apresenta análises de regressão com faixas de confiança, uma para o CR com camada à base de turfa e outra para o CR com camada à base de solo, relacionando a dose do composto no solo e o peso seco aéreo dos espécimes – considerado, entre os parâmetros avaliados, aquele de maior interesse comercial. Estas análises foram realizadas com o intuito de estabelecer um modelo de reação do peso seco aéreo às doses do composto, especialmente para verificar se doses não analisadas, próximas de 5 e 10%, proporcionariam resultados semelhantes.

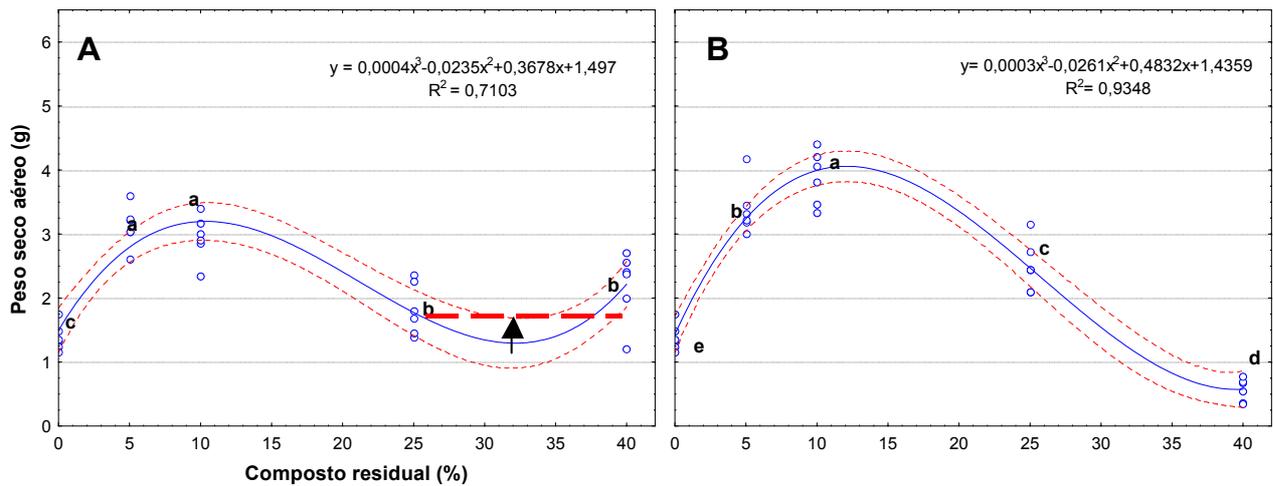


FIGURA 17. Análise de regressão com intervalo de confiança de 95% (pontilhado em vermelho) do peso seco aéreo de *L. sativa* em função do teor de CR de *A. brasiliensis* com camada de cobertura à base de turfa (A) e com à base de solo (B). Comparações (letras minúsculas) realizadas por ANOVA/Newman-Keuls ( $p < 0,05$ ). CV (coeficiente de variação experimental) de comparações em A de 15,85% e em B de 13,87%. Seta indicando mudança do modelo de regressão para modelo linear (tracejado;  $y = \pm 1,8$ ), dentro do intervalo indicado. Análises com base em 6 repetições.

Ambos os modelos seguiram um padrão cúbico, com um incremento acentuado do peso seco até 10%, e um decréscimo a partir deste nível. Contudo, o modelo explicou todo o intervalo avaliado apenas para o CR com camada de cobertura à base de solo (Figura 17B). Para CR com camada de cobertura à base de turfa, o modelo explicou apenas o intervalo de 0 a 25% de CR (Figura 17A). A partir deste valor (25%), ocorreu uma tendência para constância do valor do peso seco (faixa vermelha tracejada;  $y = \pm 1,8$ ).

Com o intuito de melhorar o custo/benefício de aplicação dos CRs, avaliou-se o efeito de doses menores que 5% no peso seco aéreo, de acordo com o modelo utilizado para cada CR (de acordo com a análise de regressão). Verificou que doses menores, em torno de 2,5%, não aparentam ser tão eficientes como adições entre 5 e 10%.

Desta forma, com base no estudo efetuado, seria recomendada para o plantio de alface a aplicação no solo de proporções de 5 a 10% (em peso seco) do CR de *A. brasiliensis*, tanto com camada de cobertura à base de turfa como de solo. Contudo, os CRs normalmente são encontrados úmidos, e sua secagem prévia pode alterar características importantes destes materiais para o condicionamento de solos. Desta forma, considerando a umidade do CR em

torno de 60%, seria recomendada a aplicação de quantidades entre 12,5% e 25% do CR úmido para o cultivo de alface.

Amostra das plantas dos tratamentos com 25% do CR de *A. brasiliensis* e do controle (solo) são apresentadas na Figura 18 podendo-se observar efeitos visuais no crescimento.



FIGURA 18. Aspecto dos exemplares de *L. sativa* cultivados em solo (S), e com 25% de composto residual de *A. brasiliensis* com camada de cobertura à base de turfa (A') e de solo (B'), ao final de 70 dias. A) comparação entre o tratamento S (controle) e A'; B) comparação entre A' e B'.

A Figura 19 apresenta as variações do peso seco total, aéreo e radicular dos espécimes de *L. sativa* em função da dose de CR de *L. edodes*.

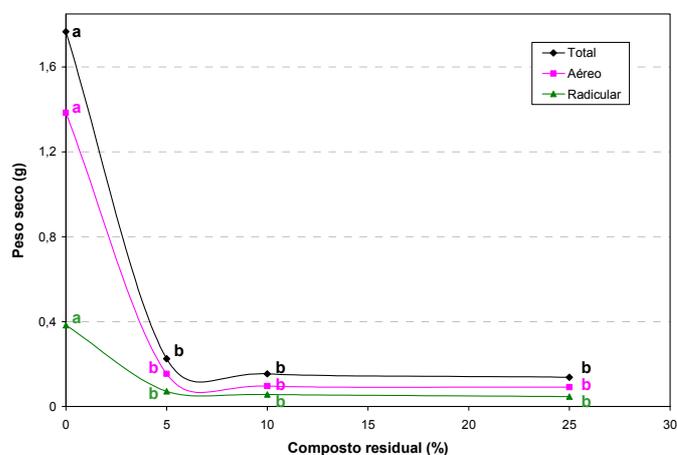


FIGURA 19. Peso seco total, aéreo e radicular de *L. sativa* de acordo com o teor do CR de *L. edodes*. Comparações (letras minúsculas) realizadas por ANOVA/Newman-Keuls ( $p < 0,05$ ); comparações do peso total e aéreo realizados com a raiz quadrada dos valores, em virtude da heterogeneidade de variâncias. Médias com base em 6 repetições.

Houve inibição no crescimento das plantas cultivadas em substrato com CR de *L. edodes* – em relação ao controle (solo) –, observando-se um nanismo acentuado (Figura 20). A ocorrência de plantas raquíticas e nanicas de alface frequentemente está relacionada à deficiência de certos elementos, tais como N, P, K, Mg, Cu e S (SILVA JÚNIOR; SOPRANO, 1997). Devido ao elevado teor de matéria orgânica do CR de *L. edodes* (91%) e imaturidade desse composto, como mencionado (item 1.1.2), ocorreu um aumento da taxa metabólica do solo, com conseqüente depleção/imobilização de nutrientes como fontes de N pela microbiota presente para a degradação da MO, não disponibilizando estes nutrientes para o vegetal e gerando deficiências. Além disso, a concentração inicial de N deste CR foi inferior àquela indicada por Alexander (1994) para compostos orgânicos (item 1.1.2).

Outro fator do substrato com CR de *L. edodes* que pode ter contribuído para a redução do crescimento de *L. sativa* seria o valor de pH entre 8 e 8,5, superior ao pH ideal para a espécie em cultivo (6,0 – 6,8).

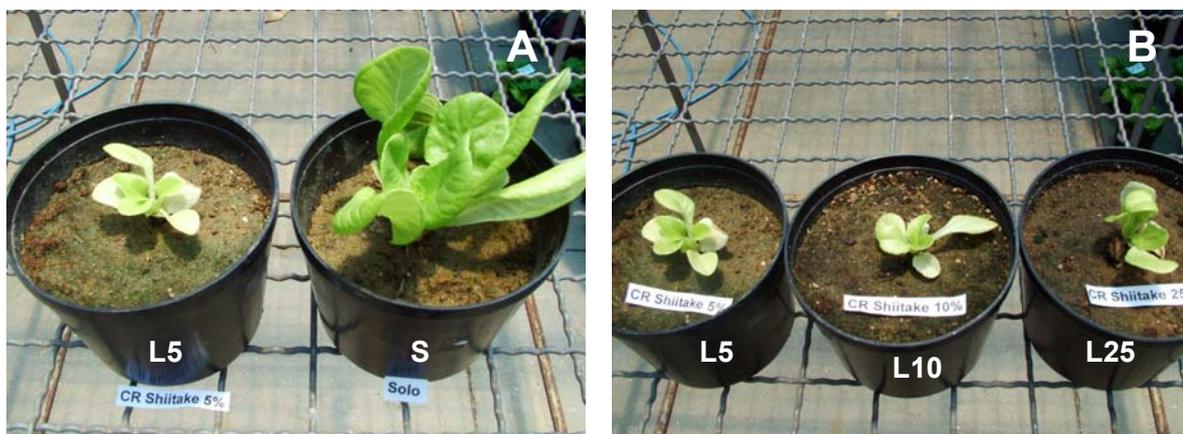


FIGURA 20. Aspecto visual de exemplares de *L. sativa* cultivados em solo (S) e em diferentes quantidades de composto residual de *L. edodes* (L5 = 5%; L10 = 10%; L25 = 25%) ao final de 70 dias. A) caráter inibitório do crescimento com L5; B) inibição semelhante com o aumento da utilização do CR.

Contudo, já foram relatados por produtores de SC bons resultados com a aplicação do CR de *L. edodes* na floricultura, especialmente quando este CR foi apenas disposto na superfície do solo, sem fragmentação dos blocos, pela razão de não ser incorporado e os

nutrientes serem disponibilizados por lixiviação, em condições de baixa liberação. Nos casos de incorporação no solo com resultados satisfatórios, é possível que a dose adicionada por estes produtores tenha sido inferior àquelas do presente experimento, uma vez que adições de 5, 10 e 25% referiam-se ao peso seco, o que, para este material, corresponde a um volume elevado. Desta forma, não se descarta a possibilidade de utilização do CR *L. edodes* como condicionador de solos, uma vez que porcentagens menores podem ser aplicadas com antecedência ao plantio para estabilização, sem efeitos deletérios, com a incorporação de MO na faixa adequada. É ainda possível que a adição complementar de fontes nitrogenadas possam melhorar a eficiência deste composto.

### 1.2.2. Área foliar

A Figura 21 apresenta a área foliar total e área/folha dos espécimes de *L. sativa*, de acordo com a natureza e a dose do CR, em comparação com a adubação química.

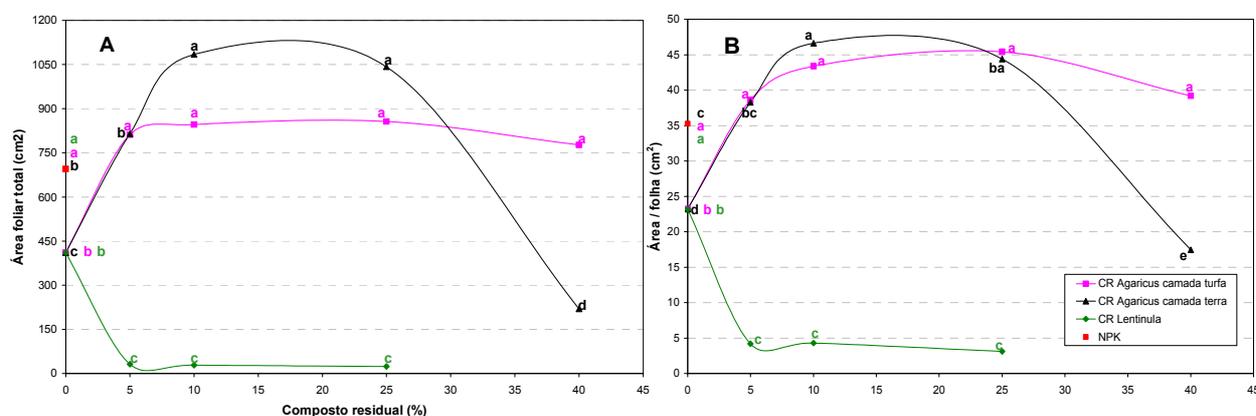


FIGURA 21. Área foliar total (A) e da área/folha (B) de *L. sativa* de acordo com o teor e natureza do CR. Comparações (letras minúsculas com mesmas características) realizadas por ANOVA/Newman-Keuls ( $p < 0,05$ ). Análises com base em 4 repetições. A) CV (coeficiente de variação experimental) de 15,43% para comparações entre tratamentos com CR de *A. brasiliensis* com camada à base de turfa e 11,81% para CR com camada à base de solo; CV de 16,40% para comparações entre tratamentos com CR de *L. edodes*. B) CV de 11,71, 10,40 e 15,58% para os CRs de *A. brasiliensis* com camada à base de turfa e de solo e para o CR de *L. edodes*, respectivamente. Comparações entre os tratamentos com CR de *A. brasiliensis* com camada de turfa, tanto em A como em B, como de *L. edodes* em A realizados com o logaritmo na base 10 dos valores, para homogeneização das variâncias.

Verificou-se que, com o aumento da adição do CR de *A. brasiliensis* com camada de cobertura à base de turfa até 5%, ocorreu um aumento da área foliar total e da área/folha, sendo que doses de até 40% propiciaram resultados semelhantes. O mesmo ocorreu com o CR de *A. brasiliensis* com camada à base de solo. Porém, neste caso, houve uma redução das áreas a partir da dose de 25%. Avaliando o acúmulo de biomassa por área no solo com diferentes concentrações de CR, as plantas cultivadas com 5% e 10% de CR aparentemente apresentaram as maiores relações, em virtude das espécies conterem um maior peso seco e áreas semelhantes ou superiores às demais doses.

Já as áreas foliares dos espécimes adubados com doses de 5, 10 e 25% do CR de *L. edodes* apresentaram o mesmo efeito deletério verificado para o peso seco, provavelmente devido às condições inibitórias já mencionadas.

### **1.2.3. Teor de clorofila e de proteínas solúveis**

No presente trabalho, tanto o teor de clorofila como de proteínas solúveis foliares foram utilizados como parâmetros de qualidade para avaliação dos espécimes de *L. sativa*. A Figura 22 apresenta o teor de clorofila dos espécimes em função da natureza e da concentração de CR no solo.

Houve uma tendência de aumento do teor de clorofila com o aumento da dose de ambos os CRs de *A. brasiliensis*, sendo que todos os tratamentos com a presença deste CR apresentaram teores superiores em comparação ao controle (solo). Especialmente a partir de doses de 10 e 25% destes CRs, a concentração de clorofila tendeu a ser superior àquela encontrada na adubação NPK.

Provavelmente a tendência para o aumento do teor de clorofila das folhas com o aumento da concentração do CR ocorreu em virtude de uma maior concentração de nutrientes, que permitiram uma síntese mais expressiva de constituintes vegetais – contrariamente ao peso seco, inibido por doses elevadas desse CR (devido a outros fatores como CE).

Comparações referentes à intensidade da coloração verde das folhas entre o controle (solo) e dois dos tratamentos com CR de *A. brasiliensis* (25%) pode ser efetuadas na Figura 18.

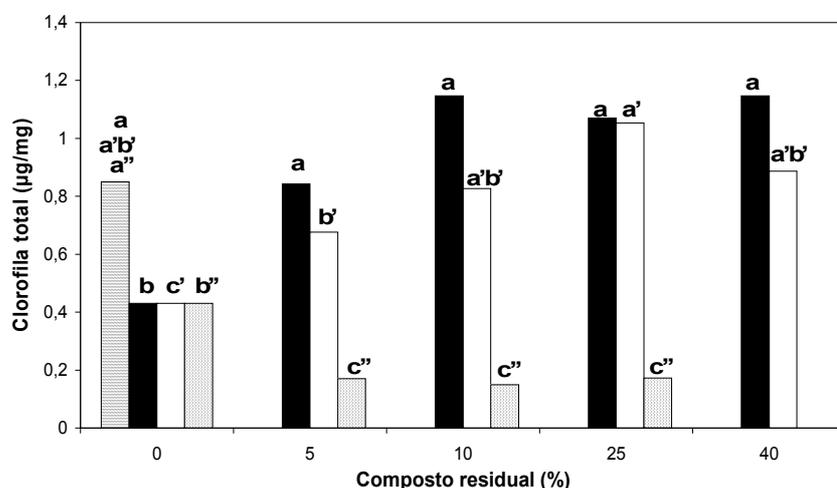


FIGURA 22. Teor de clorofila foliar de *L. sativa* em função da dose de CR da produção de *A. brasiliensis* e de *L. edodes*. Comparações (letras minúsculas com mesmas caracterizações) realizadas por ANOVA/Newman-Keuls ( $p < 0,05$ ). Análises com base em 3 repetições. CV de 13,95% e 20% para comparações entre tratamentos com CR *A. brasiliensis* com camada à base de turfa e de solo, respectivamente, e de 9,11% para os tratamentos com CR *L. edodes*.

Verificou-se uma diminuição do teor de clorofila com o aumento da dose do CR de *L. edodes*, quando comparado com o controle, assim como observado para os parâmetros de peso seco e área foliar, sendo a concentração de clorofila semelhante para os tratamentos com 5, 10 e 25% desse CR. Este resultado pode estar relacionado com a imobilização microbiológica de nutrientes pelo excesso de C e MO, não sendo disponibilizados para a síntese vegetal.

