



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

Judith Paola Urón Santiago

Bactérias produtoras da enzima ACC deaminase no crescimento e desenvolvimento de cogumelos comestíveis de *Pleurotus ostreatus*

Florianópolis

2021

Judith Paola Urón Santiago

Bactérias produtoras da enzima ACC deaminase no crescimento e desenvolvimento de cogumelos comestíveis de *Pleurotus ostreatus*

Tese submetida ao Programa de Biotecnologia e
Biociências da Universidade Federal de Santa
Catarina para a obtenção do título de doutor em
Biotecnologia e Biociências
Orientador: Prof. Dr. Admir José Giachini

Florianópolis

2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Santiago, Judith Paola Urón
Bactérias produtoras da enzima ACC deaminase no
crescimento e desenvolvimento do cogumelo comestível
Pleurotus ostreatus / Judith Paola Urón Santiago ;
orientador, Admir Giachini , 2021.
129 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós
Graduação em Biotecnologia e Biociências, Florianópolis,
2021.

Inclui referências.

1. Biotecnologia e Biociências. 2. Pleurotus ostreatus,
Cogumelos comestíveis, Etileno, enzima ACC deaminase. 3.
Produção comercial de cogumelos, fructificação. I. , Admir
Giachini. II. Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências.
III. Título.

Judith Paola Urón Santiago

Bactérias produtoras da enzima ACC deaminase no crescimento e desenvolvimento de cogumelos comestíveis de *Pleurotus ostreatus*

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Edgardo Albertó, Dr.

Instituto Tecnológico de Chascomús (INTECH, Argentina)

Prof. Eduardo Purgatto Dr.

Universidade de São Paulo (USP)

Dra. Carla Máisa Camelini

Sole Vitae Cosméticos

Prof. Rubens Tadeu Delgado Duarte

Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Dr. Santiago Jaramillo

Instituto Tecnológico de Chascomús (INTECH, Argentina)

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de doutor em Biotecnologia e Biociências.

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof. Dr. Admir José Giachini

Orientador

Florianópolis, 2021.

Este trabalho é dedicado aos meus queridos pais, Mary e Hernán.

AGRADECIMENTOS

Empreender uma pesquisa certamente envolve um árduo trabalho que não se limita à área acadêmica, abrange também um grande esforço emocional que finalmente nos prepara para encarar os desafios de cada dia, pessoais e profissionais. Isso não seria possível sem a colaboração e companhia de muitas pessoas. Por isso, gostaria de expressar aqui a minha gratidão. Conhecer o Brasil foi um presente que me possibilitou ter não somente a oportunidade de crescer profissionalmente, mas ter um segundo país para ser chamado de lar.

Agradeço a meu irmão Camilo, que me acolheu neste país junto com a vontade de continuar meu aprendizado acadêmico, sou grata a você por me apresentar outra cultura e com isso a riqueza e o desafio de aprender uma nova língua e experimentar novos sabores. Obrigada por apoiar meus sonhos e projetos.

Aos meus pais, Mary e Hernán, que apesar da distância, me mantiveram perto de casa, perto das minhas raízes, das minhas memórias, obrigada pela fé que me transmitiram para viver cada dia e ter uma desculpa para amar ainda mais a nossa terra, a Colômbia.

Agradeço ao Juan Camilo, meu esposo e meu amigo, a quem conheci durante esta jornada, você trouxe mais alegria a meus dias e me contagiou com sua paixão pelo universo e a natureza. Obrigada por me incentivar a estudar o mundo dos cogumelos e por me apoiar em cada etapa deste caminho. A seu lado descobri que a liberdade se aproveita mais quando se compartilha com as pessoas que amamos.

Sou grata aos novos amigos que fiz durante minha passagem pelo Brasil, pessoas cálidas e sorridentes que fizeram meu trabalho ainda mais prazeroso e as cargas da pesquisa mais leves. À Débora Cabral, pela sua amizade e carinho, você é uma pessoa maravilhosa que com seu sorriso sempre trouxe um toque de alegria às nossas conversas, obrigada pelos áudios engraçados que alegraram a minha rotina durante a quarentena e claro, pelo seu apoio com meu trabalho. À Carolina Herrera com quem compartilhamos tantas coisas em comum, que também veio ao Brasil em busca de um sonho, parece que nos conhecemos desde sempre, obrigada pelo seu apoio permanente, pelo seu carinho fraterno, por estar sempre presente. À minha irmã portuguesa, Maria Tavares, que fez meus dias no laboratório mais coloridos, você é a prova de que não necessitamos muito tempo para reconhecer os verdadeiros amigos, obrigada pela sua alegria e pelo seu jeito brincalhão que fizeram meu trabalho mais divertido.

Ao Francisco de Nascimento, meu colega e amigo, sou imensamente grata a você por ter me acolhido num projeto de pesquisa tão interessante e desafiador, obrigada por me permitir “brincar” com suas bactérias e pela sua generosidade durante a pesquisa, pelas discussões e contribuições ao meu trabalho, pela sua amizade. Ao Pedro Brandão, que apesar de passar um tempo muito curto no laboratório sempre esteve disposto a me ajudar, obrigada pela sua amizade e colaboração. À Margareth e ao Alejandro, meus queridos amigos colombianos, obrigada pela amizade, pela companhia durante meu doutorado e pelo carinho. À Joice Frank, a minha querida estagiária, pela sua ajuda com as colheitas dos cogumelos nos experimentos de laboratório, pela sua boa energia e disposição para trabalhar. Agradeço a todos os meus colegas de laboratório, especialmente a Douglas que desde o início do doutorado me fez sentir bem-vinda e me ensinou a usar os equipamentos do laboratório, obrigada por dar sempre um jeito de me ajudar. À Elizandra, pela imensa ajuda com os experimentos na casa de vegetação, que embora não apareçam neste trabalho contribuíram a meu conhecimento sobre as interações entre plantas e bactérias. À Shantau, pela disposição para ajudar e pelas conversas sobre as comidinhas colombianas, à Joaquina e Sheila, obrigada pelas risadas entre o café e os deliciosos bolos preparados pela joaquina, foi um prazer compartilhar com vocês mesmo no finalzinho do doutorado e à Carol, pelas conversas descontraídas que fizeram mais fácil meu dia a dia.

Agradeço a todos os professores que contribuíram à minha formação acadêmica, ao meu orientador Admir Giachini por ter possibilitado meu crescimento profissional, pela confiança que me permitiu aprender, correr atrás e pesquisar, me equivocar e começar de novo, pelo apoio constante, obrigada! ao professor Márcio Rossi, por todos seus ensinamentos, obrigada por me treinar no encapsulamento dos fungos e pela imensa ajuda com a montagem da estufa dos cogumelos, agradeço ao professor Rubens Duarte pela disposição para ajudar e ensinar, para trocar ideias, por estar sempre aberto a discussões e por contagiar ao laboratório com a curiosidade pelos microrganismos extremófilos, ao professor Cláudio pela ajuda sempre que precisei, ao professor Maurício Reis pela valiosa ajuda com a estatística, obrigada por me mostrar o caminho para aprender e para entender que o aprendizado da pesquisa vai além da média e do valor p , muito obrigada pelo tempo que me dedicou! Sou grata ao professor Eduardo Purgatto, por ter me aceitado para realizar meu desejado estágio na USP, foi um privilégio formar parte do seu grupo embora por pouco tempo, obrigada pela generosidade

para discutir sobre as curvas de etileno comigo, pela oportunidade de aprender um pouco mais e pelas suas valiosas contribuições.

Agradeço a todos meus colegas do Laboratório de Química, Bioquímica e Biologia Molecular de Alimentos da USP por me fazerem sentir sempre bem-vinda desde o início, por me acolherem, por fazer de São Paulo, uma cidade muito grata para mim. Agradeço especialmente à minha amiga Naissa pela companhia durante as longas corridas das curvas de etileno, pelas conversas maravilhosas e as risadas e à Candela, pela sua linda amizade, por alegrar meus dias e descobrir comigo comidinhas novas nas feiras veganas em São Paulo. Obrigada às queridas auxiliares Aline, Lúcia, Tânia e Luciene, pela disposição para me ajudar, obrigada Lúcia pelas caronas e pelas piadas, por me auxiliar no dia a dia, à Aline pela ajuda com as análises de proteína e muito mais, à Tânia pela ajuda com as análises de etileno, por me salvar sempre que precisei e à Luciene pela disposição para ajudar sempre.