Dentre as possíveis carências nutricionais responsáveis pela sintomatologia observada poderia ser indicada a carência em ferro e em magnésio. O Mg é um elemento essencial na molécula da clorofila, além de atuar em outros mecanismos vegetais, como na ativação enzimática. Sua deficiência gera plantas com alongamento das folhas e estreitamento do limbo, promovendo clorose e proporcionando à planta uma arquitetura ereta e raquiforme. Em geral, as folhas deficientes em Mg são rígidas e quebradiças (SILVA JÚNIOR;

SOPRANO, 1997). Estes sintomas foram detectados nos espécimes de *L. sativa* cultivada com CR de *L. edodes* (Figura 20). Já o sintoma mais típico da deficiência de Fe é exatamente o decréscimo do teor de clorofila, especialmente das folhas novas, provocando seu amarelecimento. Em casos de extrema deficiência, as folhas podem ser completamente brancas, isto é, destituídas de clorofila (MENGEL; KIRKBY, 1982 apud SILVA JÚNIOR; SOPRANO, 1997).

Na Figura 23 é apresentada a variação da concentração de proteínas solúveis de acordo com as doses de CRs, comparativamente ao solo (controle) e à adubação NPK. Para o CR de *L. edodes*, resultados semelhantes foram obtidos para os demais parâmetros, havendo uma diminuição do teor de proteínas em comparação com o controle (solo). Neste caso, a redução na concentração de proteínas pode ser resultado da baixa concentração de N proporcionada pelo CR, da imobilização deste elemento pela microbiota do solo e de outros elementos necessários à síntese protéica, como já mencionado.

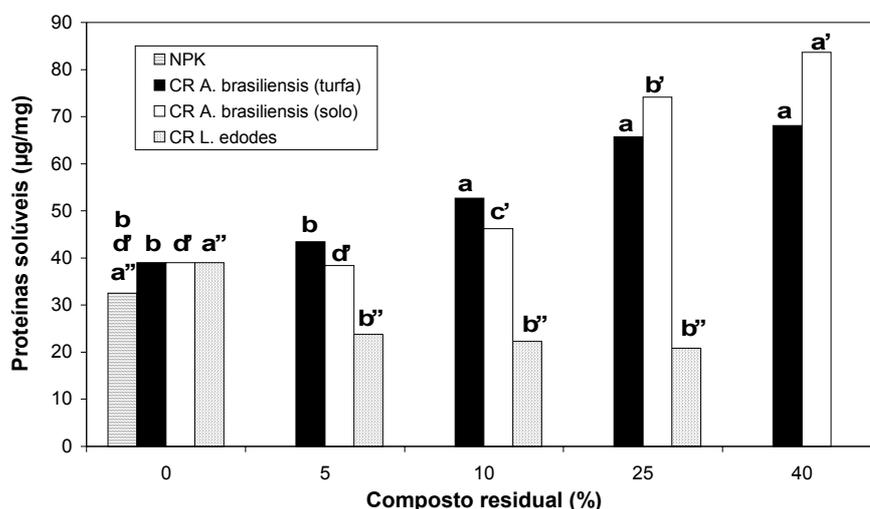


FIGURA 23. Teor de proteínas de *L. sativa* em função da dose de CR da produção de *A. brasiliensis* e de *L. edodes*. Comparações (letras minúsculas com mesmas caracterizações) realizadas por ANOVA/Newman-Keuls ( $p < 0,05$ ). Análises com base em 3 repetições. CV de 10,23% e 7,75% para comparações entre tratamentos com CR de *A. brasiliensis* com camada à base de turfa e de solo, respectivamente, e de 9,11% para os tratamentos com CR de *L. edodes*.

Não houve diferenças significativas no teor de proteínas solúveis na adubação NPK e no solo sem adubação. Entretanto, é importante enfatizar que na adubação química pode haver uma maior concentração de nitratos nas plantas, enquanto que na fertilização com compostos orgânicos, tal como com CR, ocorre um acúmulo de N em formas mais complexas.

Observou-se que, com o aumento da dose do CR de *A. brasiliensis* com camada de cobertura à base de turfa e de solo, houve um aumento (ou tendência de aumento) do teor de proteínas solúveis nas folhas de *L. sativa* – o mesmo ocorrido para a concentração de clorofila. Este resultado reforça o papel deste CR como uma importante fonte de nutrientes, susceptível de melhorar parâmetros de qualidade como teor de clorofila e de proteínas vegetais.

De forma semelhante, em um experimento em campo, a adição de 22,5, 45 e 90 kg/m<sup>2</sup> (55, 110 e 220 t/A) de CR, 90 dias antes do plantio de milho, propiciou um aumento na produtividade, assim como no teor de nitrogênio, tanto dos grãos como da matéria seca do volumoso, na ordem de 1,73, 1,86 e 1,98 vezes, respectivamente, em comparação com o controle (solo sem adubação), o que evidencia um provável aumento no teor de proteínas na planta (WUEST; FAHY; FAHY, 1995).

### **1.3. Tratamentos relevantes**

As Tabelas 16 e 17 apresentam comparações de parâmetros de crescimento e de qualidade de *L. sativa* entre os tratamentos com os melhores resultados de peso seco aéreo, de acordo com o item 1.2.1. Desta forma, foram comparadas as doses de 5% e 10% dos CRs de *A. brasiliensis*, com camada à base de turfa e de solo, assim como o controle e a adubação NPK.

Na Tabela 16 é possível constatar que o CR com camada de cobertura à base de solo (sol) apresentou vantagens em relação ao CR com camada à base de turfa (tur), especialmente em relação ao peso seco aéreo. Contudo, em termos de qualidade vegetal

(clorofila e proteínas) (Tabela 17), o CR com camada à base de turfa tendeu a ser mais eficiente, provavelmente devido a maior concentração de nutrientes, tal como N.

TABELA 16. Comparações entre o solo (controle), adubação química (NPK) e as concentrações mais eficientes dos CRs de *A. brasiliensis*, em relação aos principais parâmetros de crescimento de *L. sativa*.

<b>Tratamento</b>	<b>Peso seco aéreo (g)</b>	<b>Número de folhas/planta</b>	<b>Área foliar total (cm<sup>2</sup>)</b>	<b>Área/folha (cm<sup>2</sup>)</b>
Solo	1,383 ± 0,213 <b>d</b>	17,25 ± 2,22 <b>c</b>	410,419 ± 38,382 <b>c</b>	23,951 ± 2,190 <b>d</b>
NPK	2,282 ± 0,219 <b>c</b>	19,25 ± 1,26 <b>bc</b>	695,225 ± 40,447 <b>b</b>	36,254 ± 3,493 <b>c</b>
CR <i>Agaricus</i> (tur) 5%	3,120 ± 0,328 <b>b</b>	21,00 ± 2,16 <b>ab</b>	811,569 ± 120,361 <b>b</b>	38,523 ± 1,712 <b>bc</b>
CR <i>Agaricus</i> (tur) 10%	2,943 ± 0,355 <b>b</b>	19,50 ± 1,29 <b>bc</b>	846,253 ± 65,551 <b>b</b>	43,400 ± 1,861 <b>ab</b>
CR <i>Agaricus</i> (sol) 5%	3,392 ± 0,407 <b>b</b>	20,75 ± 0,50 <b>ab</b>	814,540 ± 130,631 <b>b</b>	39,224 ± 5,909 <b>bc</b>
C.R <i>Agaricus</i> (sol) 10%	3,878 ± 0,419 <b>a</b>	23,00 ± 1,83 <b>a</b>	1083,955 ± 78,532 <b>a</b>	47,173 ± 1,774 <b>a</b>
<b>CV<sup>1</sup></b>	11,73 %	8,22 %	11,16 %	8,40 %

<sup>1</sup>Coeficiente de variação experimental.

Comparações: ANOVA/Teste de Newman-Keuls (p<0,05).

CR *Agaricus* (tur) – Composto residual de *A. brasiliensis* com camada de cobertura à base de turfa.

CR *Agaricus* (sol) – Composto residual de *A. brasiliensis* com camada de cobertura à base de solo.

TABELA 17. Comparações entre o solo (controle), adubação química (NPK) e as concentrações mais eficientes dos CRs de *A. brasiliensis*, em relação ao teor de clorofila e de proteínas solúveis foliares de *L. sativa*.

<b>Tratamento</b>	<b>Clorofila total (µg/mg)</b>	<b>Proteínas solúveis (µg/mg)</b>
Solo	0,430 ± 0,056 <b>c</b>	39,03 ± 2,84 <b>bc</b>
NPK	0,850 ± 0,122 <b>b</b>	32,55 ± 2,09 <b>c</b>
CR <i>Agaricus</i> (tur) 5%	0,843 ± 0,051 <b>b</b>	43,43 ± 8,03 <b>bc</b>
CR <i>Agaricus</i> (tur) 10%	1,147 ± 0,211 <b>a</b>	56,98 ± 7,85 <b>a</b>
CR <i>Agaricus</i> (sol) 5%	0,677 ± 0,091 <b>b</b>	38,38 ± 1,97 <b>bc</b>
CR <i>Agaricus</i> (sol) 10%	0,827 ± 0,055 <b>b</b>	48,69 ± 6,93 <b>ba</b>
<b>CV<sup>1</sup></b>	14,17 %	13,05 %

<sup>1</sup>Coeficiente de variação experimental.

Comparações: ANOVA/Teste de Newman-Keuls (p<0,05).

CR *Agaricus* (tur) – Composto residual de *A. brasiliensis* com camada de cobertura à base de turfa.

CR *Agaricus* (sol) – Composto residual de *A. brasiliensis* com camada de cobertura à base de solo.

Apesar de não apresentar um teor nutricional elevado como o CR à base de turfa (Tabela 9 – item 1.1.3), os melhores resultados de parâmetros de crescimento, com exceção daqueles relacionados à qualidade, foram detectados no tratamento com 10% do CR com

camada à base de solo. Este resultado provavelmente está relacionado com a CE mais propícia ao desenvolvimento vegetal, assim como pelas características condicionadoras de solos deste CR.

Em geral, não houve diferenças relevantes entre as doses de 5 e 10% (peso seco) dos dois CRs de *A. brasiliensis*, inferindo-se que a aplicação de ambas as doses em campo seriam as mais adequadas para o desenvolvimento de alface. A utilização destes CRs na fertilização orgânica foi eficiente, substituindo com vantagem a adubação química.

#### **1.4. Efeito potencializador com NPK**

Como mostram as Tabelas 18 e 19, não foi verificado efeito potencializador do tratamento com 10% de CR de *A. brasiliensis* com camada à base de turfa pela adição de fertilizante químico. Diversos autores apontam que o CR pode ser uma fonte ineficiente de elementos nutricionais, especialmente de N, e que o fornecimento destes elementos, através de fontes artificiais, poderia suprir as deficiências. Contudo, para a adição de 10% do CR de *A. brasiliensis* com camada de turfa, os resultados dos parâmetros de crescimento de alface como de sua qualidade levam a conclusão de que nutrientes como N podem estar sendo adequadamente fornecidos, sem necessidade de suplementação. Em suma, as respostas de *L. sativa* ao tratamento com 10% deste CR e ao tratamento com 10% deste CR + NPK foram semelhantes.

TABELA 18. Comparações entre o solo (controle), adubação química (NPK) e o efeito da adubação química conjunta com 10% do CR de *A. brasiliensis* com camada à base de turfa, em relação aos principais parâmetros de crescimento de *L. sativa*.

<b>Tratamento</b>	<b>Peso seco aéreo (g)</b>	<b>Número de folhas/planta</b>	<b>Área foliar total (cm<sup>2</sup>)</b>	<b>Área/folha (cm<sup>2</sup>)</b>
Solo	1,383 ± 0,213 <b>c</b>	17,25 ± 2,22 <b>a</b>	410,419 ± 38,382 <b>c</b>	23,951 ± 2,190 <b>c</b>
NPK	2,282 ± 0,219 <b>b</b>	19,25 ± 1,26 <b>a</b>	695,225 ± 40,447 <b>b</b>	36,254 ± 3,493 <b>b</b>
C.R <i>Agaricus</i> (tur) 10%	2,943 ± 0,355 <b>a</b>	19,50 ± 1,29 <b>a</b>	846,253 ± 65,551 <b>ab</b>	43,400 ± 1,861 <b>a</b>
C.R <i>Agaricus</i> (tur) 10% + NPK	2,785 ± 0,307 <b>a</b>	19,00 ± 1,63 <b>a</b>	783,646 ± 95,642 <b>a</b>	41,323 ± 4,666 <b>a</b>
<b>CV<sup>1</sup></b>	11,93 %	5,44 %	9,41 %	8,97 %

<sup>1</sup>Coefficiente de variação experimental.  
 Comparações: ANOVA/Teste de Newman-Keuls (p<0,05).

TABELA 19. Comparações entre o solo (controle), adubação química (NPK) e os tratamentos com 10% do CR de *A. brasiliensis* com camada à base de turfa e ao tratamento semelhante com adição de NPK, em relação ao teor de clorofila e de proteínas solúveis foliares de *L. sativa*.

<b>Tratamento</b>	<b>Clorofila total (µg/mg)</b>	<b>Proteínas solúveis (µg/mg)</b>
Solo	0,430 ± 0,056 <b>b</b>	39,03 ± 2,84 <b>b</b>
NPK	0,850 ± 0,122 <b>a</b>	32,55 ± 2,09 <b>b</b>
C.R <i>Agaricus</i> (tur) 10%	1,147 ± 0,211 <b>a</b>	56,98 ± 7,85 <b>a</b>
C.R <i>Agaricus</i> (tur) 10% + NPK	1,000 ± 0,118 <b>a</b>	49,43 ± 5,00 <b>a</b>
<b>CV<sup>1</sup></b>	16,12 %	11,18 %

<sup>1</sup>Coefficiente de variação experimental.  
 Comparações: ANOVA/Teste de Newman-Keuls (p<0,05), com base em 3 repetições.

## 2. Caracterização dos CRs para fins de biorremediação de solos

### 2.1. Características físicas e químicas

Para caracterização dos CRs com fins de biorremediação, objetivo complementar à fertilização, avaliaram-se aspectos físicos e químicos destes compostos, assim como de dois solos distintos, como apresentado na Tabela 20. A caracterização dos solos foi efetuada objetivando comparar as possíveis diferenças entre estes solos e os CRs, e de que forma a

adição dos CRs poderia modificar sua estrutura visando potencializar a biorremediação de xenobióticos.

Avaliando características de pH, verificou-se que os materiais seguiram os padrões já descritos anteriormente (item 1.1.1). Os valores de pH dos solos também estavam dentro da faixa de normalidade, sendo mais ácido na área de cultivo de mandioca do que na área de gramado. Verifica-se que para a adição do CR de *L. edodes* com o intuito de fertilização, há necessidade de correção prévia do pH.

TABELA 20. Umidade, pH e condutividade elétrica do composto residual (CR) de *A. brasiliensis*, *P. ostreatus* e *L. edodes*, comparativamente a dois solos distintos.

Material	Umidade (%)	pH	Condutividade elétrica – CE (mS/cm)	
			Material úmido	Material seco
Solo de gramado <sup>1</sup>	25,80 ± 0,69	6,94 ± 0,09	0,027 ± 0,002	0,070 ± 0,002
Solo de cultivo <sup>2</sup>	11,05 ± 0,60	5,74 ± 0,06	0,013 ± 0,003	0,033 ± 0,003
CR de <i>A. brasiliensis</i>	60,91 ± 1,69	7,83 ± 0,10	3,623 ± 0,123	3,423 ± 0,095
CR de <i>P. ostreatus</i>	83,06 ± 1,01	6,00 ± 0,24	0,226 ± 0,014	0,345 ± 0,018
CR de <i>L. edodes</i>	76,19 ± 0,11	3,56 ± 0,02	1,694 ± 0,010	2,540 ± 0,125

<sup>1</sup>Solo de área com predomínio de gramíneas; <sup>2</sup>solo de área de cultivo de mandioca (*Manihot* sp.).

Outra característica importante dos CRs analisada, em termos de seu potencial no condicionamento de solos, foi o teor de sais solúveis. O baixo ou o elevado teor de sais pode ser prejudicial para o desenvolvimento vegetal. A condutividade elétrica do CR de *A. brasiliensis* e de *L. edodes*, baseada na matéria seca triturada (extração 1:5, v/v), foi, respectivamente, de 3,42 e 2,54 mS/cm, como apresentado na Tabela 20. De acordo com Warncke e Krauskopf (1983), para esta mesma proporção de extração (1:5, v/v), estes valores são demasiadamente elevados para o desenvolvimento vegetal, prejudicando e inibindo seu crescimento (Anexo 3). Já a CE do CR de *P. ostreatus* (0,35 mS/cm) encontrou-se dentro da faixa desejável, entre 0,35 e 0,64 mS/cm.

Segundo Pardo, Juan e Pardo (2003), a turfa preta, normalmente utilizada com sucesso no condicionamento e na fertilização de solos, apresenta um valor de CE em torno de 1,75 mS/cm, para uma extração 1:6 (v/v), o que contradiz os parâmetros definidos por Warncke e Krauskopf (1983) (Anexo 3). Para uma mistura de turfa com CR, nas proporções de 5, 10, 20, 25 e 30% de CR, a condutividade elétrica foi de 1,2, 1,7, 3,6, 4,6 e 4,8mS/cm, respectivamente, para uma extração 1:1,5 (v/v) (MAHER 1994).

De acordo com Alexander (1994), a faixa de concentração ideal de sais solúveis (CE) de compostos orgânicos deve estar entre 0,35 e 0,64 dS/m (ou mS/cm) para extratos 1:5 (v/v). Sharma e Kilpatrick (2000) apontam a CE de um composto formulado para *A. bisporus* entre 0,25 a 0,31 mS/cm (extração: 1:5, p/v). Desta forma, considerando-se apenas a CE obtida no presente trabalho, os CRs de *A. brasiliensis* e de *L. edodes* deveriam ser aplicados no solo na proporção de 10% ou valor inferior para sucesso no cultivo vegetal.

A elevada CE do CR de *A. brasiliensis* e de *L. edodes* pode estar relacionada à forma de suplementação dos compostos para o cultivo (natureza e quantidade), assim como pela adição excessiva de corretivos. O composto do cultivo de *P. ostreatus*, por sua vez, foi formulado sem suplementos e corretivos, e sua CE permaneceu dentro da faixa definida como ideal por Warncke e Krauskopf (1983).

Vale lembrar que alguns compostos orgânicos com elevada CE podem ser utilizados. Contudo, deve-se ter a preocupação de incorporar uma menor quantidade do composto no solo (WATSON, 2003), uma vez que sua salinidade excessiva pode afetar a produtividade agrícola e, eventualmente, causar a degradação do solo (CASTRO, 2004).