Agradeço muito especialmente à professora Margarida Mendonça, dona da *Fungi Brasilis*, pela grandiosa oportunidade de realizar os experimentos de cogumelos na sua empresa. Obrigada professora pela sua generosidade, pela confiança, por ter compartilhado comigo seus ensinamentos, por ter possibilitado juntar a pesquisa à indústria e conhecer o dia a dia do cultivo comercial de cogumelos. Foi um verdadeiro privilégio ser parte do seu grupo de colaboradores, obrigada por me incentivar a seguir meu próprio caminho e por fazer crescer em mim o amor pelos fungos, por me contagiar com sua paixão pela pesquisa. Agradeço também a todo o pessoal da *Fungi Brasilis*: Luiz, Geraldine, Guilherme, Anderson, Simone e Rose, que me receberam com tanto carinho e que me apoiaram em todo momento.

Agradeço a todas as pessoas que durante esses anos me ajudaram de alguma forma, cujos nomes não aparecem aqui, mas que estão representados ao longo do trabalho.

À Universidade Federal de Santa Catarina, por ter me acolhido durante todos esses anos como aluna de pós-graduação, ao programa de pós-graduação em Biotecnologia e Biociências pela oportunidade de me formar cientificamente, à coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior (CAPES) pelo valioso auxílio da bolsa que me possibilitou me dedicar à pesquisa. Agradeço aos meus queridos cogumelos, que me permitiram estudá-los, brincar com eles, aprender, me surpreender; vê-los frutificar foi uma alegria enorme e espero continuar aprendendo muito mais com vocês!

Por último, mas não menos importante, agradeço a Deus pelo dom da vida e da consciência, que me permite me surpreender e me maravilhar com os presentes de cada dia, pela oportunidade de vivenciar todas essas experiências tão desafiadoras e gratificantes e pela gratidão que sinto hoje de poder compartilhar este trabalho com outras pessoas.

RESUMO

O co-cultivo de bactérias produtoras da enzima ACC deaminase (ACCD) com fungos comestíveis é uma estratégia que pode melhorar a frutificação de fungos basidiomicetos, característica importante na produção de cogumelos. Seu efeito benéfico reside na capacidade destas bactérias em reduzir os níveis de etileno produzidos por certos fungos. O etileno é um hormônio que regula o desenvolvimento de plantas. Neste aspecto, existem evidências que o mesmo possa acontecer em fungos. Considerando esta hipótese, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de bactérias com atividade ACCD na frutificação de *P. ostreatus* cultivado *in vitro* e em condições comerciais. Para isso, foram avaliadas três cepas com atividade ACCD: *Pseudomonas putida* UW4 *acdS*⁺, *Pseudomonas fluorescens* YsS6 *acdS*⁺, e *Pseudomonas palleroriana* MAB3 *acdS*⁺. Adicionalmente, foi avaliada uma cepa sem atividade ACCD, *Pseudomonas* sp. PL3, assim como cepas mutantes das bactérias *P. putida* e *P. fluorescens* (sem o gene *acdS*) para verificar o efeito da presença/ausência da enzima ACC deaminase no desenvolvimento fúngico. O efeito de *P. putida* no conteúdo proteico de *P. ostreatus* também foi investigado. Para o co-cultivo do fungo no substrato de frutificação, as bactérias foram adicionadas empregando dois métodos de inoculação: em forma líquida e encapsuladas junto ao fungo em esferas de alginato de sódio. O etileno produzido pelo fungo co-cultivado com *P. putida* UW4 *acdS*⁺ e sua mutante também foi mensurado usando cromatografia gasosa. Os resultados mostraram que, em condições de laboratório, *P. putida* UW4 *acdS*⁺ aumentou significativamente a produção de cogumelos em mais de 30%, enquanto que para *P. fluorescens* YsS6 esse efeito não foi evidenciado. Além disso, o conteúdo de proteína do fungo aumentou em mais de 40% quando o fungo foi co-cultivado com *P. putida*. Quanto ao método de inoculação, *P. putida* UW4 *acdS*⁺ se mostrou efetiva nos dois métodos de inoculação, tendo aumentos na produção de mais de 60%. Em condições comerciais, *P. putida* UW4 *acdS*⁺ e *P. palleroriana* MAB3 adicionadas em su forma líquida aumentaram a produção em mais de 20%. O tratamento contendo a bactéria encapsulada (PL+UW4+) e o tratamento PL3 não foram estatisticamente diferentes do controle. O co-cultivo do fungo com *P. putida* UW4 *acdS*⁺ *in vitro* diminuiu os níveis de etileno produzidos pelo fungo. Os resultados demonstram que bactérias com atividade ACCD melhoram a frutificação de *P. ostreatus*, o que mostra seu potencial para serem empregadas no cultivo comercial de fungos produtores de cogumelos comestíveis.

Palavras chave: Bactérias produtoras da enzima ACC deaminase. Fungos comestíveis. Etileno. *Pleurotus ostreatus*. *Pseudomonas putida*. Cultivo comercial.

ABSTRACT

Co-cultivation of ACC deaminase-producing bacteria (ACCD) with edible fungi is a strategy that can improve the fructification of basidiomycete fungi, an important characteristic in mushroom production. Its beneficial effect lies in the ability of these bacteria to reduce the levels of ethylene produced by certain fungi. Ethylene is a hormone that in plants regulates their development and there is evidence that it has the same effect on fungi. Considering this hypothesis, the objective of this work was to evaluate the effect of bacteria with ACCD activity on the fruiting of *P. ostreatus* cultivated *in vitro* and under commercial conditions. To this end, three strains with ACCD activity were evaluated: *Pseudomonas putida* UW4 *acdS*⁺, *Pseudomonas fluorescens* YsS6 *acdS*⁺, and *Pseudomonas palleroriana* MAB3 *acdS*⁺ and three strains without ACCD activity: *P. putida* UW4 *acdS*⁻, *P. fluorescens* YsS6 *acdS*⁻, and *Pseudomonas* sp PL3. The effect of *P. putida* on the protein content of *P. ostreatus* was also investigated. For co-cultivation of the fungus on the fruiting substrate, bacteria were added employing two inoculation methods: in liquid form and encapsulated together with the fungus in sodium alginate beads. The ethylene produced by the fungus co-cultured with *P. putida* UW4 *acdS*⁺ and its mutant was also measured using gas chromatography. The results showed that, under laboratory conditions, *P. putida* UW4 *acdS*⁺ significantly increased mushroom production by more than 30%, while *P. fluorescens* YsS6 showed no positive effect on the fruiting of the fungus. Moreover, the protein content of the fungus increased by more than 40% when the fungus was co-cultured with *P. putida*. As for the inoculation method, *P. putida* UW4 *acdS*⁺ proved to be effective in both methods, having an increase in production of more than 60%. Under commercial conditions, *P. putida* UW4 *acdS*⁺, and *P. palleroriana* MAB3 added in their liquid form increased production by more than 20%. The treatment containing the encapsulated bacteria (PL+UW4+) and the PL3 treatment was not different from the control. The fungus produced ethylene *in vitro*, and co-cultivation with *P. putida* UW4 *acdS*⁺ decreased the levels of ethylene produced by the fungus. The results demonstrate that bacteria with ACCD activity improve the fruiting of *P. ostreatus*, which shows their potential to be employed in the commercial cultivation of fungi producing edible mushrooms.

Keywords: ACC deaminase- producing bacteria; Edible mushroom; Ethylene; *Pleurotus ostreatus*; *Pseudomonas putida*; Commercial cultivation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 4.1 – A: Representação esquemática do desenvolvimento de um cogumelo. B: Ciclo de vida de um cogumelo.....	24
Figura 4.2 – Processo de formação dos basidiósporos em cogumelos.....	25
Figura 4.3 – Formação das fíbulas em basidiomicetos.....	26
Figura 4.4 – <i>Pleurotus ostreatus</i> var. <i>florida</i>	34
Figura 4.5 – Diferentes tipos de spawn.	41
Figura 4.6 – Estrutura química do ácido manurônico (M), ácido gulurônico (G) e suas estruturas secundárias como blocos de MM ou GG na cadeia de alginato.	43
Figura 4.7 – Procedimento geral de encapsulamento usando alginato de sódio.	44
Figura 4.8 – Modelo do mecanismo usado por rizobactérias promotoras do crescimento vegetal contendo a enzima ACC deaminase para diminuir os níveis de etileno em plantas e prevenir a inibição do alongamento das raízes causado pelo etileno	46
Figura 5.1 – Ciclo de Yang e formação de etileno e outros produtos a partir do ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC).....	63
Figura 5.2 – Representação esquemática da produção de etileno em plantas em função do tempo após ser submetida a um estresse ambiental. A: Na ausência de bactérias exógenas. B: Na presença de bactérias produtoras da enzima ACC deaminase (ACCD).	64
Figura 5.3 – Frascos de penicilina inoculados com micélio de <i>Pleurotus ostreatus</i>	68
Figura 5.4 – Perfil da produção acumulada de etileno de <i>Pleurotus ostreatus</i> ao longo do tempo.	72
Figura 5.5 – Proporção de etileno acumulado de <i>Pleurotus ostreatus</i> ao longo do tempo associado a bactérias com atividade <i>acdS</i>	75
Figura 5.6 – Produção de etileno acumulado por <i>Pleurotus ostreatus</i> inoculado com ACC.....	77
Figura 6.1 – Polimerização das cápsulas de alginato de sódio.	87
Figura 6.2 – A: Sacos de polipropileno preenchidos com 260 g de substrato comercial para o cultivo de <i>Pleurotus ostreatus</i> . B: Inoculação do substrato com o inoculante de alginato de sódio.	89
Figura 6.3 – Prateleiras empregadas para o cultivo de <i>Pleurotus ostreatus</i>	89