Nos CRs em geral, a elevada salinidade inicial é ocasionada normalmente pelo excesso de potássio solúvel. A maturação deste composto no ambiente antes de sua utilização ou sua incorporação no solo com antecedência proporciona a redução da condutividade em virtude da lixiviação de íons. Contudo, esta ação pode ocasionar problemas ambientais, como

contaminação das águas subterrâneas pelo excesso de nutrientes solúveis. Desta forma, a melhor estratégia seria a incorporação no solo de CR em quantidade adequada, de forma a prover os nutrientes necessários aos vegetais, sem promover contaminação ambiental.

## **2.2. Liberação de CO<sub>2</sub> (taxa de respiração microbiana)**

A Figura 24 expressa a evolução de CO<sub>2</sub> dos solos de cultivo de mandioca e de gramado, em comparação com a dos CRs de *A. brasiliensis*, *P. ostreatus* e *L. edodes*. Verificou-se que a liberação foi consideravelmente superior para os CRs (200-800µg de C-CO<sub>2</sub>/g de CR) do que nos solos (faixa de 20µg C-CO<sub>2</sub>/g de solo). Isto evidencia que a incorporação do CR no solo pode incrementar a atividade metabólica microbiana. Comparativamente, N'Dayegamiye e Isfan (1991) verificaram taxas de liberação de CO<sub>2</sub> variando de 50-450µg de C-CO<sub>2</sub>/g de material seco, ao longo de uma compostagem de 36 meses, de dois compostos orgânicos, um formulado com turfa e outro com serragem, ambos com suplementação de um terço em volume de esterco de gado.

É importante ressaltar que grande parte do CO<sub>2</sub> liberado dos CRs é oriunda da respiração do micélio do fungo de cultivo. No CR de *A. brasiliensis*, verificou-se que a liberação de CO<sub>2</sub> caiu sensivelmente ao longo dos 10 dias, provavelmente devido à inativação do fungo, o qual é sabidamente sensível ao cisalhamento – que foi realizado durante a homogeneização do composto com sua respectiva camada de cobertura. Já a liberação de CO<sub>2</sub> por *P. ostreatus* se manteve elevada ao longo do tempo, mas com consideráveis variações, provavelmente devido à natureza do composto. *L. edodes*, por sua vez, apresentou taxas de respiração elevadas, as quais se mantiveram durante o período de avaliação, provavelmente pela natureza do material, especialmente por apresentar um elevado teor de matéria orgânica ainda não decomposta.

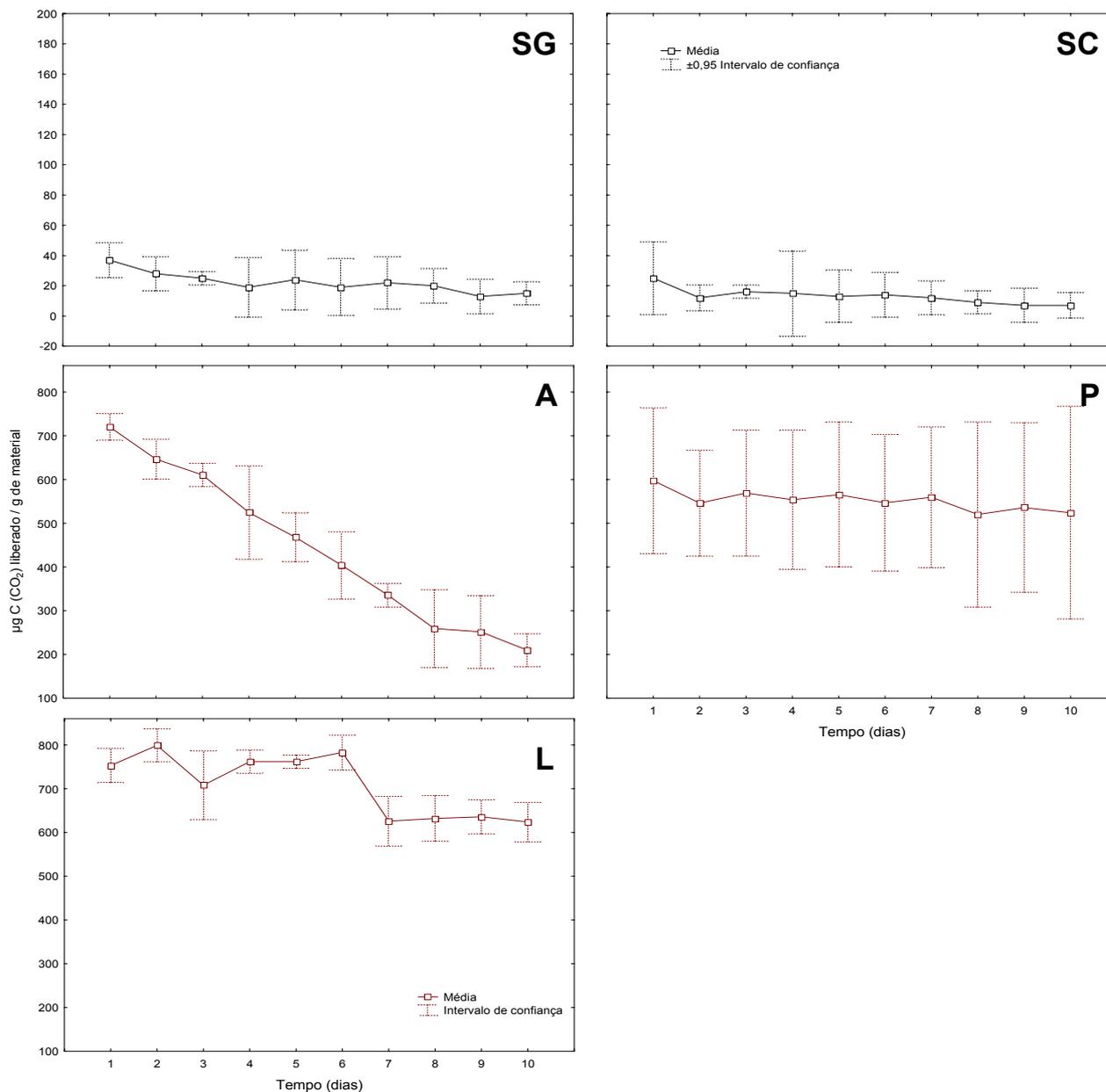


FIGURA 24. Carbono (CO<sub>2</sub>) liberado em µg/g de solo – solo de gramado (SG) e solo de cultura de mandioca (SC) – ou de CR de *A. brasiliensis* (A), *P. ostreatus* (P) e *L. edodes* (L). Análises com base em 3 repetições.

De acordo com os resultados, a adição dos CRs avaliados ao solo provavelmente incrementará a taxa metabólica microbiana deste solo, não apenas pela atividade do fungo presente no CR, como pela estimulação da microbiota nativa, através do fornecimento de nutrientes.

Em termos de biorremediação de solos, quanto maior a taxa metabólica dos microorganismos presentes no solo, maior a probabilidade de degradação dos xenobióticos.

Na adição de CRs, a elevada concentração de nutrientes e de matéria orgânica ainda não decomposta favorece o aumento da respiração microbiana, assim como a biomassa fúngica presente. Contudo, em termos de fertilização, quanto menor a taxa metabólica do composto orgânico, mais propício este será para ser aplicado, uma vez que o material pode ser considerado mais estável. De acordo com Woods End Research Laboratory (2000), a taxa de respiração microbiana (evolução de CO<sub>2</sub>) constitui um dos parâmetros para se avaliar a maturidade de um composto.

De acordo com Levanon e Danai (1995), recomenda-se a modificação de características físicas e químicas do CR através de sua maturação no ambiente (“aging”) – recompostagem espontânea – para sua utilização como fertilizante. Neste processo, ocorre uma maior estabilização do material, com diminuição do teor de nitrogênio, da matéria orgânica e da CE, e um aumento do teor de cinzas. Contudo, se o propósito é a utilização em processos de descontaminação de solos e de águas, é recomendado utilizar o CR “fresco”, sem maturação, porque neste estágio o CR deverá conter o máximo teor de MO, a qual aumenta a adsorção de poluentes e ativa a biomassa fúngica e microbiana na biodegradação de compostos orgânicos.

Desta forma, para a utilização do CR em uma ação integrada de fertilização e biorremediação de solos, seria recomendada sua aplicação no solo antes do plantio vegetal, período em que o CR deverá incrementar a atividade microbiana, estimulando a biorremediação, além de adquirir maior estabilidade e degradação, com uma maior liberação e disponibilização de nutrientes para os vegetais que serão posteriormente cultivados.

### **2.3. Enumeração de microorganismos**

A Tabela 21 apresenta a enumeração de microorganismos – em termos de bactérias e fungos mesófilos e de bactérias termófilas – do CR de *A. brasiliensis*, *P. ostreatus* e *L. edodes*, assim como dos dois solos selecionados.

Entre os CRs, evidenciou-se um maior número de bactérias mesófilas no CR de *L. edodes*, de bactérias termófilas no CR de *A. brasiliensis* e de fungos mesófilos no CR de *P. ostreatus* (Figura 25).

TABELA 21. Enumeração de microorganismos por grama de composto residual (CR) da produção de *A. brasiliensis*, *P. ostreatus* e *L. edodes*, e de dois solos distintos utilizados na caracterização.

Material	Microorganismos (UFC <sup>1</sup> /g)		
	Bactérias mesófilas	Bactérias termófilas	Fungos mesófilos
Solo de gramado	1,4.10 <sup>6</sup> c	5,0.10 <sup>4</sup> c	8,5.10 <sup>2</sup> d
Solo de cultivo <sup>2</sup>	1,7.10 <sup>6</sup> c	3,3.10 <sup>5</sup> b	3,4.10 <sup>3</sup> c
CR de <i>A. brasiliensis</i>	4,1.10 <sup>7</sup> b	3,3.10 <sup>6</sup> a	2,9.10 <sup>3</sup> c
CR de <i>P. ostreatus</i>	5,4.10 <sup>7</sup> b	2,7.10 <sup>5</sup> b	7,2.10 <sup>5</sup> a
CR de <i>L. edodes</i>	7,5.10 <sup>8</sup> a	3,7.10 <sup>6</sup> a	2,0.10 <sup>4</sup> b

<sup>1</sup>Unidades formadoras de colônias, <sup>2</sup>Cultivo de mandioca (*Manihot* sp.)

Comparações: ANOVA/Teste de Tukey (p<0,05) utilizando-se o logaritmo dos valores na base 10, devido heterogeneidade de variâncias, com base em 3 repetições.

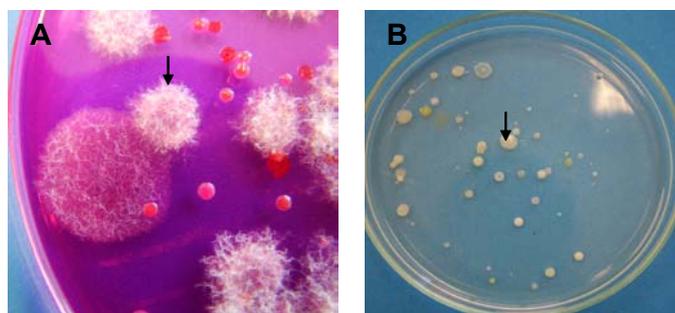


FIGURA 25. Unidades formadoras de colônias (UFCs) de fungos mesófilos em meio Martin (A) e de bactérias mesófilas em meio Ágar-Nutriente (B), obtidas do composto residual de *P. ostreatus*. Setas indicando UFCs.

Em praticamente todos os casos, verificou-se que o número de UFCs nos CRs foi superior ao número encontrado nos solos, inclusive no solo de cultivo, no qual práticas de fertilizações, químicas e/ou orgânicas, provavelmente já haviam sido realizadas. Fica assim evidenciado o potencial do CR em aumentar o número ou mesmo a variedade de microorganismos no solo, situação de promoção da biorremediação de xenobióticos, por contribuir para o desenvolvimento de comunidades microbianas mais complexas e favorecer

processos de cometabolismo. Vale ressaltar que o CR não apenas pode adicionar microorganismos ao solo como favorecer a multiplicação da microbiota nativa, que se tornaria mais numerosa e com uma maior taxa metabólica, pelo incremento de MO e de nutrientes proporcionada pela incorporação do CR.

Gupta e Baummer III (1996), por exemplo, verificaram que o uso de “cama” de frango no solo incrementa a degradação de atrazina em duas vezes em relação ao solo sem adição do material, mostrando que os microorganismos presentes neste material, assim como seus nutrientes, estimularam a degradação do herbicida no solo. Os autores também fazem referência a resultados semelhantes com esterco de bovinos e lodo de esgoto.

O CR apresenta um maior número de microorganismos em comparação com o composto inicial, utilizado no cultivo. Sharma, Furlan e Lyons (1999) verificaram para o CR de *A. brunnescens* aproximadamente  $2,4 \cdot 10^{11}$  UFCs de bactérias por grama de CR, enquanto que o composto inicial, utilizado para cultivo, apresentava  $4,16 \cdot 10^9$ . N'Dayegamiye e Isfan (1991), por sua vez, verificaram a presença máxima de  $2,7 \cdot 10^7$  UFC de bactérias e  $6,4 \cdot 10^5$  UFC de fungos por grama de um composto à base de turfa e esterco de gado (2:1, v/v), compostado durante 6 meses. Comparativamente, o número de células bacterianas e fúngicas por grama de CR no presente experimento foi inferior ao dos materiais citados, o que não invalida seu potencial no incremento de microorganismos importantes no solo.

#### **2.4. Avaliação da atividade da enzima lacase**

Após a produção de cogumelos, o CR não contém apenas um elevado número e uma elevada diversidade de microorganismos, como também uma ampla faixa de enzimas extracelulares produzidas com a finalidade de degradação do substrato (BALL; JACKSON, 1995). Desta forma, caso o CR seja adequadamente condicionado/armazenado, pode representar uma fonte de diversas enzimas para utilização em processos biotecnológicos. Dentre as enzimas de interesse em processos de biorremediação, estão as enzimas lignolíticas

como a lacase, responsável pela degradação de compostos fenólicos e de diversos xenobióticos.

Na Figura 26 é apresentada a atividade da enzima lacase, ao longo de 60 dias de armazenagem, no CR de *A. brasiliensis*, *P. ostreatus* e *L. edodes*. A atividade de lacase no solo não é apresentada, em virtude de não ter sido detectada.

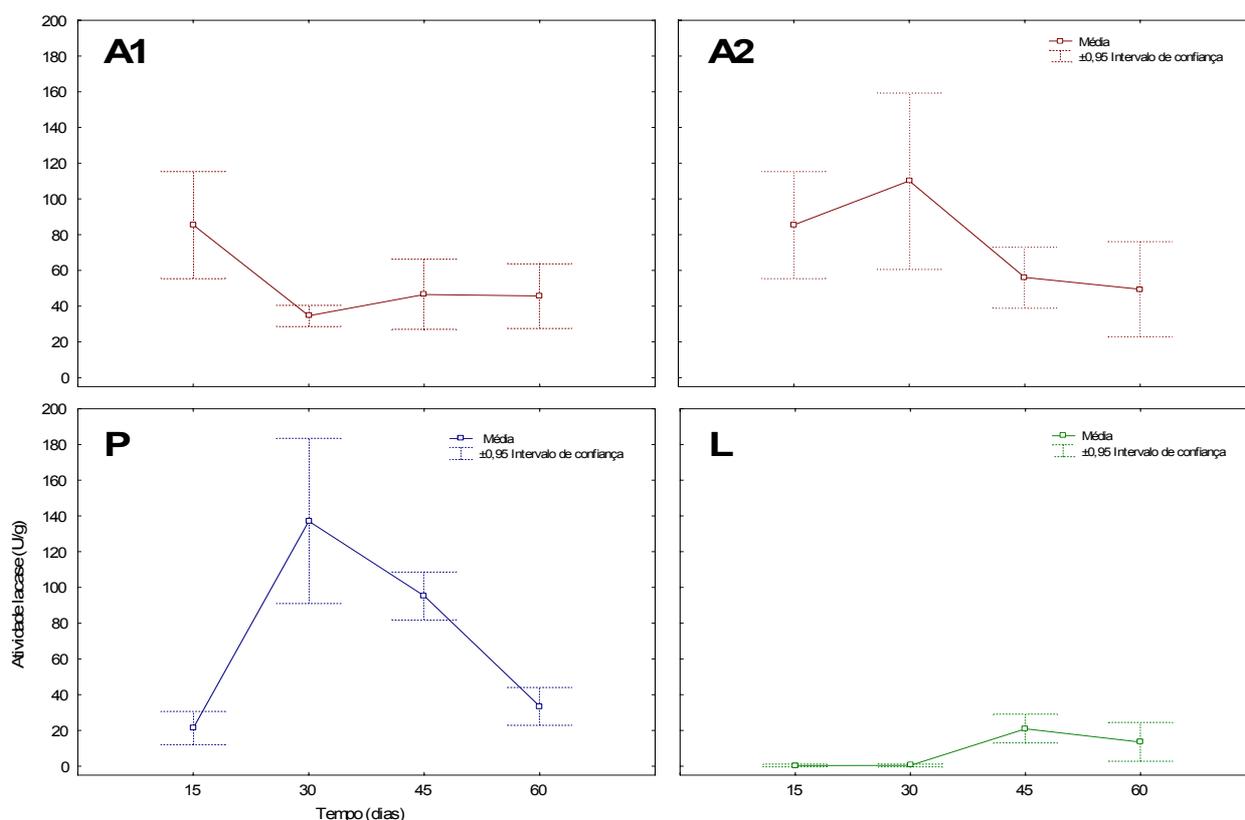


FIGURA 26. Atividade enzimática da lacase ao longo do tempo no CR de *A. brasiliensis* com homogeneização acentuada (A1) e pouca homogeneização (A2), e atividade no CR de *P. ostreatus* (P) e de *L. edodes* (L). Médias com base em 3 repetições.