Figura 6.4 – Sacos sem abertura preenchidos com 600 g de substrato comercial para o cultivo de <i>Pleurotus ostreatus</i>	92
Figura 6.5 – Diferenças de colonização do substrato de <i>Pleurotus ostreatus</i>	93
Figura 6.6 – Substrato colonizado por <i>Pleurotus ostreatus</i>	93
Figura 6.7 – Colonização de <i>Pleurotus ostreatus</i> em substrato comercial. A: distribuição do inoculante no substrato. B: Colonização completa do substrato.	99
Figura 6.8 – Rendimento de <i>Pleurotus ostreatus</i> ao longo do tempo.	100
Figura 6.9 – Produtividade de <i>Pleurotus ostreatus</i>	101
Figura 7.1 – Procedimento de inoculação dos sacos de substrato utilizados na <i>Fungi Brasilis</i> . A: Adição do inoculante em cápsulas no substrato; B: dosagem das bactérias em suspensão: adição da suspensão de bactérias no substrato.....	101
Figura 7.2 – Marcação realizada nos blocos para a avaliação da colonização diária.....	111
Figura 7.3 – Estágio de desenvolvimento de <i>Pleurotus ostreatus</i> considerado como <i>shimeji</i>	112
Figura 7.4 – Sistema de furação utilizado pela empresa <i>Fungi Brasilis</i> para induzir a frutificação nos blocos colonizados.....	114
Figura 7.5 – Crescimento micelial de <i>Pleurotus ostreatus</i> em substrato comercial inoculado com inoculante em cápsulas de alginato de sódio.	
Figura 7.6 – Diferenças na colonização dos blocos de substrato inoculados com <i>Pleurotus ostreatus</i> . Marcação para o início da medição	115
Figura 7.7 – Condensação de vapor de água observado nos blocos de substrato.....	117
Figura 7.8 – Teste in vitro de colonização de <i>Pleurotus ostreatus</i>	118
Figura 7.9 – Contaminação dos blocos de substrato de produção de <i>Pleurotus ostreatus</i> .	118
Figura 7.10 – Diferentes estágios de basidiomas de <i>Pleurotus ostreatus</i>	119

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 – Produção nacional de cogumelos <i>in natura</i>	36
Tabela 5.1 – Produção bruta de etileno de <i>Pleurotus ostreatus</i>	73
Tabela 5.2 – Concentração inicial de etileno de <i>Pleurotus ostreatus</i> antes da inoculação de <i>Pseudomonas putida</i> UW4 <i>acdS</i> ⁺ e UW4 <i>acdS</i> ⁻	73
Tabela 5.3 – Análise da proporção de etileno acumulado ao longo do tempo.....	74
Tabela 5.4 –Proporção de redução do etileno de <i>Pleurotus ostreatus</i> associado a <i>Pseudomonas putida</i> com atividade <i>acdS</i>	76
Tabela 6.1 – Resumo das condições experimentais (experimento 1 e 2).	86
Tabela 6.2 – Combinações fungo-bactéria do experimento 1.	88
Tabela 6.3 – Combinações fungo-bactéria do experimento 2.	91
Tabela 6.4 – Rendimento e eficiência biológica de <i>Pleurotus ostreatus</i> cultivado em laboratório em substrato comercial (Experimento 1).	95
Tabela 6.5 – Análise de Tukey do %proteína em base seca pelo método de Kjeldahl.	97
Tabela 6.6 – Rendimento e eficiência biológica de <i>Pleurotus ostreatus</i> cultivado em laboratório em substrato comercial (Experimento 2).	99
Tabela 7.1 – Combinações fungo-bactéria utilizadas nos tratamentos.....	110
Tabela 7.2 –Rendimento e eficiência biológica de <i>Pleurotus ostreatus</i> cultivado em condições comerciais.....	121
Tabela 7.3 – Comparação estatística das médias ranqueadas dos rendimentos e eficiência biológica de <i>Pleurotus ostreatus</i> pelo teste não paramétrico de Dunn.....	122

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACC: ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico

ACCD: ACC deaminase

AcdS: gene que codifica a enzima ACC deaminase

ACS: ACC sintase

ACO: ACC oxidase

ANOVA: Análise de Variância

ANPC: Associação Nacional de Produtores de Cogumelos

BDA: Batata-dextrose-ágar

CB: cetobutirato

DO: Densidade óptica

IAA: ácido indolacético

MNM: Melin-Norkrans Modificado

PGPB: Bactérias promotoras do crescimento vegetal

PGPR: Rizobactérias promotoras do crescimento de plantas

PLP: Co-fator piridoxal fosfato

SAM: S-adenosil-metionina

TSA: Ágar triptona de soja

TSB: Caldo triptona de soja

UFC: Unidades formadoras de colônia

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	19
2	HIPÓTESE	22
3	OBJETIVO GERAL	22
4	REVISÃO DA LITERATURA	23
4.1	CICLO DE VIDA DOS FUNGOS.....	23
4.2	PRODUÇÃO DAS ESTRUTURAS REPRODUTIVAS DOS FUNGOS	26
4.2.1	Luz	27
4.2.2	O₂	28
4.2.3	Umidade Relativa	28
4.2.4	Temperatura	29
4.2.5	CO₂	29
4.2.6	pH	30
4.2.7	Nutrientes	30
4.3	<i>PLEUROTUS</i>	32
4.4	PRODUÇÃO MUNDIAL DE COGUMELOS COMESTÍVEIS	34
4.5	PRODUÇÃO E CONSUMO DE COGUMELOS COMESTÍVEIS NO BRASIL	35
4.6	PROPIEDADES NUTRICIONAIS DOS COGUMELOS COMESTÍVEIS.....	37
4.7	PRODUÇÃO COMERCIAL DE COGUMELOS COMESTÍVEIS	39
4.7.1	Substratos de produção	39
4.7.2	O <i>spawn</i> na produção de cogumelos comestíveis	41
4.7.3	Produção de cogumelos comestíveis empregando <i>spawn</i> encapsulado em alginato de sódio	42
4.8	ASSOCIAÇÕES BENÉFICAS ENTRE ESPÉCIES BIOLÓGICAS	44
4.9	ACC DEAMINASE.....	49
5	CAPÍTULO I	62

5.1	INTRODUÇÃO	63
5.2	MATERIAL E MÉTODOS	67
5.2.1	Cepas	67
5.2.2	Perfil temporal de produção de etileno de <i>Pleurotus ostreatus</i>	68
5.2.2.1	Preparo das amostras e tratamentos	68
5.2.3	Estimativas de produção de etileno de <i>Pleurotus ostreatus</i>	69
5.2.4	Influência do ácido 1-carboxílico-1-aminociclopropano (ACC) na produção de etileno de <i>Pleurotus ostreatus</i>	71
5.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	71
5.3.1	Perfil temporal de produção de Etileno de <i>Pleurotus ostreatus</i>	71
5.3.2	Efeito da inoculação de bactérias com atividade <i>acdS</i> no perfil de produção de etileno de <i>Pleurotus ostreatus</i>	73
5.3.3	Via de biossíntese de etileno em <i>Pleurotus ostreatus</i>	76
5.4	CONCLUSÕES	77
6	CAPÍTULO II	83
6.1	INTRODUÇÃO	84
6.2	MATERIAIS E MÉTODOS	85
6.2.1	Cepas	85
6.2.2	Desenho experimental.....	86
6.2.2.1	Experimento 1	86
6.2.2.1.1	Análise de proteína	91
6.2.2.2	Experimento 2	91
6.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	93
6.3.1	Experimento 1	93
6.3.1.1	Colonização	93
6.3.1.2	Frutificação	94