Verificou-se uma diminuição da atividade da enzima no CR de *A. brasiliensis* com a homogeneização acentuada (A1), após os primeiros 15 dias, a qual tendeu a permanecer constante até os 60 dias. Contudo, no CR de *A. brasiliensis* com pouca homogeneização (A2), esta redução foi menor, ocorrendo um aumento da atividade entre o 15<sup>o</sup> e o 30<sup>o</sup> dia, com posterior redução. Este resultado evidenciou que, quando se objetiva o armazenamento deste CR para fins de biorremediação de solos, quanto maior o tempo de permanência do CR sob

condições semelhantes às de cultivo, com homogeneização apenas no período antecedente à aplicação, maior será a atividade das enzimas fúngicas, especialmente àquelas envolvidas no processo de detoxificação. No caso do CR de *A. brasiliensis*, fungo sensível à fragmentação micelial, a homogeneização inicia um processo de perecimento micelial do fungo, diminuindo assim a produção de enzimas lignolíticas.

A atividade da lacase no CR de *A. brasiliensis* variou entre 25 e 100 U/g ( $\mu\text{M}/\text{min}$  por grama de CR). Comparativamente, Ball e Jackson (1995) verificaram, para o CR de *A. brunnescens* (= *A. bisporus*) atividades baixas de enzimas lignolíticas, na faixa de 50-70nmol/min por grama de CR.

Avaliando-se a atividade da lacase no CR de *P. ostreatus*, verificou-se um aumento da mesma entre o 15º e o 30º dia, com subsequente diminuição. Esta observação sugere que a homogeneização deste CR não prejudicou de forma acentuada este fungo. Contudo, a atividade neste CR poderia estar sendo propiciada por outras espécies fúngicas, decorrente de estágios ecológicos sucessionais. Em suma, a atividade variou de 20 a 140 U/g.

A atividade da lacase do CR de *L. edodes* foi relativamente baixa em comparação com o CR de *A. brasiliensis* e de *P. ostreatus*, não sendo detectada inicialmente entre o 15º e o 30º dia. A maior atividade verificada foi de aproximadamente 20 U/g. Este fato pode estar relacionado com a ordem cronológica da produção de enzimas por espécie fúngica (influenciada pelo meio de cultura ou mesmo regulação gênica), sendo que, em outro momento do cultivo ou em outras condições, o fungo poderia apresentar uma maior atividade de lacase. Mata e Savoie (1998), por exemplo, verificaram uma elevação na atividade da lacase no início do cultivo de seis estirpes de *L. edodes*, com baixa ainda durante o crescimento vegetativo, que se manteve no período de frutificação e após a produção.

*L. edodes* é uma espécie conhecida por produzir quantidades consideráveis de lacase e de outras enzimas lignolíticas. Contudo, testes preliminares com a estirpe utilizada

nos experimentos, cultivada em meio de cultura BDA durante 30 dias, resultaram em atividades nulas ou baixas. É possível que esta estirpe apresente baixa produção de lacase. Silva, Machuca e Milagres (2005a), por exemplo, ao avaliarem a atividade da lacase de nove estirpes de *L. edodes*, verificaram que algumas não a produziam a enzima (não verificada a atividade), enquanto que outras apresentaram atividades elevadas. A variação na atividade enzimática de acordo com a estirpe de *L. edodes* também já foi verificada para a atividade específica da enzima Mn-peroxidase, sendo que as estirpes apresentaram variações entre si, mesmo cultivadas sob as mesmas condições – em resíduo de eucalipto suplementado com farelo de soja (SILVA; MACHUCA; MILAGRES, 2005b).

Apesar da atividade da lacase no CR de *L. edodes* – do presente trabalho – ser baixa, testes paralelos preliminares verificaram atividade elevada para a enzima Mn-peroxidase. Desta forma, este CR apresenta perspectivas de aplicação em processos de biorremediação, uma vez que a lacase não é a única e mais eficiente enzima envolvida nestes processos. Além disso, diversos trabalhos já relataram resultados promissores com a utilização do CR de *L. edodes* na detoxificação de poluentes, como a degradação de até 60% de pentaclorofenol em solo, após 21 dias (OKEKE et al., 1993).

### **3. Avaliação da biotransformação de atrazina “in vitro” por *A. brasiliensis*, *L. edodes* e *P. ostreatus***

#### **3.1. Avaliação da tolerância de *A. brasiliensis*, *L. edodes* e *P. ostreatus* às diferentes concentrações de atrazina em meio BDA**

Na Figura 27 são apresentadas curvas de crescimento de *A. brasiliensis*, *P. ostreatus* e *L. edodes* em meio BDA com doses crescentes de atrazina, objetivando avaliar a tolerância ao herbicida.

*L. edodes* foi a única espécie que apresentou um crescimento semelhante em todas as concentrações de atrazina, sendo, portanto, a mais tolerante. As demais apresentaram um menor crescimento (ou tendência) com o aumento da concentração, especialmente para as duas concentrações mais elevadas (25 e 50 µg/mL), sendo conseqüentemente mais sensíveis. Contudo, todas as espécies foram tolerantes às doses de atrazina avaliadas, crescendo no meio, fato que indica o potencial para a aplicação do CR miceliado destas espécies em solos com este herbicida, em estratégias de biorremediação. É importante ressaltar que a tolerância pode ocorrer mesmo quando não ocorre crescimento, mas quando se verifica a sobrevivência micelial.

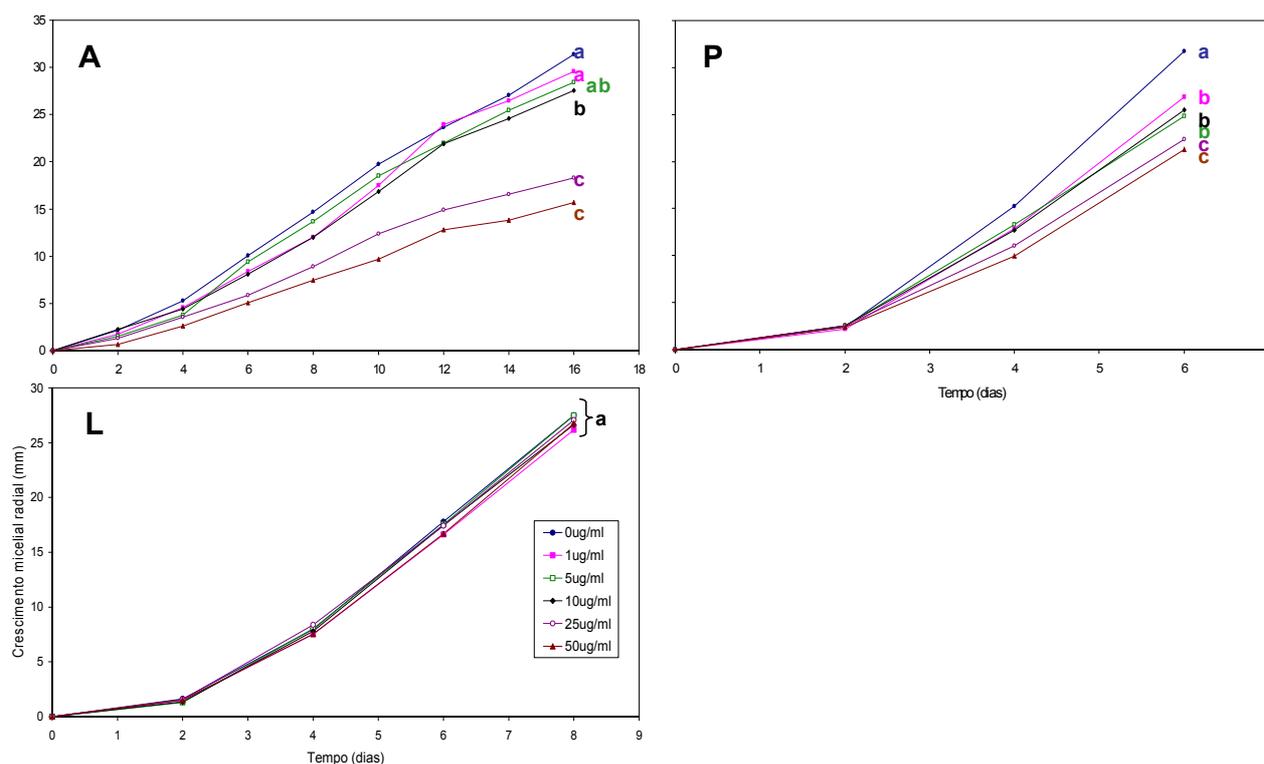


FIGURA 27. Crescimento micelial radial de *A. brasiliensis* (A), *P. ostreatus* (P) e *L. edodes* (L) em função da concentração de atrazina em meio BDA. Comparações do crescimento micelial final para uma mesma espécie fúngica utilizando-se ANOVA/Tukey ( $p < 0,05$ ). Médias seguidas com a mesma letra não diferem significativamente entre si, sendo  $a > b > c$ . Médias baseadas em 4 repetições (placas).

Na Figura 28 são observadas diferenças visuais de crescimento micelial, verificadas no experimento de tolerância – em A é evidenciado a inibição do crescimento de *A. brasiliensis* com o aumento da concentração de atrazina.

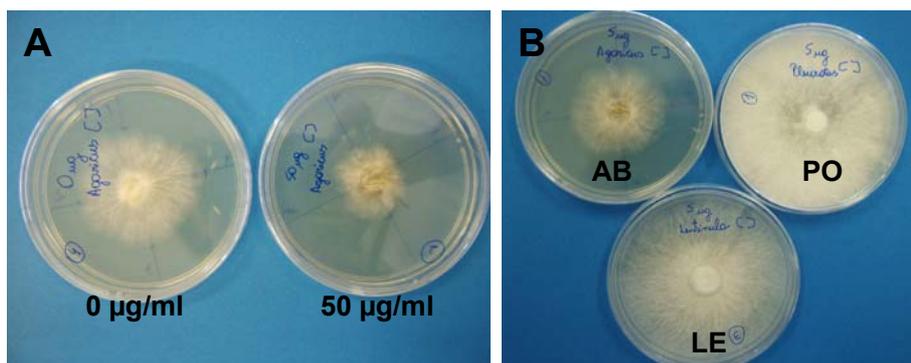


FIGURA 28. Crescimento de *A. brasiliensis* em meio BDA com 0 e 50µg/mL de atrazina (A) e crescimento micelial de *A. brasiliensis* (AB), *L. edodes* (LE) e *P. ostreatus* (PO), em meio com 5µg/mL de atrazina (B). Culturas com 10 dias, incubadas a 24°C.

Em função dos resultados obtidos neste experimento, foi selecionada a concentração de 10µg/mL de atrazina para o experimento de biotransformação, por ser uma concentração intermediária e cujo crescimento das três espécies fúngicas testadas ocorreu de forma satisfatória.

### 3.2. Atividade da lacase em função da concentração de atrazina no experimento de tolerância

Como apresentado na Figura 29, não houve indução da produção/atividade da lacase com o aumento da concentração de atrazina no meio, para os três fungos avaliados (*A. brasiliensis*, *P. ostreatus* e *L. edodes*), ao final do 15<sup>o</sup> e 30<sup>o</sup> dia de cultivo.

A atividade da lacase foi influenciada tanto pelo estágio de desenvolvimento do fungo como pela espécie (ou mesmo estirpe). *A. brasiliensis* manteve uma atividade elevada ao longo do tempo, enquanto que a atividade de *P. ostreatus* foi elevada no 15<sup>o</sup> dia, e sensivelmente inferior no 30<sup>o</sup> dia de cultivo. *L. edodes* apresentou uma atividade comparativamente baixa (quase desprezível) da lacase ao longo do tempo. Contudo, para este espécie/estirpe, outras enzimas envolvidas na degradação do herbicida podem estar sendo expressas para compensar a baixa atividade da lacase.

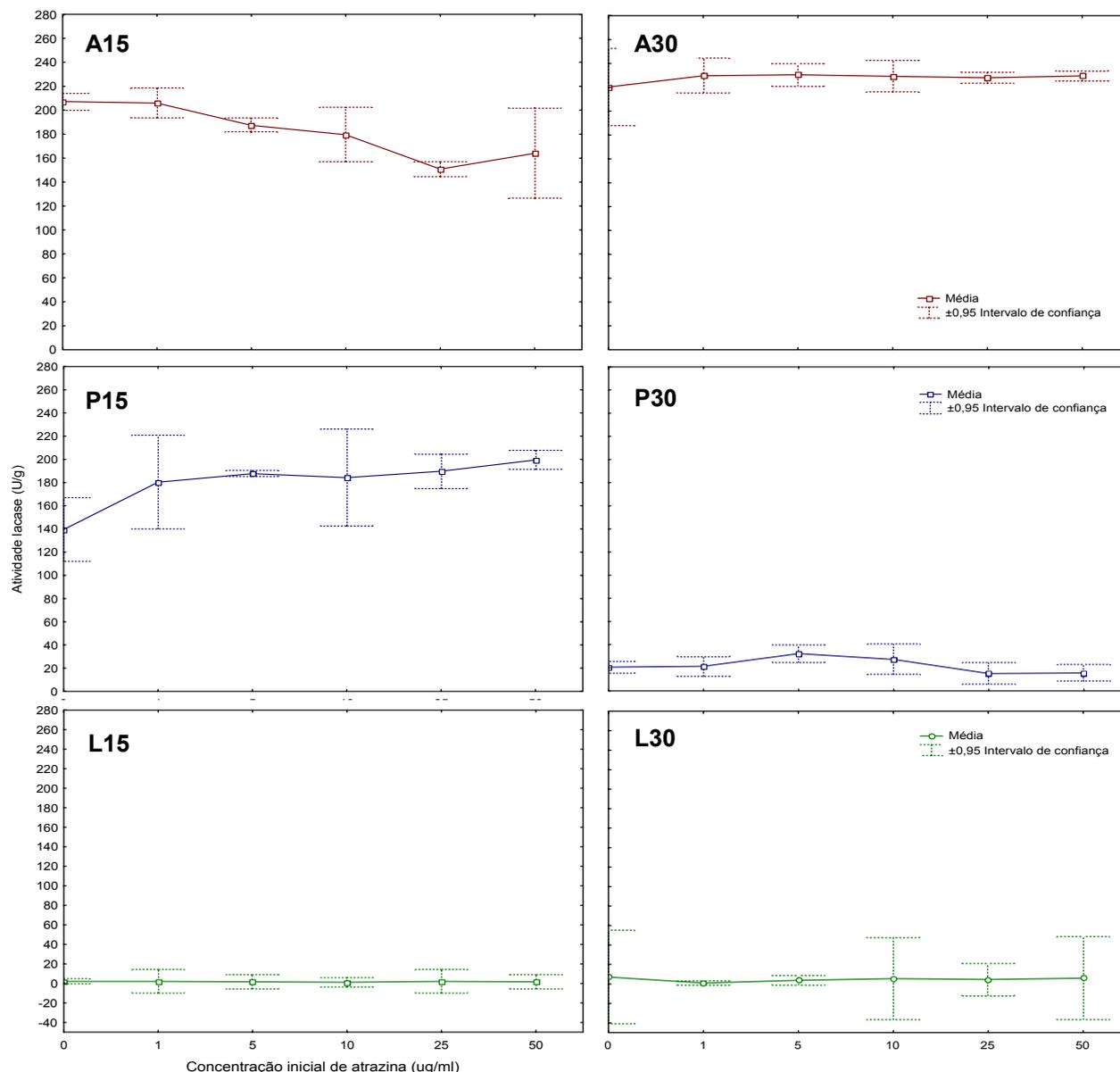


FIGURA 29. Atividade da lacase de *A. brasiliensis* (A), *P. ostreatus* (P) e *L. edodes* (L) em meio BDA com diferentes concentrações de atrazina (1, 5, 10, 25 e 50 $\mu$ g/mL) no 15<sup>o</sup> (15) e 30<sup>o</sup> (30) dia de cultivo.

Em suma, verificou-se que a atividade da lacase não foi influenciada pela concentração do herbicida. A produção de lacase, considerando a faixa de concentração de atrazina avaliada, pode estar sobretudo relacionada com características do desenvolvimento fúngico e com o meio de cultivo. Apesar do herbicida não influenciar a produção da lacase, não deverá ser descartada a possibilidade da atuação desta enzima na degradação do agrotóxico, uma vez esta enzima é uma oxidase, agindo na desestruturação molecular pela geração de radicais livres de alta reatividade e inespecíficos como reagentes.

Corroborando com a explicação, Vyas e Molitoris (1995) verificaram que, durante a fermentação em estado sólido de palha de trigo, o fungo *P. ostreatus* produziu enzimas susceptíveis de descolorir o RBBR (“Remazol brilliant blue” – corante heterocíclico aromático), como manganês peroxidase, manganês-independente peroxidase e fenol oxidase. Contudo, a presença de RBBR não foi essencial para a produção destas enzimas, que foram também produzidas na ausência do corante.

Em outro experimento, *P. ostreatus*, *Phanerochaete chrysosporium* e *Trametes versicolor* foram cultivados em dois substratos, um à base de solo e outro à base de palha, ambos contaminados com PAHs, e a atividade da MnP e da lacase foi de 5 a 20 vezes maior no cultivo em palha comparado com ao cultivo no solo, tendo sido também a degradação dos PAHs superior no cultivo em palha (NOVOTNÝ et al., 1999). Neste caso, a natureza do substrato foi responsável pela indução enzimática com conseqüente degradação dos PAHs, e não propriamente o xenobiótico. Desta forma, é fundamental o estudo integrado de todos os fatores ambientais nas estratégias de biorremediação, especificamente aqueles relacionados aos substratos envolvidos. Dentro deste contexto, a não indução da atividade da lacase com o aumento da concentração de atrazina nos experimentos seria explicada pela influência sobrepujante do substrato na indução da atividade enzimática em relação à influência do herbicida.

Vasil’chenko et al. (2002), ao verificarem a atuação de linhagens lacase-positivas e lacase-negativas do fungo *Mycelia sterilia* na degradação de atrazina, verificaram que a degradação por esta espécie não dependia diretamente da atividade da lacase extracelular. Contudo, para as linhagens lacase-negativas, outras enzimas poderiam estar atuando. Masaphy, Henis e Levanon (1996) verificaram que a degradação de atrazina por *P. pulmonarius* envolveu a atuação das enzimas como lipoxigenase, peroxidase e citocromo P-450.  $Mn^{2+}$  estimulou esta atividade e aumentou a transformação da atrazina em metabólitos

*N*-dealquilados e propil-hidroxiados. Por outro lado, antioxidantes/inibidores de lipoxigenase, peroxidase e do citocromo P-450 inibiram a transformação da atrazina pelo fungo.