6.3.1.3 Conteúdo de proteína.....	97
6.3.2 Experimento 2	98
6.3.2.1 Colonização	98
6.3.2.2 Frutificação	98
7 CAPÍTULO III.....	106
7.1 INTRODUÇÃO	107
7.2 MATERIAIS E MÉTODOS	109
7.2.1. Cepas	109
7.2.2 Desenho Experimental.....	109
7.2.3 Inoculação dos blocos de substrato	111
7.2.5 Indução da frutificação	112
7.2.6. Colonização <i>in vitro</i> de <i>Pleurotus ostreatus</i>	115
7.3 RESULTADOS E DISCUSSAO	115
7.3.1 Colonização.....	115
7.3.2. Colonização <i>in vitro</i> de <i>Pleurotus ostreatus</i>	117
7.3.3 Frutificação.....	119
7.4 CONCLUSÕES	124
8 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS	129

1 INTRODUÇÃO GERAL

Os cogumelos são estruturas produzidas por fungos que pertencem aos filos Ascomycota e Basidiomycota. São também chamados de corpos de frutificação, ascomas (Ascomycota) ou basidiomas (Basidiomycota). Os cogumelos representam a estrutura reprodutiva dos fungos, sendo geradas com o intuito de disseminar as espécies pela produção de esporos. No ambiente sua frequência é ditada por eventos ligados às alterações de variáveis ambientais importantes como o fotoperíodo, a temperatura e a disponibilidade de água e nutrientes. Cogumelos são gerados a partir de diferentes hábitos dos fungos produtores, podendo ser desde estruturas saprotróficas (que decompõem matéria morta) até estruturas produzidas por fungos associativos, como é o caso dos fungos ectomicorrízicos (WEBSTER & WEBER, 2010). Dentre os Basidiomicetos temos tanto o grupo dos saprotróficos que decompõem madeira, característica que lhes confere um papel ecológico muito importante na reciclagem de materiais derivados da lignina, como espécies associativas, as ectomicorrizas.

Cogumelos são comestíveis pelas suas propriedades nutricionais e terapêuticas, sendo, dessa forma destinadas ao cultivo comercial (ESPOSITO, 2010). A produção comercial de cogumelos contribui para o aumento do consumo de proteína no mundo, especialmente em países desenvolvidos onde os resíduos industriais podem ser aproveitados como substrato para o crescimento desses fungos. Além disso, o composto resultante da produção pode ser utilizado como fertilizante natural para o solo (CHANG & MILES, 1984).

A China destaca-se como o maior produtor de cogumelos, produzindo cerca de 50% da produção mundial, seguido por Estados Unidos e Ásia (CHANG, 1999). *Agaricus bisporus*, *Lentinula edodes* e *Pleurotus ostreatus* são as espécies mais produzidas no mundo. Em 1979, a produção dessas três espécies era de 71,9%, 14% e 2,7%, respectivamente, e 20 anos mais tarde, em 1997, a tendência continuou praticamente a mesma, com porcentagens de produção de 31,8%, 25,4% e 14,2% respectivamente. O aumento na produção de *P. ostreatus* resultou em parte do crescente interesse de países em desenvolvimento em empregar tecnologias mais baratas para cultivar esta espécie (ALBERTÓ, 2008).

Chamado cogumelo ostra, *P. ostreatus* é mais conhecido popularmente no Brasil como *shimeji*, quando é colhido ainda nos primeiros estágios de desenvolvimento, sendo a espécie mais estudada do gênero (SOUZA, 2010). Atualmente, os cogumelos ostra ocupam a segunda posição na produção mundial correspondendo a 25% do total produzido mundialmente. No Brasil, este

cogumelo ocupa também a segunda posição e estima-se que sua produção representa mais de 16% da produção total *in natura* produzida no país (ANPC, 2020). Devido a sua natureza saprofítica e sua habilidade para produzir enzimas específicas que quebram a celulose e a lignina, esta espécie representa uma vantagem econômica para os produtores. Seu cultivo permite aproveitar um grande número de resíduos lignocelulósicos e o processo não requer que o substrato seja compostado previamente. Da mesma forma, seu tempo de cultivo é menor em comparação com outras espécies de fungos (MARCELO *et al.*, 2016; ALBERTÓ, 2008).

Apesar das vantagens de cultivo, o consumo per capita de cogumelos no Brasil ainda é baixo (160 g) quando comparado com o consumo em outros países. Na França, Itália e Alemanha, por exemplo, o consumo anual supera os 2 kg. Já em países como China e Coreia do Sul o consumo per capita é superior a 8 kg por ano (ANPC, 2020). O baixo consumo de cogumelos no país pode ser explicado em parte, pelos grandes desafios encontrados para seu cultivo. Tanto os produtores locais como as grandes empresas enfrentam dificuldades que residem entre outros aspectos, na indisponibilidade de inoculante de qualidade, controle das condições ambientais, ataque de pragas e a presença de contaminantes. Todos estes fatores podem afetar significativamente o rendimento do cultivo e aumentar os custos de produção (MANDEEL *et al.*, 2005; BISWAS, 2014; RAUT, 2019).

Algumas características fisiológicas dos fungos também podem afetar a produtividade do cultivo. O micélio de certos fungos pode produzir compostos voláteis durante a colonização do substrato de produção. Esses compostos podem inibir o crescimento dos fungos afetando sua frutificação. Entre esses compostos encontram-se o etanol, 2-ethyl-1-hexanol e o octano, os quais têm sido identificados como compostos inibidores do crescimento de *A. bisporus* (NOBEL *et al.*, 2009). Outro composto volátil produzido por algumas espécies de fungos é o etileno, mais conhecido como o hormônio do amadurecimento de frutos. O etileno tem sido descrito também como uma molécula reguladora do crescimento fúngico. Em experimentos *in vitro*, tem sido observado que este hormônio, em certas concentrações, inibe o aparecimento de primórdios nos cogumelos. No entanto, alguns autores relatam que este mesmo hormônio pode estimular o desenvolvimento de fungos como *A. bisporus* (WOOD & HAMMOND, 1977; NOBLE *et al.*, 2009). Segundo Fries (1973), estes duplos efeitos podem ser observados e dependem da concentração do etileno e da espécie fúngica em particular.

Os microrganismos presentes no substrato de produção de cogumelos também influenciam a frutificação dos fungos. Hayes (1969) observou que as bactérias do composto de produção de *A. bisporus* estimulavam o aparecimento de primórdios do fungo. As bactérias removiam os compostos inibitórios produzidos pelo micélio e os usavam como fontes de carbono. Estas bactérias foram identificadas como *Pseudomonas putida*. Esta bactéria é naturalmente encontrada no solo e possui características próprias de um microrganismo promotor do crescimento, sendo utilizada principalmente para promover o crescimento de plantas (SAHARAN & NEHRA, 2011). Curiosamente, sua presença em fungos está relacionada com o processo de frutificação. Técnicas de microscopia eletrônica têm permitido observar que durante a frutificação de *A. bisporus* a bactéria se encontra fortemente aderida ao micélio do fungo, o que sugere que a presença de bactérias benéficas como *P. putida* no substrato de frutificação de *A. bisporus* é fundamental para a formação dos cogumelos (MILLER *et al.*, 1995). Experimentos mais recentes com *A. bisporus* e *P. putida*, confirmaram que a bactéria, por meio da enzima ACC deaminase (ACCD), reduz os níveis de etileno produzidos pelo fungo, promovendo seu desenvolvimento (CHEN *et al.*, 2014).

A ACCD é capaz de degradar o precursor imediato do etileno, o ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC). Tal enzima está presente em algumas bactérias e fungos sendo codificada pelo gene *acdS* (HONTZEAS *et al.*, 2005). A degradação do ACC impede que este seja oxidado a etileno pela enzima ACC sintase, diminuindo assim os níveis de etileno. Este mecanismo é descrito amplamente entre bactérias com atividade ACCD e também em plantas (GLICK *et al.*, 2005). Porém, a relação entre a enzima e fungos produtores de etileno têm sido menos estudada. Chen e colaboradores (2014) propuseram que o modelo sinérgico que acontece entre bactérias e plantas, ocorre também entre bactérias e fungos como *P. putida* e *A. bisporus*, já que neste fungo o etileno é produzido via ACC. Vários estudos sugerem que os fungos produzem etileno pela mesma via que as plantas, isto é, via ACC (JIA *et al.*, 2000; VITERBO *et al.*, 2010). Análises filogenéticas têm revelado a presença de genes homólogos da ACC sintase em várias cepas de fungos como *Penicillium citrinum*, que é capaz de sintetizar ACC por meio desta enzima (JIA *et al.*, 1999; NASCIMENTO *et al.*, 2014). Da mesma maneira, a produção de etileno em *A. bisporus* foi estimulada em presença de metionina, sugerindo que a produção de etileno em fungos é dependente do ACC (CHEN *et al.*, 2014).

Considerando a possível relação do etileno com a frutificação de fungos e sua relevância para o cultivo comercial de cogumelos, este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de

bactérias com atividade ACCD no desenvolvimento de cogumelos de *P. ostreatus*: duas cepas da bactéria *P. putida* UW4; uma cepa selvagem, com atividade ACCD (*acdS*⁺) e outra cepa mutante, sem atividade ACCD (*acdS*⁻) e a bactéria *Pseudomonas. palleroriana* MAB3 com atividade ACCD (*acdS*⁺).

2 HIPÓTESE

Pseudomonas putida UW4 *acdS*⁺ e *P.palleroriana* MAB3 *acdS*⁺ têm potencial de melhorar o rendimento (peso fresco de cogumelos/kg de substrato) de *P.ostreatus* cultivado em substrato comercial.

3 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos das bactérias *P.putida* UW4 *acdS*⁺ e *P. palleroriana* MAB3 *acdS*⁺ na frutificação de *P.ostreatus* cultivado em laboratório e em escala comercial, assim como determinar os níveis de etileno produzidos pelo fungo.

4 REVISÃO DA LITERATURA

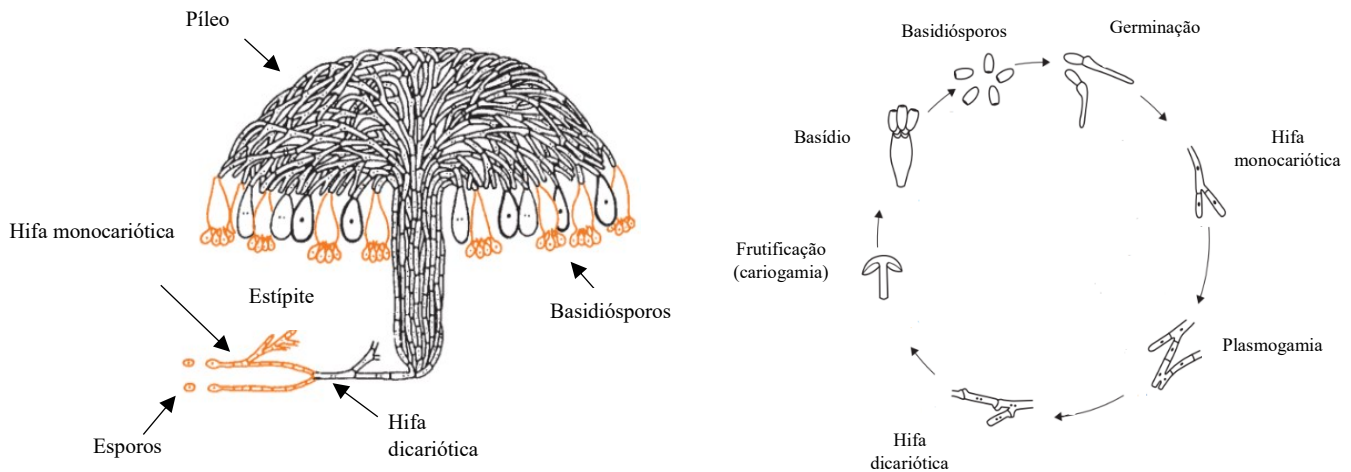
4.1 CICLO DE VIDA DOS FUNGOS

Os fungos não produzem clorofila, ou seja, são incapazes de fabricar seu próprio alimento a partir de materiais inorgânicos como água, dióxido de carbono e nitratos. Portanto, se nutrem de materiais orgânicos presentes em tecidos vivos ou mortos de plantas e animais. Os que se nutrem de matéria morta como resíduos de colheitas agrícolas, madeira de árvores mortas, e estrume de animais são chamados fungos saprofiticos. A maioria dos fungos comestíveis são saprofiticos, mas alguns são simbioses micorrízicos, ou seja, vivem em associação simbiótica com raízes de certas espécies de plantas, notadamente as coníferas (CHANG & MILES, 2004). A nutrição dos fungos ocorre de forma absorptiva, ou seja, absorvem os nutrientes necessários para seu crescimento a partir de um substrato disponível. Os nutrientes são distribuídos pelo micélio através das hifas para posteriormente formar os cogumelos (GALVAGNO & FORCHIASSIN, 2010; ALBERTÓ, 2008).

Os cogumelos, por sua vez, são os corpos frutíferos de alguns fungos dos filos Ascomycota e Basidiomycota, sendo que a maioria dos fungos comestíveis pertence à divisão Basidiomycota que apresenta hoje mais de 30.000 espécies descritas. Em Basidiomycota, certas espécies produzem estruturas macroscópicas (**basidiomas**) protetoras dos esporos (**basidiósporos**). Basicamente estão formados por uma base ou pé conhecido como estípite, o píleo, onde se encontram as lamelas que se encarregam de sustentar os esporos dos fungos, e algumas espécies que apresentam anéis em volta do estípite (Fig. 4.1A). A estrutura de origem sexual que é útil para sua identificação é o **basídio** que abriga os basidiósporos (EIRA, 2010; LEITE, 2010; ALBERTÓ, 2008).

Os cogumelos resultam da união sexual de dois núcleos compatíveis que envolvem três processos: plasmogamia, cariogamia e meiose. Os basídios, estruturas características nos basidiomicetos, apresentam prolongamentos diferenciados nas extremidades das hifas (geralmente em número de quatro) chamados esterigmas. Nestas estruturas são produzidos os basidiósporos depois que a **meiose** dá início dentro do basídio. O processo inicia quando os basidiósporos, contendo um núcleo haploide cada, germinam e crescem formando colônias que possuem um único núcleo em cada compartimento hifal (micélio monocariótico haploide) (ELISA & ESPOSITO, 2010). Quando duas hifas sexualmente compatíveis se encontram, as paredes celulares que as separam se dissolvem e acontece uma troca do material citoplasmático (STAMETS, 2000).

Figura 4.1 – A: Representação esquemática do desenvolvimento de um cogumelo. Laranja: fase haploide, preto com 2 núcleos: fase dicariótica, preto com um núcleo: fase diploide. Os basídios estão representados em tamanho muito maior ao píleo. B: Ciclo de vida de um cogumelo.



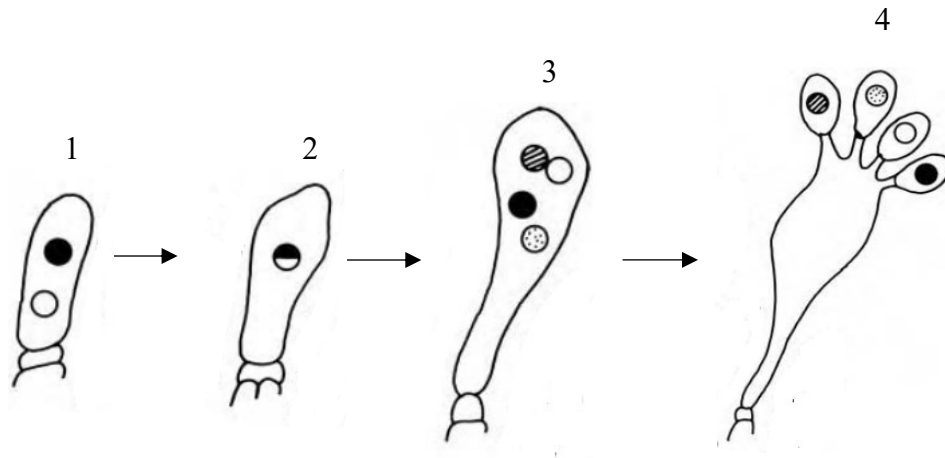
Fonte: A: retirado de Bresinsky (2012). B: adaptado de Deacon (2006)

O processo de fusão das hifas é conhecido como **plasmogamia**. Neste momento, o micélio que antes era monocariótico se torna dicariótico, com dois núcleos de cada parental em cada compartimento hifal (Fig. 4.1B) (ELISA & ESPOSITO, 2010). Com algumas exceções, somente o micélio dicariótico é fértil e capaz de produzir cogumelos. Uma vez que o micélio entra na fase dicariótica, a frutificação pode ocorrer logo depois. Dependendo da espécie a frutificação pode ocorrer rapidamente ou demorar semanas ou meses (STAMETS, 2000).

O fungo pode crescer de forma vegetativa por muito tempo formando uma rede de hifas dicarióticas, mas em resposta a fatores ambientais, os dois núcleos presentes dentro de cada basídio migram um em direção ao outro e se fundem em um único núcleo (diploide) num processo chamado **cariogamia**, momento em que a frutificação pode ocorrer (Fig. 4.2B) (STAMETS, 2000). Logo em seguida à cariogamia, o núcleo diploide sofre meiose produzindo quatro células filhas haploides (Basidiomycota). Então, o esterigma se desenvolve e os quatro (esse número pode variar a depender da espécie) núcleos haploides migram originando novos basidiósporos que quando maduros são

dispersos para o ambiente completando seu ciclo de vida (DEACON, 2006; LEITE & ESPOSITO, 2010).