Na degradação de outros herbicidas seletivos, como aqueles formulados com feniluréia, a atuação da lacase foi mais diretamente verificada. Jolival et al. (1999), ao avaliarem a degradação de metabólitos hidroxiados do *N,N'*-dimetil-*N*-fenilurea – herbicida conhecido como fenuron – utilizando lacase parcialmente purificada de *Trametes versicolor*, detectaram degradações de até 58% em 15 minutos de incubação. Este aspecto evidencia o papel dessa enzima na degradação de compostos orgânicos persistentes, o que torna sua avaliação importante quando se visa a biorremediação de diversos xenobióticos como agrotóxicos.

### **3.3. Atividade da lacase e crescimento micelial de *A. brasiliensis*, *L. edodes* e de *P. ostreatus* no experimento de biotransformação de atrazina em meio BDA com diferentes valores de pH**

As Figuras 30 e 31 apresentam a atividade da lacase ao longo do tempo, em função da espécie fúngica e do pH de cultivo, no experimento de biodegradação de atrazina (10µg/mL) em meio BDA.

A atividade da lacase de *A. brasiliensis* ao longo do tempo, nos três valores de pH, aumentou, sendo elevada até 30 dias após o início do experimento. A lacase produzida por *P. ostreatus*, em todos os valores de pH, apresentou um pico de produção no 10º dia, com decréscimo ao longo dos dias subsequentes. Este pico foi mais elevado nos meios de cultura com pH 5,5 e 6,5, podendo ser um reflexo do pH ótimo de crescimento deste fungo, sobretudo em pH 6,5, como mostra a Figura 32. No cultivo de *L. edodes*, a atividade da lacase foi relativamente inferior, com uma baixa elevação ao longo do tempo (Figura 31) – não refletindo parâmetros de crescimento deste fungo, único dentre os testados cujo crescimento

não foi influenciado pelo pH (Figura 32) ou mesmo pela concentração de atrazina, como já discutido (Figura 27, item 3.1).

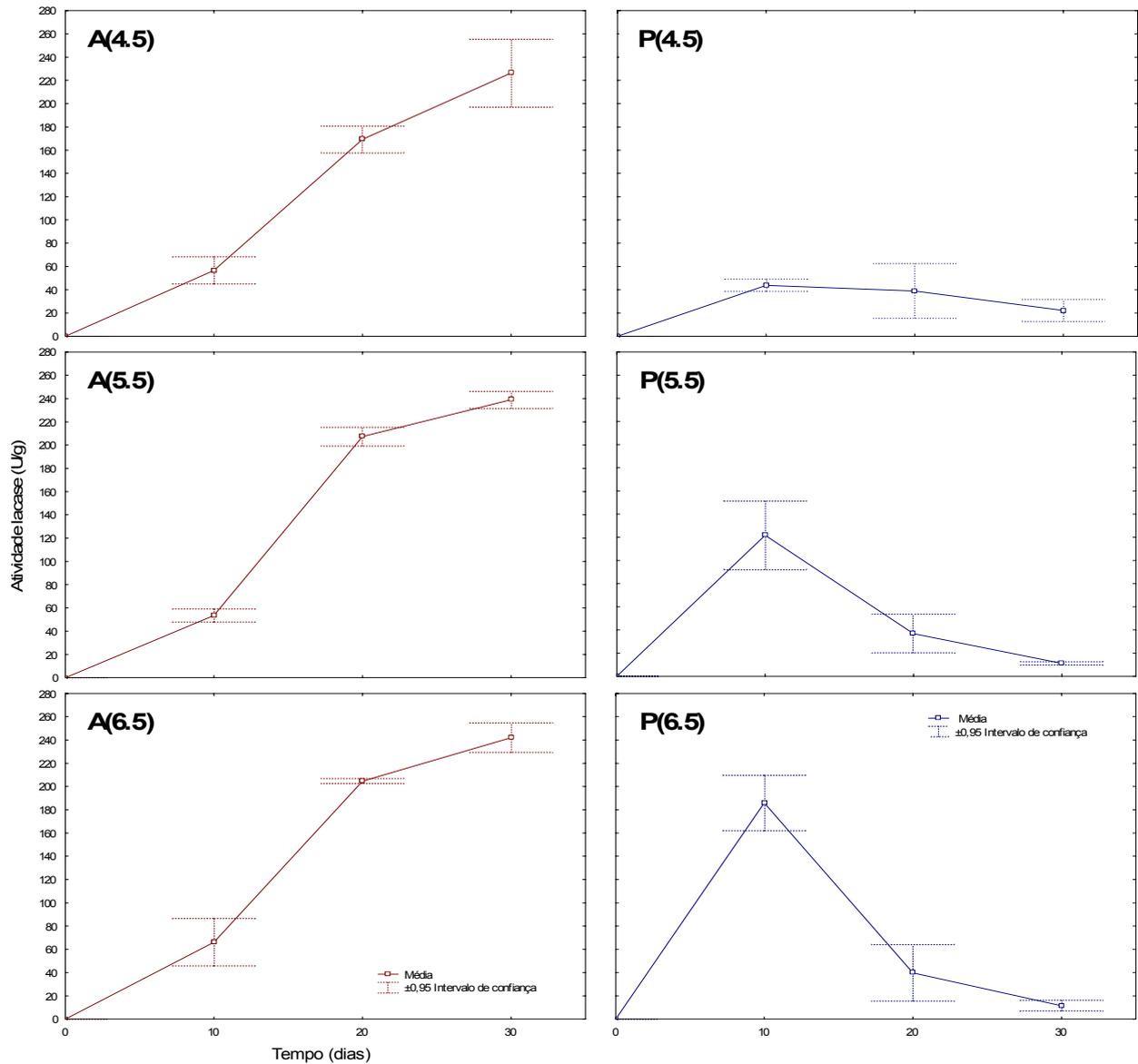


FIGURA 30. Atividade enzimática da lacase de *A. brasiliensis* (A) e *P. ostreatus* (P) em meio BDA com 10 $\mu$ g/mL de atrazina, em função do pH do meio (4,5, 5,5 e 6,5), no 10<sup>o</sup>, 20<sup>o</sup> e 30<sup>o</sup> dia de cultivo. Atividade expressa em U por grama de meio de cultura.

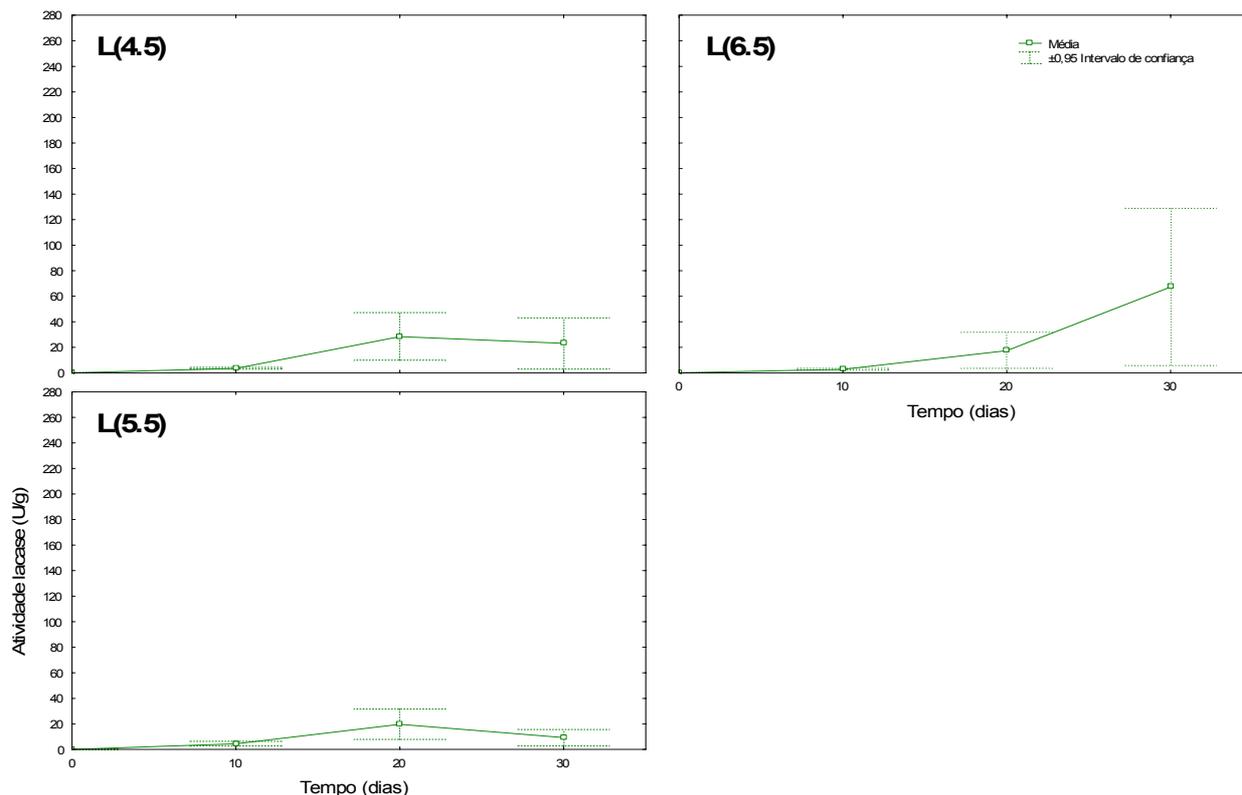


FIGURA 31. Atividade enzimática da lacase de *L. edodes* (L) em meio BDA com 10 $\mu$ g/mL de atrazina, em função do pH do meio (4,5, 5,5 e 6,5), no 10<sup>o</sup>, 20<sup>o</sup> e 30<sup>o</sup> dia de cultivo. Atividade em U por grama de meio de cultura.

As espécies fúngicas selecionadas apresentam, naturalmente, crescimentos distintos. A 24°C, o crescimento micelial, em ordem crescente, foi de *A. brasiliensis*, *L. edodes* e *P. ostreatus* (Figura 28 e Figura 32). Apesar de um menor crescimento, *A. brasiliensis* foi o fungo com as maiores atividades de lacase, a qual se manteve crescente e elevada ao longo do tempo – o que pode ou não estar relacionado a uma elevada porcentagem de biotransformação de atrazina, como posteriormente exposto e discutido.

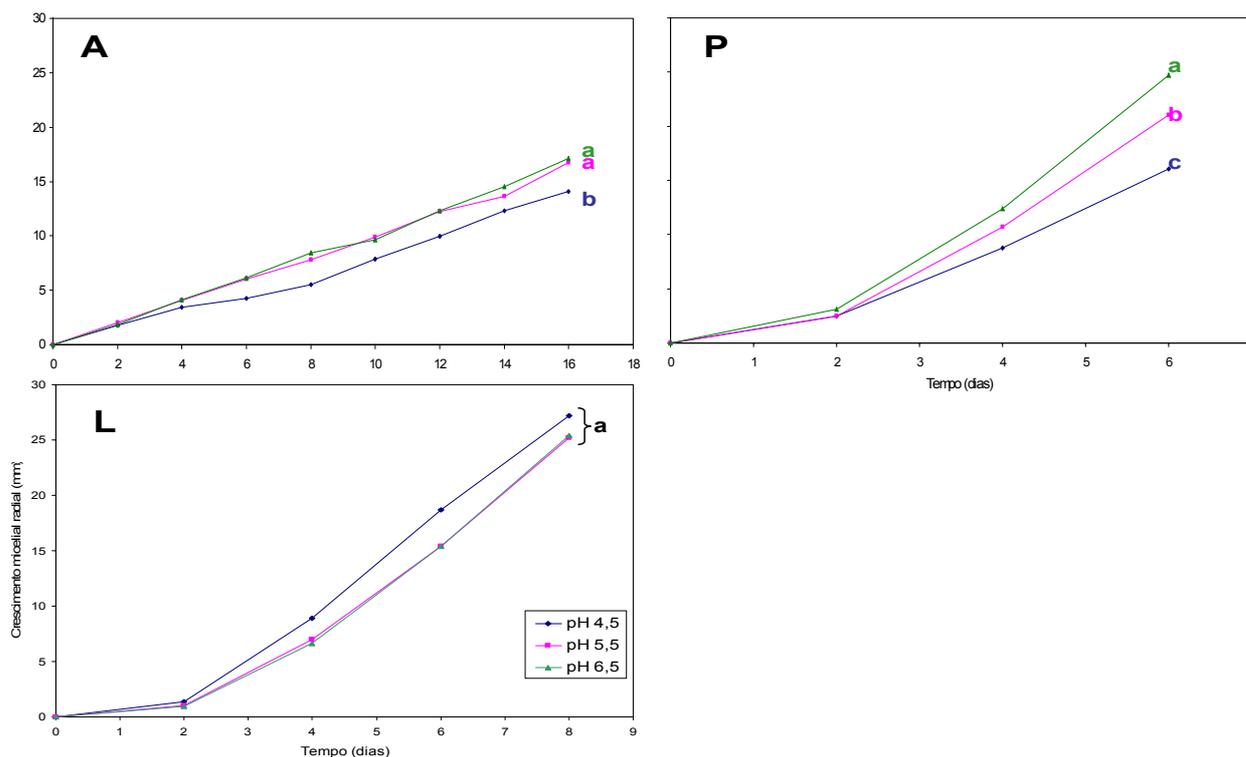


FIGURA 32. Crescimento micelial radial de *A. brasiliensis* (A), *P. ostreatus* (P) e *L. edodes* (L) em meio BDA com 10 $\mu$ g/mL de atrazina (concentração inicial), de acordo com o valor de pH (4.5, 5.5 e 6.5). Comparações do crescimento micelial radial final para uma mesma espécie fúngica utilizando-se ANOVA/Tukey ( $p < 0,05$ ). Valores marcados com a mesma letra não diferem significativamente entre si, sendo  $a > b > c$ . Médias baseadas em 4 repetições (placas).

### 3.4. Avaliação da biotransformação de atrazina “in vitro” em diferentes valores de pH

A porcentagem de biotransformação de atrazina no experimento “in vitro” foi mensurada em relação ao controle, comparando-se a fração extraída com metanol. Na Figura 33 é representada a biotransformação de acordo com o tempo e a espécie fúngica, em um mesmo pH. As comparações estatísticas de biotransformação foram efetuadas apenas para o 30<sup>o</sup> dia de cultivo, em virtude do maior número de repetições e a maior consistência dos resultados.

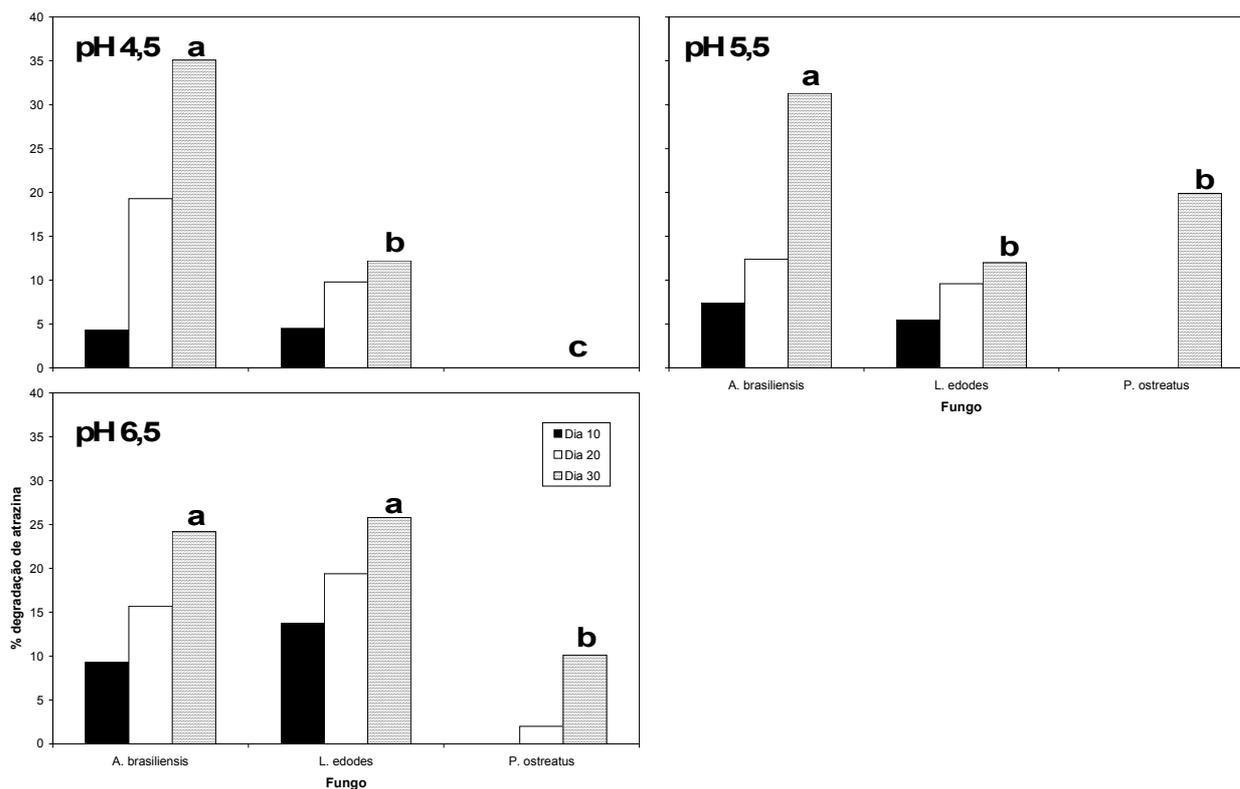


FIGURA 33. Porcentagem de biotransformação de atrazina em meio BDA com diferentes valores de pH, em função da espécie fúngica (*A. brasiliensis*, *L. edodes* e *P. ostreatus*) e do tempo de cultivo. Comparações entre as espécies fúngicas das porcentagens no 30º dia de cultivo, para um mesmo pH, utilizando-se ANOVA/Tukey ( $p < 0,05$ ). Taxas marcadas com a mesma letra (dia 30) não diferem significativamente entre si, sendo  $a > b > c$ . Análise baseada em três repetições.