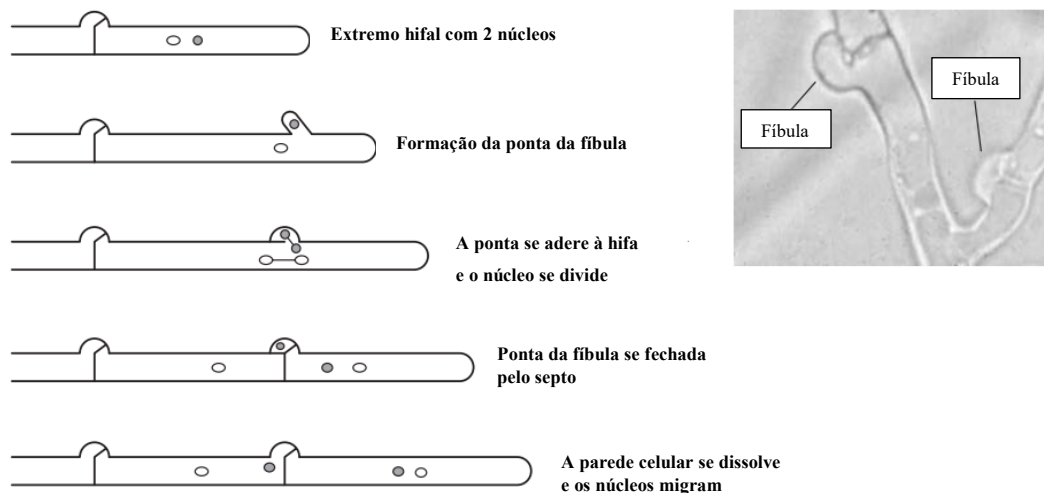
Figura 4.2 – Processo de formação dos basidiósporos em cogumelos. 1: dicarion (dois núcleos haploides não fusionados no basídio), 2: basídio depois da fusão dos núcleos, núcleo diploide, 3: basídio depois da meiose (4 núcleos haploides), 4: basidiósporos maduros.



Fonte: adaptado de Chang & Miles (2004)

Uma estrutura importante no ciclo de vida dos fungos em Basidiomycota são as fíbulas ou grampos de conexão que se formam durante a divisão dos núcleos na extremidade hifal e que são uma evidência de que ao acasalamento ocorreu. Por isso, estas estruturas são úteis para identificar e diferenciar, por microscopia óptica, fungos basidiomicetos na fase dicariótica (DEACON, 2006; LEITE & ESPOSITO, 2010). De maneira oposta, o micélio resultante de esporos haploides não tem presente os grampos de conexão (STAMETS, 2011). As fíbulas mantêm o micélio na fase dicariótica e são pontes microscópicas que distribuem nas duas células filhas, os quatro núcleos produzidos durante a formação dos basidiósporos. Surgem como projeções no terminal da hifa durante o alongamento formando um grampo que se desenvolve em sincronia com a divisão dos dois núcleos para gerar dois núcleos filhos. Um dos filhos de um dos núcleos é absorvido pela fíbula em desenvolvimento até ser cortada pelo aparecimento de um septo que separa a hifa em dois segmentos contendo cada um, dois núcleos com uma informação genética distinta (Fig. 4.3) (DEACON, 2006; LEITE, 2010).

Figura 4.3 – Formação das fíbulae em basidiomicetos.



Fonte: adaptado de Deacon (2006)

4.2 PRODUÇÃO DAS ESTRUTURAS REPRODUTIVAS DOS FUNGOS

Os fungos basidiomicetos tipicamente crescem em forma de micélio, porém, alguns podem apresentar um estado leveduriforme (LEITE, 2010). A parede celular é formada de quitina e glucanas (polímeros de glicose com ligações predominantemente β -1-3 e β -1-6). Estas estruturas possuem carboidratos solúveis e compostos de armazenamento, incluindo manitol e outros álcoois de açúcar, trealose e glicogênio. Nos fungos leveduriformes a parede celular é composta de quitina e mananos (DEACON, 2006).

Quando um micélio produz cogumelos, várias mudanças radicais ocorrem no metabolismo fúngico. O micélio é uma vasta rede de células interconectadas que permeia o solo. Quando em estado vegetativo pode permanecer dormente durante meses ou anos até formar os primeiros cogumelos (STAMETS, 2011). Durante o estado vegetativo, as células das hifas acumulam nutrientes e o micélio expande-se degradando compostos orgânicos por meio das enzimas secretadas pelas hifas. Em contrapartida, os cogumelos somente aparecem sob condições ótimas de nutrientes, temperatura e umidade como uma forma de disseminar os esporos e garantir a sobrevivência da espécie (OHM, 2010; STAMETS, 2011). O desenvolvimento dos primórdios, que são as primeiras estruturas de frutificação que mais tarde formarão os cogumelos (ALBERTÓ,

2008), ocorre quando os nutrientes orgânicos presentes no meio se esgotam. Depois, o micélio é nutrido diretamente pelas próprias reservas de carbono. No início deste processo, o micélio armazena compostos como glicogênio que é convertido a açúcares que são translocados para o primórdio em desenvolvimento. Então, conforme os níveis de açúcar nas hifas diminuem, as paredes das hifas começam a se decompor e os produtos da degradação são translocados para o primórdio.

A rápida expansão dos cogumelos a partir do estágio dos primórdios depende da captação de água do micélio e acontece em resposta a drásticas mudanças de fatores ambientais como O₂, CO₂, temperatura, umidade e luz. Substâncias voláteis, pH, salinidade e disponibilidade de nutrientes também são fatores que têm um papel importante no processo de frutificação (DEACON, 2006; OHM, 2010). Na produção artificial de cogumelos, uma forma de imitar o processo que ocorre na natureza é alterando as condições ambientais das salas de cultivo depois da colonização completa do substrato. Em cultivos onde o substrato é acondicionado em sacos fechados, são realizados furos nos sacos com o intuito de facilitar a respiração do fungo e a saída dos basidiomas pelos furos. Este processo é conhecido como “indução da frutificação”. As condições ambientais que promovem a frutificação de cogumelos geralmente são específicas para cada espécie e marcam o início do aparecimento dos primórdios (ESPOSITO, 2010).

Vários fatores interferem no processo de produção das estruturas reprodutivas dos fungos, sendo elas abordadas individualmente a seguir.

4.2.1 Luz

O desenvolvimento dos primórdios de muitos basidiomicetos é estimulado pela luz que incide sobre o micélio. Espécies como *Schizophyllum commune* somente necessitam um estímulo de luz no início da frutificação, mas não nas subseqüentes etapas da frutificação. Pelo contrário, em *Agaricus bisporus* a luz é inibitória para o aparecimento dos primórdios assim como para o alongamento do estípite a expansão do píleo. Acredita-se de forma geral que a correta formação dos basidiomas é afetada pela intensidade da luminosidade. Experimentos com várias espécies de *Pleurotus* descrevem que o uso de 300-500 lux de luminosidade (equivalente à quantidade de luz suficiente para ler) no ambiente de cultivo é adequado para obter uma boa produtividade (CHANG & MILES, 2004; AHMED *et al.*, 2013).

Diferentes intensidades luminosas afetam de diversas formas o desenvolvimento dos basidiomas de *Pleurotus ostreatus*. Quanto combinada com temperaturas mais altas (28 °C), uma luminosidade de 900 lux pode promover a formação de píleos de cor branca enquanto que quando combinada com temperaturas mais baixas (15 °C). Uma luminosidade de 120 lux pode produzir píleos com colorações que variam de cinza a chumbo. No entanto, uma luminosidade insuficiente pode causar deformidades nos basidiomas e com o estípite mais alongado (MARINO *et al.*, 2003).

4.2.2 O₂

Pelo seu metabolismo aeróbio, os fungos precisam de quantidades de O₂ suficientes para respirar. Além disso, o O₂ auxilia na regulação de outros fatores como a umidade, a temperatura, o vapor de água, o acúmulo da concentração de CO₂ e a eliminação de alguns metabólitos voláteis (BELLETTINI *et al.*, 2019). O excesso de umidade pode reduzir a porosidade do substrato, limitando a transferência de O₂ para o fungo e provocando um crescimento superficial (PATEL *et al.*, 2009). Para espécies como *P. ostreatus*, uma umidade adequada do substrato deve estar entre 50% e 75%. Um ambiente de cultivo com condições insuficientes de aeração pode gerar acúmulo de CO₂ e outros metabólitos voláteis prejudicando a frutificação. Usualmente, malformações nos basidiomas são atribuídas a altas concentrações de CO₂ nas salas de cultivo durante a fase de frutificação (CHANG & MILES, 2004).