Verificou-se um aumento da biotransformação de atrazina ao longo do tempo em todos os tratamentos (fungo/pH), em relação ao controle (Figura 33).

Na Figura 34 são apresentadas as porcentagens de biotransformação de atrazina ao final do 30º dia de cultivo, em função do fungo e dos diferentes valores de pH. De acordo com esta figura, verificou-se que, dentre os fungos avaliados, *A. brasiliensis* tendeu a apresentar as porcentagens de biotransformação mais elevadas, especialmente nos meios com pH inicial de 4,5 e 5,5 – cerca de 35% e 31%, respectivamente, ao final do 30º dia de cultivo. Este resultado pode ou não estar relacionado à elevada atividade enzimática de lacase – bem como de outras enzimas –, a qual se manteve crescente durante todo o experimento (Figura 30). É interessante notar que a taxa de biotransformação apresentada por este fungo não está relacionada com o maior crescimento micelial, uma vez que este foi verificado em pH 5,5 e

6,5 (Figura 32). Fatores de estresses do meio, como pH não ideal ao crescimento, com conseqüente indução da produção de um sistema enzimático mais eficiente, relacionado com a degradação da atrazina, ou mesmo a disponibilidade molecular do herbicida à ação enzimática, também relacionada ao pH do meio, podem estar afetando a biotransformação.

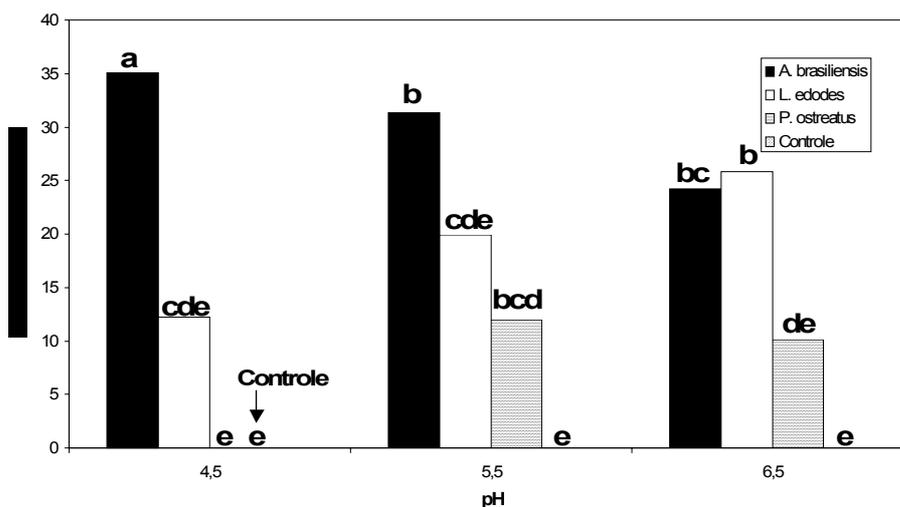


FIGURA 34. Porcentagem de biotransformação de atrazina em meio BDA de *A. brasiliensis*, *L. edodes* e *P. ostreatus* em função do pH do meio inicial, no 30º dia de cultivo. Comparações das porcentagens utilizando-se ANOVA/Tukey ( $p < 0,05$ ). Taxas marcadas com a mesma letra não diferem significativamente entre si, sendo  $a > b > c$ . Análise com base em três repetições.

Por outro lado, *L. edodes* apresentou uma maior taxa de biotransformação no pH 6,5, sendo cerca de 26% ao final do 30º dia de cultivo. Quando o pH inicial foi de 4,5 e 5,5, essa porcentagem foi de 12,2% e 19,9%, respectivamente. Este fato corrobora com a explicação de que fatores do meio poderiam estimular a produção de um sistema enzimático mais adequado à degradação do presente xenobiótico. Dentro deste contexto, parece evidente que os sistemas enzimáticos de cada fungo responsáveis pela biotransformação são distintos.

É importante verificar que a maior degradação de atrazina por *A. brasiliensis* ocorreu em pH 4,5, e a que se refere a *L. edodes* em pH 6,5, o que leva a concluir que a disponibilidade molecular do herbicida à ação enzimática em função do pH, nas condições de avaliação, não apresentaram influência expressiva na biotransformação. É interessante notar que *L. edodes* apresentou um crescimento micelial semelhante em todos os valores de pH,

sendo que a atividade da lacase foi praticamente inexistente. Outras enzimas, como já mencionado, poderiam estar atuando na biotransformação verificada com o presente fungo.

*P. ostreatus*, apesar de considerado um degradador eficiente de xenobióticos, proporcionou porcentagens de biotransformação da atrazina, em geral, inferiores àquelas proporcionadas pelos demais fungos. As maiores taxas de biotransformação foram detectadas em meio com pH 5,5 e 6,5, sendo respectivamente de 12% e 10%, ao final do 30º dia de cultivo. É interessante notar que as maiores velocidades de crescimento micelial (Figura 32) e dos picos de atividade da lacase (Figura 30) foram detectados para os mesmos valores de pH, o que fornece maior suporte à explicação de que condições ambientais, especialmente aquelas relacionadas ao crescimento do fungo, estariam influenciando a biotransformação da atrazina.

Na Figura 35 são apresentados alguns cromatogramas utilizados para obtenção das taxas de biotransformação de atrazina “in vitro”, nos experimentos realizados.

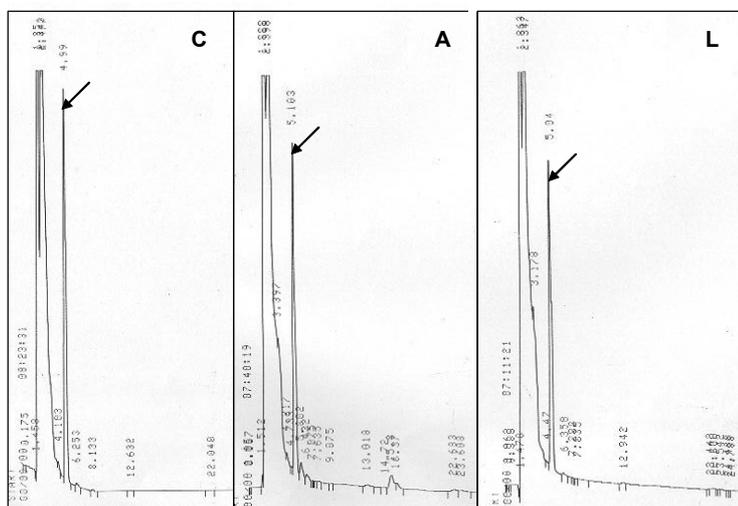


FIGURA 35. Cromatogramas (HPLC) evidenciando a redução da concentração de atrazina “in vitro”, ao final do 30º dia de cultivo; (C) controle, (A) cultivo de *A. brasiliensis*, (L) cultivo de *L. edodes*.

Considerando-se os experimentos de biotransformação do herbicida atrazina “in vitro”, utilizando as três espécies fúngicas selecionadas (frequentemente utilizadas no cultivo de cogumelos), podem ser identificadas perspectivas de aplicação das mesmas espécies, especialmente de *A. brasiliensis* na transformação/degradação de agrotóxicos. Abrem-se ainda

perspectivas de utilização do CR destas espécies como um inoculante economicamente viável para a biorremediação de herbicidas em solos, mais especificamente de atrazina. Neste sentido, com os resultados demonstrados nesta dissertação, a utilização dos CRs ganha especial importância.

## CONCLUSÕES

### 1. Utilização de CR como fertilizante para alface

- O CR de *A. brasiliensis* com camada de cobertura à base de turfa apresenta maiores teores de MO, C, N, P e K em relação ao CR com camada à base de solo.
- A utilização do CR de *A. brasiliensis* nas doses de 5 e 10% em peso seco ( $\pm$  12,5 e 25% em peso fresco) – tanto com camada de cobertura à base de solo como de turfa – resulta em um aumento do peso seco de *L. sativa* em relação ao controle (solo) e à fertilização química. Para a dose de 10% do CR com camada à base de turfa e de solo, respectivamente, o aumento do peso seco aéreo é de 2,2 e 2,8 vezes superior em relação ao controle, e 1,3 e 1,7 vezes superior à fertilização química. Doses superiores (25 e 40%) proporcionam resultados semelhantes ou inferiores ao controle e ao solo com NPK.
- A área foliar total e a área/folha de *L. sativa* tende a aumentar com a elevação das doses de CR de *A. brasiliensis*, tanto com camada à base de solo como de turfa, apresentando uma diminuição expressiva para a porcentagem de 40% do CR com camada à base de solo.
- Tanto a concentração de proteínas solúveis como de clorofila foliar de *L. sativa* (parâmetros de qualidade) tendem a aumentar com a elevação da dose de CR de *A. brasiliensis* aplicada, evidenciando relação destes parâmetros com o teor nutricional do substrato.
- Tanto o CR de *A. brasiliensis* com camada de cobertura à base de solo como de turfa proporcionam, em geral, resultados semelhantes em termos de peso seco aéreo, apesar da tendência de valores mais elevados para os substratos com CR com camada à base de solo. Desta forma, ambos os CRs podem ser empregados com perspectivas de resultados

satisfatórios no cultivo de alface. Contudo, em termos de qualidade (clorofila e proteínas), há uma tendência de melhores resultados para o CR com camada à base de turfa.

- Não há efeito potencializador do tratamento com 10% de CR de *A. brasiliensis* (camada à base de turfa) pela adição de adubação química (NPK), provavelmente pelo eficiente fornecimento dos nutrientes.

- A utilização do CR de *L. edodes*, nas proporções de 5, 10 e 25% resulta numa inibição do crescimento vegetal, que é expressa tanto pela diminuição significativa do peso seco em relação ao controle, como pela diminuição do teor de clorofila e de proteínas foliares. Contudo, outras formas de aplicação deste CR poderão levar a resultados satisfatórios.

- Os CRs de *A. brasiliensis* com camada à base de solo e de turfa e o CR de *L. edodes* apresentam características positivas em termos de manutenção da umidade, com capacidade de retenção 2,5, 1,8 e 3,3 vezes maior do que aquela verificada no solo, respectivamente. Já a capacidade de campo do CR de *A. brasiliensis* com camada de cobertura à base de turfa é aproximadamente 1,4 vezes superior à capacidade verificada para CR do mesmo fungo com camada à base de solo.

## 2. Características dos CRs visando a biorremediação de solos

- O CR de *A. brasiliensis* e de *L. edodes* apresentam CEs elevadas, acima do ideal para o desenvolvimento vegetal, mas a CE do CR de *P. ostreatus* encontra-se dentro da faixa aceitável – fator importante quando se visa a ação conjunta de biorremediação e fertilização.
- A liberação de CO<sub>2</sub> dos CRs de *A. brasiliensis*, *L. edodes* e *P. ostreatus* é consideravelmente superior aquela dos dois solos selecionados, evidenciando um possível incremento na atividade metabólica deste solos após a incorporação dos CRs, com provável incremento e/ou aceleração da degradação de xenobióticos.
- O número de microorganismos dos CRs de *A. brasiliensis*, *L. edodes* e *P. ostreatus* é superior aquele dos dois solos selecionados, sendo que a incorporação destes materiais no solo poderá proporcionar um aumento do número e da variedade microbiana do mesmo, favorecendo a degradação de xenobióticos.
- A atividade da lacase nos CRs de *A. brasiliensis* (UFSC-51) e de *P. ostreatus* se mantém ao longo de 2 meses (após a produção de cogumelos), com variações ao longo do tempo. O CR de *L. edodes* (UFSC-17), por sua vez, apresenta atividades comparativamente inferiores ou mesmo desprezíveis neste período. A atividade da lacase no CR de *A. brasiliensis* com pouca homogeneização após o cultivo (pouca fragmentação micelial) é superior a do CR com homogeneização acentuada.

### 3. Biotransformação de atrazina “in vitro”

- *A. brasiliensis*, *P. ostreatus* e *L. edodes* crescem em meio BDA com concentrações de atrazina de 1, 5, 10, 25 e 50µg/mL. *A. brasiliensis* e *P. ostreatus* mostraram-se mais sensíveis, com crescimentos inferiores para as concentrações mais elevadas.
- A atividade da lacase das três espécies fúngicas não é influenciada pela concentração de atrazina, mas provavelmente pelo meio de cultivo e pelo estágio de desenvolvimento fúngico. Dentre as espécies avaliadas, *L. edodes* (UFSC-17) é a única que apresenta atividades de lacase comparativamente baixas ou mesmo desprezíveis.
- *A. brasiliensis* proporciona as porcentagens mais elevadas de biotransformação de atrazina em meio BDA (10µg/mL) com pH 4,5 e 5,5 – 35% e 31%, respectivamente, no 30º dia de cultivo. *L. edodes* proporciona a maior taxa de biotransformação em pH 6,5 (26% no 30º dia de cultivo), sendo que as taxas de *P. ostreatus* são, em geral, inferiores aos tratamentos com os demais fungos – maiores taxas de 10% e 12% em pH 6,5 e 5,5, respectivamente, no 30º dia de cultivo.
- O valor de pH tem influência na biotransformação da atrazina por influenciar o crescimento fúngico – por ser um fator de estresse ou mesmo de favorecimento do seu desenvolvimento.
- A lacase pode estar envolvida na biotransformação de atrazina pelos fungos selecionados, mas não aparenta ser essencial.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS E RECOMENDAÇÕES

Com a finalidade de valorização do composto residual da produção de cogumelos, que tem produção crescente em todo o Brasil, este trabalho confirmou a viabilidade de sua utilização na fertilização orgânica de alface, assim como seu potencial na biorremediação de agrotóxicos (atrazina) e de outros poluentes em solos de cultivo.

Na aplicação como fertilizante, as doses ótimas dos CRs de *A. brasiliensis* para o desenvolvimento de alface foram estabelecidas, sendo confirmada a substituição vantajosa da fertilização química. Com o intuito de ser utilizado como fertilizante e condicionador do solo, recomenda-se que esse CR seja aplicado com antecedência ao plantio vegetal, como já é recomendado para a maioria dos compostos orgânicos (30 a 40 dias). A periodicidade e a dose a ser reaplicada devem ser baseadas em análises nutricionais dos solos e dos CRs, visando evitar a adição excessiva e conseqüente poluição ambiental pelo excesso de nutrientes. O CR de *L. edodes*, por outro lado, não foi eficiente no favorecimento do desenvolvimento de *L. sativa* nas doses estabelecidas e no manejo realizado, sendo que estudos subseqüentes deverão ser realizados para verificar tais resultados.

Os CRs de *A. brasiliensis*, *L. edodes* e *P. ostreatus*, por apresentarem potencial microbiológico para a detoxificação de solos contaminados com xenobióticos, apresentam perspectivas de ação conjunta de biorremediação quando aplicados como fertilizantes nos solos, fato que adicionalmente estes materiais. Contudo, deve-se considerar que as características dos resíduos que proporcionam a biorremediação são, em parte, distintas das que favorecem a fertilização vegetal, sendo necessária a aplicação prévia ao cultivo vegetal – como já recomendado. Já para a manutenção do potencial dos CRs para a biorremediação de solos por um maior intervalo de tempo, recomenda-se que estes sejam armazenados em condições semelhantes às de cultivo, ou então sejam aplicados no solo imediatamente após sua produção.

O potencial dos CRs para biorremediação de solos contaminados com agrotóxicos foi enfatizado com a constatação do potencial dos fungos de cultivo de biotransformarem a atrazina em níveis expressivos, em condições “in vitro”. Evidentemente que estudos mais aplicados, em condições “in vivo” deverão ser realizados.

Finalizando, podemos dizer que o CR, especialmente de *A. brasiliensis*, apresenta potencial para aplicação no solo, com vantagens de ser, ao mesmo tempo, um fertilizante orgânico de liberação gradual, um condicionador e um agente de biorremediação, que tem potencial para ativação do processo de detoxificação, facilitando e acelerando a certificação de cultivos orgânicos.

## REFERÊNCIAS

- ADAMOVÍČ, M.; GRUBIC, G.; MILENKOVÍČ, I.; JOVANOVIĆ, R.; PROTIC, R.; SRETENOVIC, L.; STOICEVIC, L. 1998. The biodegradation of wheat straw by *Pleurotus ostreatus* mushrooms and its use in cattle feeding. **Animal Feed Science and Technology**, v.71, p.357-362.
- ALEXANDER, M. 1980. **Microbiologia do solo**. México: AGT Editor. 491p.
- ALEXANDER, R. A. 1994. Standards and guidelines for compost use. **Biocycle**, v.35, n.12, p.37-41.
- ANDER, P.; ERIKSSON, K. E. 1976. The importance of phenol oxidase activity in lignin degradation by the white rot fungus *Sporotrichum pulverulentum*. **Archives of Microbiology**, v.109, p.1-8.
- ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Brasil). 2004. **SIS – Sistema de Informação sobre agrotóxicos**. Módulo Pós-Registro. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/toxicologia>>. Acesso em: jul. 2004.
- AQUINI, A. A. S.; FERMINO, P. C. P. 2000. **Agrotóxicos e receita agrônômica: coletânea da legislação e comentários**. Florianópolis. 122p.
- ARNON, D. J. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts polyphenoloxidases in *Beta vulgaris*. **Plant Physiology**, v.24, p.1-15.
- BALL, A. S.; JACKSON, A. M. 1995. The recovery of lignocellulose-degrading enzymes from spent mushroom compost. **Bioresource Technology**, v.54, p.311-314.
- BARROS, I. B. I. 1979. **Efeito da adubação nitrogenada, foliar e no solo, e da adubação foliar de molibdênio em alface (*Lactuca sativa* L.)**. Tese de Mestrado. Viçosa, MG: UFV, Impr. Univ. 43p.
- BARTZ, H. R. 1994. **Recomendações de adubações e calagem para os estado do Rio Grande do Sul e Santa Catarina**. 3 ed., Passo Fundo: SBCS Núcleo Regional Sul. 224p.
- BERNARDO, S. 1989. **Manual de irrigação**. 5 ed., Universidade Federal de Viçosa, Viçosa: Imprensa Universitária. 596p.
- BEYER, D. M. 1999. **Spent mushroom substrate**. Disponível em: <<http://mushroomspawn.cas.psu.edu>>. Acesso em: jun. 2004.
- BIASI, L. A.; LIMA, M. R.; GABARDO, N. P.; SHMID, M. L.; MARTHAUS, P. S.; ZAMBON, F. R. A. 1991. Competição de cultivares de alface na região metropolitana de Curitiba. **Horticultura Brasileira**, v.9, n.1, p.14-15.
- BRADFORD, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254.