4.2.3 Umidade Relativa

A umidade do ambiente de frutificação é um dos fatores mais críticos a serem controlados para um adequado crescimento dos cogumelos, já que pode impedir a correta colonização do substrato, afetando, portanto, o rendimento do cultivo. Em termos gerais, uma umidade relativa de 95-100% é necessária para que ocorra uma adequada frutificação (CHANG & MILES, 2004). Uma umidade relativa muito baixa pode promover deformações nos basidiomas, textura quebradiça e perda de volume produzindo cogumelos com pouco peso.

Alguns trabalhos estabelecem que a umidade relativa ótima para preservar a morfologia típica de *P. ostreatus* deve estar acima de 80% (JANG *et al.*, 2003). Uma forma de manter a umidade em níveis adequados é usando um sistema de irrigação no interior da sala de frutificação em intervalos determinados de tempo (SULTANA *et al.*, 2018). Ahmed e colaboradores (2013) relataram o uso do sistema de irrigação para o cultivo de *P. ostreatus*. Segundo eles, pulverizando

água 3 vezes por dia no ambiente, pode-se manter a umidade entre 80-85% com bons resultados de frutificação.

4.2.4 Temperatura

A temperatura tem grande influência no crescimento fúngico. Com o aumento da temperatura, a atividade enzimática dos fungos é também incrementada. No entanto, temperaturas muito altas podem causar a inativação das enzimas, afetando o metabolismo e crescimento destes organismos (CHANG & MILES, 2004).

Durante a fase vegetativa dos fungos, as temperaturas são normalmente mais altas que as necessárias para a etapa de frutificação. Para o aparecimento e diferenciação dos primórdios, é essencial que haja uma redução da temperatura, evidenciando seu efeito regulador na reprodução sexual dos fungos. Em espécies como *A. bisporus* a mudança de temperatura que induz a frutificação vai de 25 °C para 18 °C (EASTWOOD *et al.*, 2013). A faixa de temperatura de cultivo para *P. ostreatus* varia entre 20-30 °C, o que evidencia sua grande capacidade de se adaptar a temperaturas mais altas crescendo melhor em regiões tropicais e subtropicais durante as estações de verão e outono (KHAN & CHANDRA, 2017). Porém, para sua frutificação também é necessária uma redução de temperatura que pode variar entre 10 e 21 °C (ALBERTÓ, 2008). Jang e colaboradores (2003) ainda observaram que *P. ostreatus* precisa de temperaturas de frutificação entre 13-16 °C para que suas características morfológicas sejam preservadas, mostrando que além de induzir a frutificação, a temperatura pode ter um efeito também na morfologia dos basidiomas.

4.2.5 CO₂

Durante a fase vegetativa, o micélio produz grandes quantidades de CO₂ resultantes da respiração aeróbia. As altas concentrações de CO₂ favorecem o crescimento do micélio. Pelo contrário, o excesso de CO₂ pode inibir o início da frutificação e causar malformações nos basidiomas, portanto, nessa etapa é imprescindível ventilar o ambiente de cultivo fazendo trocas de ar para que o excesso de CO₂ seja removido com entrada de novo ar (CHANG & MILES, 2004; ALBERTÓ, 2008). Uma ventilação adequada para manter o CO₂ em níveis aceitáveis (≤ 1000 ppm) pode ser alcançada injetando um fluxo de ar por m² por quilograma de cogumelo de 3 a 8 m³/h (ALBERTÓ, 2008). Embora uma ventilação suficiente é recomendada, esta não deve interferir com

a temperatura e a umidade relativa do ar. Correntes muito fortes de ar podem causar uma evaporação excessiva da umidade dos cogumelos (LAMBERT, 1933).

Lambert (1933) foi um dos primeiros a publicar os efeitos prejudiciais das altas concentrações de CO₂ em cogumelos. Ele observou em experimentos com *Agaricus campestris* que um acúmulo de 5000 ppm de CO₂ ou mais causava crescimento anormal, encolhimento dos basidiomas e perda de peso dos cogumelos. Em concentrações menores de 2000 ppm e 1000 ppm, o crescimento do píleo era mais lento do que o crescimento do estípite, produzindo, portanto, cogumelos com estípite mais curtos e píleos menores. De forma similar, concentrações de 5000 ppm de CO₂ tem se mostrado inibitórias para a formação dos basidiomas de *P. ostreatus*. Estudos específicos sobre a morfologia deste fungo descrevem que o tamanho do píleo diminui conforme aumenta a concentração de CO₂, podendo afetar o rendimento total da produção (JANG *et al.*, 2003; ALBERTÓ, 2008).

4.2.6 pH

A concentração de íons de hidrogênio no substrato é afetada pelos metabólitos e ácidos orgânicos liberados pelos fungos durante seu crescimento, podendo limitar a sua frutificação.

Os valores de pH ótimos para a frutificação podem não ser os mesmos necessários para o crescimento micelial e essas necessidades variam conforme a espécie (CHANG & MILES, 2004). Sultana e colaboradores (2018) encontraram que *P. ostreatus* teve um melhor desempenho enquanto a colonização e frutificação quando foi cultivado em substrato com pH ácido (5,5) em comparação com outros pH testados, mostrando que o pH tem uma grande influência na capacidade do fungo em absorber os nutrientes presentes no meio e seu crescimento. Pelo contrário, Khan e colaboradores (2013) observaram melhores resultados de crescimento de *Pleurotus* sp. em substratos com pH ligeiramente básicos. Estes resultados concordam com os estudos realizados por Chung e colaboradores (1981), nos quais a faixa ótima de pH para o crescimento micelial de *Pleurotus* foi diferente entre as diferentes espécies do fungo.

4.2.7 Nutrientes

Os nutrientes adicionados ao substrato como fontes de carbono, nitrogênio, minerais e vitaminas são importantes para o crescimento dos fungos. Uma suplementação adequada é aquela capaz de promover a secreção de enzimas específicas e em concentração suficiente para a

degradação dos compostos constituintes do substrato. Os carboidratos liberados da degradação servem como fonte de energia para construir os componentes estruturais dos cogumelos (ALAM *et al.*, 2010). No entanto, nem sempre as concentrações necessárias para a fase vegetativa são as mesmas da fase reprodutiva, causando muitas vezes a inibição da frutificação. Isto acontece particularmente com carboidratos e fontes de nitrogênio.

Estudos mostram que a adição de glicerol, frutose, xilose e glicose podem beneficiar o crescimento micelial de fungos. No entanto, somente glicose e frutose estimulam a frutificação, o restante pode produzir deformações nos basidiomas (CHANG & MILES, 2004). Efeitos similares acontecem com fontes de nitrogênio. Altas concentrações melhoram o crescimento micelial mas diminui a formação de primórdios. Além disso, substratos muito ricos em nitrogênio podem aumentar as contaminações por bactérias (YILDIZ *et al.*, 2002). O crescimento excessivo de micélio dado por uma alta suplementação pode provocar o esgotamento de metabólitos essenciais ou acúmulo de produtos metabólitos tóxicos prejudicando o processo de frutificação. Estas evidências apoiam o fato de que o processo de frutificação em muitos fungos é estimulado como resposta à cessação do crescimento vegetativo (CHANG & MILES, 2004).

Espécies de *Pleurotus* frutificam na natureza em restos de madeira que são substratos pobres em nitrogênio, o que parece ser uma resposta adaptativa de sobrevivência. Porém, numa produção comercial, a quantidade de nitrogênio deve ser ajustada para obter o máximo rendimento já que o nitrogênio é usado pelo fungo não somente para a síntese de proteínas e ácidos nucleicos, mas também para a síntese de glucosamina, o principal componente da parede celular (RAJARATHNAM *et al.*, 1988).

Vitaminas, como cofatores de muitos sistemas enzimáticos são indispensáveis para o crescimento de cogumelos. Em relação a quantidade de vitaminas, uma concentração adequada para o crescimento vegetativo pode ser insuficiente para a etapa de frutificação. A tiamina, por exemplo, tem um papel fundamental na regulação do metabolismo de carboidratos, os quais são importantes para o desenvolvimento dos basidiomas. Fungos como *Pleurotus*, *Lentinula*, *Auricularia*, *Coprinus*, *Flammulina* e *Volvariella* têm necessidades específicas de tiamina para a frutificação (CHANG & MILES, 2004). Estudos com *Pleurotus flabellatus* mostraram que a mistura de tiamina, niacina, biotina, riboflavina, ácido pantotênico, ácido p-aminobenzóico, cianocobalamina, piridoxina e ácido fólico foram indispensáveis para o crescimento do micélio (SRIVASTAVA & BANO, 1970).