BRAGA, G. C.; EIRA, A. F.; CELSO, P. C.; COLAUTO, N. B. 1998. **Manual de cultivo de *Agaricus blazei* Murril., cogumelo do sol.** Botucatu, SP: FEPAF – Fundação de Estudos e Pesquisas Agrícolas e Florestais. 44p.

BREDA, T. 2004. **Biorremédio é mais eficiente na degradação de herbicidas no solo.** USP Notícias – Meio Ambiente. Disponível em: <<http://www.usp.br/agenciausp>>. Acesso em: set. 2005.

BURTON, S. G.; BOSHOFF, A.; EDWARDS, W. & ROSE, P. D. 1998. Biotransformation of phenols using immobilized polyphenol oxidase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.5, p.411-416.

BUSWELL, J. A.; CAI Y. J.; CHANG, S. T. 1993. Fungal – and substrate – associated factors affecting the ability of individual mushroom species to utilize different lignocellulosic growth substrates. **In: Mushroom biology and mushroom products.** Hong Kong: The Chinese University Press. 370p.

BUSWELL, J. A.; CAI, Y. J.; CHANG, S. T.; PEBERDY, J. F.; FU, S. Y.; YU, H-S. 1996. Lignocellulytic enzyme profiles of edible mushroom fungi. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.12, p.537-542.

CAMPANHOLA, C.; BETTIOL, W. 2002. Panorama sobre o uso de agrotóxicos no Brasil. **In: Programa de defesa ambiental rural – textos orientadores.** Fórum Nacional de Secretários de Agricultura: Ministério do Meio Ambiente, p.7-26.

CASTRO, C. N. 2004. **Definição de unidades de gerenciamento do solo por meio da sua condutividade elétrica e variáveis físico-químicas.** Dissertação de Mestrado em Agronomia. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (USP), Piracicaba. 131p.

CERRI, C. C.; ANDREUX, F.; EDUARDO, B. P. 1992. O ciclo do carbono do solo. **In: Microbiologia do solo.** Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo. 360p.

CHANG, S. T. 1984. Conversion of agricultural and industrial wastes into fungal protein. **Conservation and Recycling**, v.7, p.175-180.

CHANG, S. T. 1987. Microbial biotechnology – integrated studies on utilization of solid organic wastes. **Resources and Conservation**, v.13, p.75-82.

CHANG, S. T. 1999. World production of cultivated edible and medicinal mushrooms in 1997 with emphasis on *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. in China. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v.1, n.4, p.291-300.

CHANG, S. T. 2003. Mushroom cultivation using the “Zeri” principle: potencial for application in Brasil. **Anais do Primeiro Simpósio Internacional sobre cogumelos na alimentação, saúde, tecnologia e Meio Ambiente no Brasil.** Documentos 88, Brasília, DF: Embrapa, p.32-41.

CHEN, A. W. 2001. Cultivation of *Lentinula edodes* on synthetic log. **The Mushroom Growers’ Newsletter**, v.5, n.4, p.3-9.

CHIU, S. W.; CHING, M. L.; FONG, K. L.; MOORE, D. 1998. Spent oyster mushroom substrate performs better than many mushroom mycelia in removing the biocide pentachlorophenol. **Mycological Research**, v.102, p.1553-1562.

CHIU, S. W.; LAW, S. C.; CHING, M.; CHEUNG, K. W.; CHEN, M. J. 2000. Themes for mushroom exploitation in the 21<sup>st</sup> century: sustainability, waste management and conservation. **Journal of General and Applied Microbiology**, v.46, p.269-282.

CHONG, C. 2004. **Growing on wastes: a success story and resource (Abridged)**. Disponível em: <<http://www.evergreen.ca>>. Acesso em: jun. 2004.

CHONG, C.; RINKER, S. L. 1994. Use of spent mushroom substrate (SMS) for growing containerized woody ornamentals: An overview. **Compost Science and Utilization**, v.2, p.45-54.

DOOD, V. A.; MAGETTE, W.; SMYTH, S.; HOWARD, V. 1998. **Spent mushroom compost management**. Agriculture and Food Engineering; University College Dublin, Faculty of Agriculture. Disponível em: <<http://www.ucd.ie>>. Acesso em: jul. 2004.

DUGGAN, J.; McCABE, T.; HENNERTY, M. J.; MAHER, M. J. 1998. **Can spent mushroom compost be used as a crop nutrient source?** Crop Science, Horticulture and Forestry; University College Dublin, Faculty of Agriculture. Disponível em: <<http://www.ucd.ie>>. Acesso em: jun. 2004.

EGGEN, T. 1999. Application of fungal substrate from commercial mushroom production – *Pleurotus ostreatus* – for bioremediation of creosote contaminated soil. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.44, p.117-126.

EGGEN, T.; SVEUM, P. 1999. Decontamination of aged creosote polluted soil: the influence of temperature, white rot fungus *Pleurotus ostreatus*, and pre-treatment. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.43, p.125-133.

EGUCHI, F.; YOSHIMOTO, H.; HIGAKI, M. 1998. A year-round cultivation method of *Agaricus blazei* (CJ-01) and the effect of hot-water extract from its fruit bodies. **Proceedings of International Seminar on Development of Agribusiness and its impact on agricultural production in Southeast Asia**.

EIRA, A. F. da. 2000. Cultivo de cogumelos (compostagem, condução e ambiente). **Anais da III Reunião Itinerante de Fitossanidade do Instituto Biológico**. Mogi das Cruzes, SP, p. 83-95.

EIRA, A. F. da. 2003. **Cultivo do cogumelo medicinal *Agaricus blazei* (Murrill) ss. Heinemann ou *Agaricus brasiliensis* (Wasser et al.)**. Viçosa: Aprenda Fácil Editora. 396p.

EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária). 2005a. **Área de hortaliças no Brasil, 1980-2004**. Embrapa Hortaliças. Disponível em: <<http://www.cnph.embrapa.br>>. Acesso: ago.2005.

EMBRAPA. 2005b. **Produção de hortaliças no Brasil, 1980-2004**. Embrapa Hortaliças. Disponível em: <<http://www.cnph.embrapa.br>>. Acesso: ago.2005.

EMBRAPA. 2005c. **Produtividade das hortaliças no Brasil, 1980-2004**. Embrapa Hortaliças. Disponível em: <<http://www.cnph.embrapa.br>>. Acesso: ago.2005.

EMBRAPA. 2005d. **Informações gerais: alface**. Embrapa Hortaliças. Disponível em: <<http://www.cnph.embrapa.br>>. Acesso: ago.2005.

EPAGRI (Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina S. A.). 2003. **Levantamento hortícola da região metropolitana de Florianópolis (SC) – 2003**.

ESPOSITO, E.; VILLAS-BÔAS, S.; ANTUNES, R.; PAULINO, S. & SOUZA, J. A. 1996. Estratégias microbiológicas na remediação de solos contaminados com organoclorados. **In: Anais da I Reunião Nacional de Microbiologia aplicada ao Meio Ambiente**. UNICAMP, v.1, p.80-87.

FANG, C; RODOSEVICH, M.; FUHRMANN, J. J. 2001. Atrazine and phenanthrene degradation in grass rhizosphere soil. **Soil Biology & Biochemistry**, v.33, p.671-678.

FAO (United Nations Food and Agriculture Organization). 2000. World Mushroom production by major producing country. **The Mushroom Growers' Newsletter**, v.7, n.11, p.4.

FERMINO JUNIOR, P. C. P. 2004. **Anatomia ecológica comparada de folhas de *Guapira opposita* (Vell.) Reitz (Nyctaginaceae) na vegetação de restinga e na floresta ombrófila densa**. Dissertação de Mestrado em Biologia Vegetal pela Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Florianópolis. 69p.

FERREIRA, J. E. F. 1998. **Produção de cogumelos**. Guaíba: Editora Agropecuária. 135p.

FIGUEIRA, F. A. R. 1982. **Manual de olericultura – cultura e comercialização de hortaliças**. 2 ed., vol. II, São Paulo: Editora agrônômica “Ceres” Ltda. 357p.

FONTES, P. C. R. 1999. Sugestões de adubação para as diferentes culturas em Minas Gerais – Alface. **In: Recomendações para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais**. 5<sup>a</sup> aproximação, Comissão de Fertilidade do Solo do Estado de Minas Gerais – CFSEMG Viçosa, Viçosa: Imprensa Universitária da Universidade Federal de Viçosa. 359p.

GERRITS, J. P. G. 1994. Composition, use and legislation of spent mushroom substrate in the Netherlands. **Compost Science and Utilization**, v.2, p.24-30.

GHOSH, P. K.; PHILIP, L. 2004. Atrazine degradation in anaerobic environment by a mixed microbial consortium. **Water Research**, v.38, p.2277-2284.

GRABSKI, A. C.; GRIMEK, H. J.; BURGESS, R. R. 1998. Immobilization of manganese peroxidase from *Lentinula edodes* and its biocatalytic generation of Mn<sup>III</sup>-chelate as a chemical oxidant of chlorophenols. **Biothechnology and Bioengineering**, v.6, n.2, p.204-215.

GUERRINI, I. A.; TRIGUEIRO, R. M. 2004. Atributos físicos e químicos de substratos compostos por biossólidos e casa de arroz carbonizada. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.28, p.1069-1076.

GUO, M.; CHOROVER, J.; FOX, R. H. 2001. Effects of spent mushroom substrate weathering on the chemistry of underlying soils. **Journal of Environmental Quality**, v.30, p.2127-2134.

GUO, M.; CHOROVER, J.; ROSARIO, R.; FOX, R. H. 2001. Leachate chemistry of field-weathered spent mushroom substrate. **Journal of Environmental Quality**, v.30, p.1699-1709.

GUPTA, G.; BAUMMER III, J. 1996. Biodegradation of atrazine in soil using poultry litter. **Journal of Hazardous Materials**, v.45, p.185-192.

HADAS, A.; PORTNOY, R. 1994. Nitrogen and carbon mineralization rates of composted manures incubated in soil. **Journal of Environmental Quality**, v.23, p.1184-1189.

HATVANI, N.; MÉCS, I. 2002. Effect of the nutrient composition on dye decolorisation and extracellular enzyme production by *Lentinus edodes* on solid medium. **Enzyme and Microbial Technology**, v.30, p.381-386.

HEINZKILL, M.; BECH, L.; HALKIER, T.; SCHNEIDER, P.; ANKE, T. 1998. Characterization of laccases and peroxidases from wood-rotting fungi (Family Coprinaceae). **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, n.5, p.1601-1606.

HISCOX, J. D.; ISRAELSTAM, G. F. 1979. A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. **Canadian Journal of Botany**, v.57, p.1332-1334.

HSU, J-H.; LO, S-L. 1999. Chemical and spectroscopic analysis of organic matter transformations during composting of pig manure. **Environmental Pollution**, v.104, p.189-196.

INBAR, Y.; CHEN, Y. I.; HADAR, Y.; HOITINK, H. A. J. 1990. New approaches to compost maturity. **BioCycle**, v.31, n.12, p.64-69.

JOLIVALT, C.; RAYNAL, A.; CAMINADE, E.; KOKEL, B.; GOFFIC, F. Le.; MOUGIN, C. 1999. Transformation of *N'-N'*-dimethyl-*N*-(hydroxyphenyl)ureas by laccase from the white rot fungus *Trametes versicolor*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.51, 676-681.

KAKEZAWA, M.; MINURA, A.; TAKAHARA, Y. 1990. Application of two-step composting process to rice straw compost. **Soil Science Plant Nutrition**, v.38, n.1, p.43-50.

KATAYAMA, M. 1993. Nutrição e adubação de alface, chicória e almeirão. **In: Nutrição e adubação de hortaliças**. Piracicaba, SP: Associação Brasileira para pesquisa de potassa e do fóstato – POTAFOS. p.141-148.

KONG, Won-Sik. 2004. Descriptions of commercially important *Pleurotus* species. Chapter 4: Spawn, p.54-61. **In: Mushroom growers' handbook 1 – Oyster mushroom cultivation**. Mushworld. Disponível em: <<http://www.mushworld.com>>. Acesso em: jun. 2005.

LAU, K. L.; TSANG, Y. Y.; CHIU, S. W. 2003. Use of spent mushroom compost to bioremediate PAH-contaminated samples. **Chemosphere**, v.52, p.1539-1546.

LAW, W. M.; LAU, W. N.; LO, K. L.; WAI, L. M.; CHIU, S. W. 2003. Removal of biocide pentachlorophenol in water system by the spent mushroom compost of *Pleurotus pulmonarius*. **Chemosphere**, v.52, p.1531-1537.

LEATHAM, G. F.; STAHMANN, M. A. 1981. Studies on the lacase of *Lentinus edodes*: specificity, localization and association with the development of fruiting bodies. **Journal of General Microbiology**, v.125, p.147-157.

LEVANON, D.; DANAI, O. 1995. Chemical, physical and microbiological considerations in recycling spent mushroom substrate. **Compost Science & Utilization**, SMS Symposium, p.72-79.

LUCHINI, L. C.; ANDRÉA, M. M. 2002. Dinâmica de agrotóxicos no ambiente. **In: Programa de defesa ambiental rural – textos orientadores**. Fórum Nacional de Secretários de Agricultura: Ministério do Meio Ambiente. p.27-44.

MAHER, M. J. 1991. Spent mushroom compost (SMC) as a nutrient source in peat based potting substrate. **Mushroom Science**, v.13, p. 645-650.

MAHER, 1994. The use of spent mushroom substrate (SMS) as na organic manure and plant substrate component. **Compost Science & Utilization**, v.2, n.3, p.37-44.

MAHER, M. J.; MAGETTE, W. L. 1997. Solving the spent mushroom compost problem. **In: L. Saunton and J. Grant (eds.) Advances in mushroom production, Proceedings, 12<sup>th</sup> Teagasc National Mushroom Conference and Trade Show**. Teagasc, Kinsealy Research center, Dublin, Ireland. p.73-82.

MAHER, M. J.; MAGETTE, W. L.; SMYTH, S.; DUGGAN, J.; DODD, V. A.; HENNERTY, M. J.; McCABE, T. 2000. **Managing spent mushroom compost**. Disponível em: <<http://www.teagasc.ie/research>>. Acesso em: jun. 2004.

MAISTRO, L. C. 2001. Alface minimamente processada: uma revisão. **Revista de Nutrição**, v.14, n.3, p.219-224.

MAKKAR, R.; TSUNEDA, A.; TOKUYASU, K.; MORI, Y. 2001. *Lentinula edodes* produces a multicomponent protein complex containing manganese (II)-dependent peroxidase, laccase and  $\beta$ -glucosidase. **FEMS Microbiology Letters**, v.200, p.175-179.

MANOLE. **Direito ambiental – Constituição Federal, Coleção de leis de direito ambiental (CLDAmb)**. 2004. Barueri, SP: Manole Ltda. 1573p.

MASAPHY, S.; HENIS, Y.; LEVANON, D. 1996. Manganese-enhanced biotransformation of atrazine by the white rot fungus *Pleurotus pulmonarius* and its correlation with oxidation activity. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, n.10, p.3587-3593.

MASAPHY, S.; LEVANON, D.; HENIS, Y. 1993. Isolation and characterization of a novel atrazine metabolite produced by the fungus *Pleurotus pulmonarius*, 2-chloro-4-ethylamino-6-(1-hydroxyisopropyl)amino-1,3,5-triazine. **Applied and Environmental Microbiology**, v.59, n.12, p.4342-4346.

MATA, G.; SAVOIE, J-M. 1998. Extracellular enzyme activities in six *Lentinula edodes* strains during cultivation on wheat straw. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.14, p.513-519.

MATHEUS, D. R. 2002. **Pesquisa do Instituto de Botânica avalia capacidade dos fungos de degradar hexaclorobenzeno e pentaclorofenol, armazenados em depósito da Rhodia na baixada santista**. Agência Estado. Disponível em: <[www.estadao.com.br](http://www.estadao.com.br)>. Acesso em: set. 2003.

MATHEUS, D. R. 2003. **Otimização da biodegradação de hexaclorobenzeno por fungos basidiomicetos em solos contaminados com resíduos industriais**. Tese de Doutorado em Ciências Biológicas – Área de Microbiologia Aplicada. Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Campus de Rio Claro. 129p.

MELO, I. 2003. **Biotecnologia – a biorremediação e os poluentes**. Disponível em:<<http://www.quimica.com.br>>. Acesso em: set. 2003.

MAFF (Ministry of Agriculture, Food and Fisheries – British Columbia). 2004. Use of spent mushroom compost. **In: Resource management – environmental guidelines for mushroom producers**. Disponível em: <<http://www.agf.gov.bc.ca>>. Acesso em: jul. 2004.

MONTEIRO, R. T. 1997. Degradação de pesticidas. **In: Microbiologia ambiental**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA (Centro Nacional de Pesquisa de Monitoramento e Avaliação de Impacto Ambiental), p. 107-124.

MOREIRA, M. A.; FONTES, P. C. R.; CAMARGOS, M. I. 2001. Interação zinco e fósforo em solução nutritiva influenciando o crescimento e a produtividade da alface. **Revista PAB – Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.36, n.6, p.903-909.

MOUGIN, C.; LAUGERO, C.; ASTHER, M.; DUBROCA, J.; FRASSE, P.; ASTHER, M. 1994. Biotransformation of the herbicide atrazine by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.60, n.2, p.705-708.

N'DAYEGAMIYE, A.; ISFAN, D. 1991. Chemical and biological changes in compost of wood shaving sawdust and peat moss. **Canadian Journal of Soil Science**, v.71, p.475-484.

NEVES, M. A. 2000. **Caracterização ecológica, fisiológica e genética de *Agaricus blazei* Murrill através de estirpes provenientes de diferentes empresas de produção de cogumelos**. Dissertação de Mestrado em Biotecnologia. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC. 69pp.

NOVOTNÝ, C.; ERBANOVÁ, P.; SASEK, V.; KUBÁTOVÁ, A.; CAJTHAML, T.; LANG, E.; KRAHL, J.; ZADRAZIL, F. 1999. Extracellular oxidative enzyme production and PAH removal in soil by exploratory mycelium of white rot fungi. **Biodegradation**, v.10, p.159-168.

OKEKE, B. C.; SMITH, J. E.; PATERSON, A.; WATSON-CRAIK, I. A. 1993. Aerobic metabolism of pentachlorophenol by spent sawdust culture of “shiitake” mushroom (*Lentinus edodes*) in soil. **Biotechnology Letters**, v.15, n.10, p.1077-1080.

PARDO, A.; JUAN, J. A.; PARDO, J. E. 2003. Characterisation of different substrates for possible use as casing in mushroom cultivation. **Food, Agriculture & Environment**, v.1, n.1, p.107-114.

RAIZ, B. V.; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J. A.; FURLANI, A. M. C. 1997. **Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo**. Foletim Técnico N° 100, 2 ed., Governo do Estado de São Paulo, Secretaria de Agricultura e Abastecimento, Coordenadoria de Pesquisa Agropecuária, Campinas: Instituto Agrônomo. 285p.

RASODEVICH, M.; TRAINA, S.; HAO, Y.; TUOVINEN, O. H. 1995. Degradation and mineralization of atrazine by soil bacterium isolate. **Applied Environmental and Microbiology**, v.61, p.297-302.

RIBAS, L. C. C. 2003. **Aproveitamento de resíduos agro-industriais lignocelulósicos para o cultivo de cogumelos comestíveis shiitake [*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler] em Santa Catarina**. Trabalho de Conclusão de Curso em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 100p.

RIBAS, L. C. C.; VILLELA, S. M.; SOARES, C. H. L.; MENDONÇA, M. M. 2005. Caracterização da atividade da lacase produzida por *Agaricus brasiliensis* e *Pleurotus ostreatus* de acordo com o potencial hidrogeniônico e perspectivas de aplicações. **In: Anais do Symposium on Enzymatic Hydrolises of Biomass**. Maringá: Universidade Estadual de Maringá. p.143.

RINKER, D. L. 2002. **Handling and using “spent mushroom substrate” around the world (2)**. Disponível em: <<http://www.mushworld.com>>. Acesso em: ago. 2003.

RINKER, D. L. 2004. Handling and using “spent” mushroom substrate around the world (part two). **Tips** (a publication in support of mushrooms growers), mar. Disponível em: <<http://setas cultivadas.com>>. Acesso em: jun. 2004.

RODRIGUES, E. T. 1990. **Efeitos das adubações orgânica e mineral sobre o acúmulo de nutrientes e sobre o crescimento da alface (*Lactuca sativa* L.)**. Tese de Mestrado. Viçosa, MG: UFV, Impr. Univ. 60p.

RODRIGUES, B. N.; ALMEIDA, F. S. 1995. **Guia de Herbicidas**. 2 ed., Londrina: Edição dos Autores. 675p.

RUIZ-AGUILAR, G. L.; FERNÁNDEZ-SANCHEZ, J. M.; RODRÍGUEZ-VAZQUEZ, R.; POGGIO-VARALDO, H. 2002. Degradation by white-rot fungi of high concentrations of PCB extracted from a contaminated soil. **Advances in Environmental Research**, v.6, p.559-568.

SANTOS, I. C.; CASALI, V. W. D.; MIRANDA, G. V. 1998. Comportamento de dez cultivares de alface adubadas com composto de lixo urbano. **Revista PAB – Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.33, n.2, p.157-161.

SANTOS, R. H. S.; SILVA, F.; CASALI, V. W. D.; CONDE, A. R. 2001. Efeito residual da adubação com composto orgânico sobre o crescimento e produção de alface. **Revista PAB – Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.36, p.1395-1398.

SEMPLE, K. T.; FERMOR, T. R. 1997. Enhanced mineralization of  $UL-^{14}C$ -pentachlorophenol by mushroom composts. **Research in Microbiology**, v.148, p.795-798.

SEMPLE, K. T.; WATTS, N. U.; FERMOR, T. R. 1998. Factors affecting the mineralization of  $[U-^{14}C]$ benzene in spent mushroom substrate. **FEMS Microbiology Letters**, v.164, p.317-321.

SERMANNI, G. G.; D'ANNIBALE, A.; LENA, G.; VITALE, N. S.; MATTIA, E.; MINELLI, V. 1994. The production of exo-enzymes by *Lentinus edodes* and *Pleurotus ostreatus* and their use for upgrading corn straw. **Bioresource Technology**, v.48, p.173-178.

SHARMA, H. S. S. 1991. Analysis of the components of lignocellulose degraded by *Agaricus bisporus* and *Pleurotus ostreatus*. **Thermochimica Acta**, v.173, p.241-52.

SHARMA, H. S. S.; FURLAN, A.; LYONS, G. 1999. Comparative assessment of chelated spent mushroom substrates as casing material for production of *Agaricus bisporus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.52, p.366-372.

SHARMA, H. S. S.; KILPATRICK, M. 2000. Mushroom (*Agaricus bisporus*) compost quality factors for predicting potential yield of fruiting bodies. **Canadian Journal of Microbiology**, v.46, p.515-519.

SHOJAOSADATI, S. A.; ELYASI, S. 1999. Removal of hydrogen sulfide by the compost biofilter with sludge of leather industry. **Resources, Conservation and Recycling**, v.27, p.139-144.

SILVA, E. M.; MACHUCA, A.; MILAGRES, A. M. F. 2005a. Evaluating the growth and enzyme production from *Lentinula edodes* strains. **Process Biochemistry**, v.40, p.161-164.

SILVA, E. M.; MACHUCA, A.; MILAGRES, A. M. F. 2005b. Effect of cereal brans on *Lentinula edodes* growth and enzyme activities during cultivation on forestry waste. **Letters in Applied Microbiology**, v.40, p.283-288.

SILVA, E. M.; MILAGRES, A. M. F. 2003. Study on hidrolases activities produced by *Lentinula edodes* during the degradation of eucalyptus residues. In: **Anais do XIV Simpósio Nacional de Fermentações**. Florianópolis, Santa Catarina.

SILVA FILHO, G. N.; OLIVEIRA, V. L. 2004. **Microbiologia – manual de aulas práticas**. Florianópolis: Editora da UFSC. 155p.

SILVA JÚNIOR; A. A.; SOPRANO, E. 1997. **Caracterização de sintomas visuais de deficiências nutricionais em alface**. Boletim Técnico N° 87, Florianópolis: EPAGRI – Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina S. A. 57p.

SINDAG (Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola – Brasil). 2003. **Consumo mundial**. Disponível em: <<http://www.sindag.com.br>>. Acesso em: jun. 2004.

SMITH, S. R.; HADLEY, P. 1989. A comparison of organic and inorganic nitrogen fertilizers: their nitrate-N and ammonium-N release characteristics and effects on the growth response of lettuce (*Lactuca sativa* L. cv. Fortune). **Plant and Soil**, v.115, n.1, p.135-144.

STAMETS, P. 2000. **Growing gourmet & medicinal mushrooms**. 3 ed, Berkeley, California: Ten Speed Press. 552p.

STOTZKY, G. 1965. Microbial respiration. In: BLACK, C. A. ed. **Methods of soil analysis**. Madison, American Society of Agronomy. v2, cap.113, p.1551-72.

TEDESCO, M. J.; GIANELLO, C.; BISSANI, C. A.; BOHNGN,H.; VOLKWEISS, S. J. 1995. **Análise de solo, plantas e outros materiais**. 2 ed., Departamento de Solos da Faculdade de Agronomia da Universidade do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 174p.

TRANI, P. E.; TIVELLI, S. W.; PURQUERIO, L. F. V.; AZEVEDO FILHO, J. A. 2005. **Hortaliças – Alface (*Lactuca sativa* L.)**. Foletim 200. Instituto Agrônômico – IAC, Centro de Análise e Pesquisa Tecnológica do Agronegócio de Horticultura. Disponível em: <<http://www.iac.sp.gov.br>>. Acesso em: set. 2005.

TRAPÉ, A. Z. 2002. Efeitos toxicológicos e registro de intoxicações por agrotóxicos. **In: Programa de defesa ambiental rural – textos orientadores**. Fórum Nacional de Secretários de Agricultura: Ministério do Meio Ambiente, p.45-59.

TREJO-HERNANDEZ, M. R.; LOPEZ-MUNGUIA, A.; RAMIREZ, R. Q. 2001. Residual compost of *Agaricus bisporus* as a source of crude laccase for enzymic oxidation of phenolic compounds. **Process Biochemistry**, v.36, p.635-639.

UETA, J.; PEREIRA, N. L.; SHUHAMA, I. K.; CERDEIRA, A. L. 1999. Biodegradação de herbicidas e biorremediação – microorganismos degradadores do herbicida atrazina. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, ano 2, n.10, set/out.

URBEN, A. F.; CORREIA, M. J. 2001. Biologia, morfologia, fisiologia e reprodução de cogumelos. **In: Produção de cogumelos por meio de tecnologia chinesa modificada**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. 151p.

VASIL'CHENKO, L. G.; KHROMONYGINA, V. V.; KOROLEVA, O. V.; LANDESMAN, E. O.; GAPONENKO, V. V.; KOVALEVA, T. A.; KOZLOV, Y. P.; RADONOVICH, M. L. 2002. Consumption of triazine herbicide atrazine by laccase-positive and laccase-negative strains of soil fungus *Mycelia sterilia* INBI 2-26. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v.38, n.5, p.454-459.

VYAS, B. R. M.; MOLITORIS, H. P. 1995. Involvement of an extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dependent ligninolytic activity of the white rot fungus *Pleurotus ostreatus* in the decolorization of Remazol Brilliant Blue R. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, n.11, p.3919-3927.

WARNCKE, D. D.; KRAUSKOPF, D. M. 1983. **Greenhouse growth media: testing and nutrition guidelines**. Michigan State Univ. Coop. Serv. Bull. E-1736.

WASSER, S. P.; WEIS, A. L. 1999. General description of the most important medicinal higher basidiomycetes mushrooms – 1. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v.1, p.351-370.

WASSER, S. P.; DIDUKH, M. Y.; AMAZONAS, M. A. L. A.; NEVO, E.; STAMETS, P.; EIRA, A. F. 2002. Is a widely cultivated culinary-medicinal royal sun *Agaricus* (the Himematsutake mushroom) indeed *Agaricus blazei* Murrill? **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v.4, p.290-297.

WATSON, M. E. 2003. **Testing compost**. The State University Fact Sheet, Agriculture and Natural Resources. Disponível em: <<http://ohioline.osu.edu>>. Acesso em: jun. 2004.

WILLIAMS, B. C.; McMULLAN, J. T.; McCAHEY, S. 2001. An initial assessment of spent mushroom compost as a potential energy feedstock. **Bioresource Technology**, v.79, p.227-230.

WOLLUM II, A.G. 1982. Cultural methods for soil microorganisms. In: Page, A. L. (Ed), **Methods of soil analysis**, Part II. American Society of Agronomy, Madison, pp.781-802.

Woods End Research Laboratory. 1998-2000. Interpretation of waste & compost test. **Journal of the Woods End Research Laboratory**, v.1, n.4. p.1-6. Disponível em: <<http://www.woodsend.org/compost.pdf>>. Acesso em: jun. 2004.

WUEST, P. J.; FAHY, H. K.; FAHY, J. 1995. Use of spent mushroom substrate (SMS) for corn (*Maize*) production and its effect on surface water quality. **Compost Science & Utilization**, v.3, n.1, p.46-54.

YAMANAKA, K. 1997. Production of cultivated edible mushrooms. **Food Reviews International**, v.13, n.3, p.327-333.

ZHANG, C. K.; GONG, F.; LI, D. S. 1994. A note on the utilization of spent mushroom composts in animal feeds. **Bioresource Technology**, v. 52, p. 89-91.

ZIBILSKE, L. M. Carbon mineralization – chapter 8. p.835-863. **In: Methods of soil analysis; Part 2 – Microbiological and biochemical properties**; SSSA Book Series 5. Published by: Soil Science Society of America, Inc. 1994. 1121p.

ZUCCONI, F.; PERA, A.; FORTE, M.; BERTOLDI, M. 1981. Evaluating toxicity of immature compost. **BioCycle**, v.22, p.54-57.

# **ANEXOS**

## ANEXO 1

Tabela com características físicas e químicas do composto residual da produção de *A. brasiliensis* com camada de cobertura de turfa e de solo, e do composto residual de *L. edodes*, utilizados nas experimentações de desenvolvimento de *Lactuca sativa* (alface).

Parâmetro	Composto residual (CR)					
	Cultivo de <i>A. brasiliensis</i> com camada à base de turfa		Cultivo de <i>A. brasiliensis</i> com camada à base de solo		Cultivo de <i>L. edodes</i>	
	Matéria úmida	Matéria seca	Matéria úmida	Matéria seca	Matéria úmida	Matéria seca
pH em CaCl <sub>2</sub>	7,4	-	8,1	-	4,2	-
Densidade (g/cm <sup>3</sup> )	0,70	-	0,84	-	0,20	-
Umidade perdida a 60-65°C (%)	45,25	-	27,76	-	13,84	-
Umidade perdida a 65-110°C (%)	3,67	-	0,90	-	4,79	-
Umidade total (%)	48,92	0,00	48,92	0,00	18,63	0,00
Inertes	0,00	-	0,00	-	0,00	-
Matéria orgânica total (combustão) (%)	26,52	51,92	10,82	15,17	74,04	90,99
M.O. compostável (%)	25,77	50,45	7,77	10,89	73,84	90,75
M.O. resistente à compostagem (%)	0,75	1,47	3,05	4,28	0,20	0,25
Carbono total (orgânico e mineral) (%)	14,73	28,84	6,01	8,42	41,13	50,55
Carbono orgânico (%)	14,32	28,03	4,32	6,06	41,02	50,41
Resíduo mineral total (%)	24,56	48,08	60,52	84,83	7,33	9,01
Resíduo mineral insolúvel (%)	6,97	13,65	50,91	71,36	1,62	1,99
Resíduo mineral solúvel (%)	17,59	34,44	9,61	13,47	5,71	7,02
Nitrogênio total (%)	0,93	1,82	0,50	0,70	0,48	0,59
Fósforo (P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> ) total (%)	0,92	1,80	0,75	1,05	0,47	0,58
Potássio (K <sub>2</sub> O) total (%)	0,69	1,35	0,65	0,91	0,14	0,17
Cálcio (Ca) total (%)	5,61	10,98	1,09	1,53	2,09	2,57
Magnésio (Mg) total (%)	0,37	0,72	0,18	0,25	0,20	0,25
Enxofre (S) total (%)	0,90	1,76	0,53	0,74	0,08	0,10
Relação C/N (C total e N total)	16/1	16/1	12/1	12/1	86/1	86/1
Relação C/N (C orgânico e N total)	15/1	15/1	9/1	9/1	86/1	86/1

Análises realizadas pela Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESALQ/USP): Av. Pádua Dias, 11, CP.09, Piracicaba, SP, Cep 13418-900; home-page: <http://www.esalq.usp.br>.

## ANEXO 2

Tabela com características físicas e químicas do solo utilizado no experimento de fertilização de *Lactuca sativa* (alface).

Parâmetro avaliado		
Textura (1)		Classe 4 (16% argila)
Textura (2)*	Areia grossa	42 %
	Areia fina	36 %
	Areia total	78%
	Silte total	8%
	Argila total	14 %
pH		5,2 (baixo)
Índice SMP		6,0
Fósforo		14,5 ppm (médio)
Potássio		35 ppm (muito baixo)
Matéria orgânica		1,8 % (baixo)
Alumínio		0,6 cmolc/L
Cálcio		1,9 (baixo) cmolc/L
Magnésio		0,6 (médio) cmolc/L
Sódio – Na		4 ppm
H + Al		3,56 cmolc/L
pH – CaCl <sub>2</sub>		4,4 (alta)
Soma de bases – S		2,61 cmolc/L (média)
Cap. troca cátions CTC		6,17 cmolc/L (média)
Saturação de bases - V		42,25 % (baixa)

\* Análise realizada pela Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP): Av. Pádua Dias, 11, CP.09, Piracicaba, SP, Cep 13418-900; home-page: <http://www.esalq.usp.br>. Demais análises: Laboratório da Companhia Integrada de Desenvolvimento Agrícola de SC (CIDASC): Rod. Admar Gonzaga, 1588, CP.256, Florianópolis, SC, Cep 88034-001; home-page: <http://www.cidasc.sc.gov.br>

- Análise de granulometria (textura) ESALQ: Método do Densímetro. Clases de diâmetro (mm): Grossa = 2-0,25; Fina = 0,25-0,05. Classes de textura: até 14%-arenosa; 15-24% - média-arenosa; 25-34% - média-argilosa; 35-59% - argilosa; 60% ou superior – muito argilosa.

- Interpretação CIDASC: conforme “Recomendações de adubação e calagem para os estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina, 2.ed, SBCS – Núcleo Regional Sul / EMBRAPA-CNPT, 1989. Para determinações pH CaCl<sub>2</sub>, S, CTC, V, cfe: “Boletim Técnico n.31 – Emater / Paraná.

### ANEXO 3

Interpretação da concentração de sais solúveis de compostos usados como meio de crescimento vegetal em casa de vegetação. Fonte: WARNCKE; KRAUSKOPF, 1983.

<b>Condutividade Elétrica (mS/cm*)</b>	<b>Interpretação</b>
0,00 – 0,12	<u>Muito baixa</u> - indica muito baixa concentração de nutrientes; sementes podem germinar.
0,13 – 0,34	<u>Baixa</u> - faixa que sustenta o desenvolvimento das sementes e plantas sensíveis; plantas podem apresentar deficiência e crescimento retardado.
0,35 – 0,64	<u>Desejável</u> para a maioria das plantas, mas pode ser elevada para algumas plantas.
0,65 – 0,89	<u>Elevada</u> e desejável para a maioria das plantas; perda de vigor vegetal para valores mais elevados da faixa.
0,90 – 1,10	Reduz o crescimento e o vigor vegetal.
> 1,10	Inibe severamente o crescimento vegetal; plantas usualmente morrem.

\*dS/m ou mmhos/cm (método 1:5 – v/v).