Em *A. bisporus*, a tiamina e riboflavina também mostraram beneficiar o crescimento micelial mas inibiram a formação dos primórdios (PARK & AGNIHOTRI, 1969). De acordo com Burton (2015), embora o composto utilizado seja seletivo para o crescimento micelial de *A. bisporus*, este pode não ser adequado para sua frutificação. Às vezes o substrato pode ter deficiências de micronutrientes, especialmente minerais como cálcio, magnésio, enxofre, boro, cobre, ferro, molibdênio, magnésio e sais de zinco. Estudos com *Agaricus campestris* mostram que a adição de misturas de vitaminas como tiamina, riboflavina, ácido nicotínico e ácido pantotênico resultaram em incrementos no rendimento da produção. Resultados similares foram observados depois de suplementar o substrato com minerais (HOFFMAN *et al.*, 1958).

Em *Lentinula edodes*, cultivado em toras de eucalipto, a suplementação de minerais teve um efeito direto no incremento do conteúdo de proteína do cogumelo assim como na produtividade do cogumelo. Assim, a suplementação do substrato com nutrientes, não somente pode ser usada para estimular a frutificação dos cogumelos, mas também para alterar sua composição nutricional (QUEIROZ *et al.*, 2004).

4.3 PLEUROTUS

Pleurotus ostreatus é uma espécie de fungo do filo Basidiomycota (CARLILE *et al.*, 2001). Segundo o Index Fungorum, o gênero *Pleurotus* tem mais de 200 espécies oficialmente descritas. O gênero foi descrito em 1775 pelo naturalista holandês Nikolaus Joseph Freiherr Von Jacquin quem lhe deu o nome de *Ostreatus Agaricus*. Em 1871, o micologista alemão Paul Kummerer cunhou o gênero *Pleurotus* e desde então a principal espécie é conhecida como *P.ostreatus* (KUMMER, 1871). As primeiras tentativas de uso de *P. ostreatus* para consumo humano datam da primeira guerra mundial na Alemanha quando o fungo era produzido em troncos como uma medida de subsistência (RODRÍGUEZ, 2007).

O nome *Pleurotus* vem do grego “pleuro” que significa formado lateralmente se referindo à posição lateral do estípite relativo ao píleo. A palavra latina *ostreatus* se refere à forma do píleo que lembra uma ostra que pode ter um diâmetro de até 15 a 20 cm. O estípite é lateral (10 mm a 50 mm) e as lamelas esbranquiçadas ou cinzas. A cor do píleo pode variar, podendo apresentar coloração cinza (clara, escura ou azulada) quando o processo de frutificação acontece em temperaturas baixas, entre 15 °C e 18 °C, e se tornam mais brancas em temperaturas mais altas (28 °C e 30 °C). Além da temperatura, fatores como a luminosidade, substrato, tempo de incubação,

concentração de oxigênio e CO₂ podem influenciar a cor do píleo. Por isso, ao longo de cultivos comerciais onde a luz é um fator bastante presente, podem-se observar cogumelos mais brancos.

Os cogumelos podem aparecer individualmente com ou sem pé ou formando “clusters” de basidiomas. Elas podem ser colhidas com os basidiomas maduros (>5 cm de diâmetro), isto é, antes que as bordas virem para cima, sendo conhecido como estágio *hiratake* ou com basidiomas jovens, geralmente de coloração mais escura (entre 1 e 2 cm), sendo conhecido como *shimeji*. É uma espécie menos exigente em relação ao clima oferecendo mais vantagens para seu cultivo. A variedade *florida* costuma apresentar o píleo branco e também frutifica em temperatura mais alta, entre 22 °C e 25 °C (Fig. 4.4). O cultivo de *P. ostreatus* pode ser realizado em substrato estéril e sob condições assépticas; porém, podem ser usados substratos naturais compostados e pasteurizados ou toras de madeira (RAJARATHNAM & BANO, 1987; ESPOSITO, 2010).

Os cogumelos do gênero *Pleurotus* têm a vantagem de crescer em uma ampla faixa de temperaturas (15 °C - 31 °C) e de colonizar diversos resíduos lignocelulósicos como palhas de cereais, serragem, milho, resíduos de algodão, bagaço de cana, folha de bananeira, etc. Esta ampla capacidade de crescer em diferentes substratos é resultado de sua habilidade de degradar lignina, celulose e hemicelulose, os três principais componentes dos resíduos agrícolas (CHANG & MILES, 2004). Adicionalmente, seu crescimento neste tipo de substrato não requer um processo prévio de compostagem evitando a perda de matéria seca que ocorre durante o processo (RAJARATHNAM *et al.*, 1987).

Dentre as espécies comestíveis mais importantes do gênero, *P. ostreatus* tem ocupado um papel de destaque em sistemas de produção pela sua adaptabilidade a diversas condições climáticas, suas características sensoriais, sua relativa facilidade de produção em espaços pequenos, e pela alta produtividade e eficiência biológica quando comparada a outras espécies mais exigentes como *L. edodes* (CHANG & MILES, 2004; BHATTI *et al.*, 2007; AHMED *et al.*, 2009; KHAN *et al.*, 2013). As espécies de *Pleurotus* também requerem menor tempo para frutificar e demandam menores custos de produção, sofrem menos ataques de pragas e doenças e têm capacidade para degradar alguns compostos químicos, sendo muito empregadas em estudos de biorremediação ambiental (SADIQ *et al.*, 2015; BELLETINI *et al.*, 2016). Os cogumelos das espécies de *Pleurotus* têm alto conteúdo de água e possuem baixo valor calórico, por isso seu uso é preferido em dietas vegetarianas. Além disso, possuem propriedades medicinais, sendo seu consumo recomendado

para tratar doenças como hipertensão, hipoglicemia e anemia, entre outras (AGARWAL *et al.*, 2017).

Figura 4.4 – *Pleurotus ostreatus* var. *florida*.



Fonte: o autor (2020)

4.4 PRODUÇÃO MUNDIAL DE COGUMELOS COMESTÍVEIS

A produção mundial de cogumelos comestíveis é um mercado em contínua expansão devido não somente à quantidade produzida, mas ao número de espécies comercializadas (ALBERTÓ, 2008). O grande aumento na produção de cogumelos iniciou nas décadas de 1980 e 1990 o que causou uma dramática aceleração da produção mundial. Em 1975 eram produzidas 0,90 milhões de toneladas de cogumelos, em 1981, 1,26 milhões de toneladas, em 1986, 2,18 milhões de toneladas, em 1990, 3,76 milhões de toneladas, em 1994, 4,91 milhões de toneladas e em 1997, 6,16 milhões de toneladas. O uso intensivo de técnicas de cultivo mecanizadas no século 20 permitiu produzir cogumelos em grandes quantidades, se assemelhando a outras atividades agrícolas de grande escala (CHANG & MILES, 2004).

Sem dúvida, a China lidera o cultivo de cogumelos no mundo, seguido por Estados Unidos e Ásia (CHANG, 1999). Em 1978, a produção na China era de 60.000 toneladas. Em 2006, a

produção superou os 14 milhões de toneladas, o que equivale a mais de 50% da produção mundial (ANPC, 2020). A produção massiva de cogumelos na China e outros países desenvolvidos é devida em parte a melhores estratégias de marketing e maior poder aquisitivo da população (CHANG, 2009).

Dentre as espécies de cogumelo produzidas mundialmente, *A. bisporus* (champignon de Paris) é a mais cultivada, seguido por *L. edodes* (shiitake) e por algumas espécies de *Pleurotus*, como *P. ostreatus* (*shimeji* branco ou cogumelo ostra) e *Pleurotus pulmonarius* (*shimeji* marrom ou cogumelo ostra marrom). As espécies de *Pleurotus* são muito apreciadas especialmente em Europa e Ásia. A sua capacidade para crescer em diversos substratos e diferentes faixas de temperatura, aumentaram significativamente sua popularidade durante o período de 1986 a 1997 em países como México, Brasil, Colômbia, Canadá e Estados Unidos aumentando sua produção mundial em quase 5 vezes (CHANG & MILES, 2004).

Outras espécies produzidas no mundo que também merecem destaque são *Volvariella volvacea* (cogumelo da palha), *Auricularia* sp. (orelha de judas) e *Flammulina velutipes* (enoki) (CHANG & BUSWELL, 1996; CHANG, 2009).

Nos últimos 50 anos, o desenvolvimento de tecnologias voltadas para o cultivo de cogumelos tem se diversificado melhorando a produtividade do cultivo, principalmente para o gênero *Agaricus* (EIRA, 2010). No início dos anos 80, apenas o cultivo de *A. bisporus* e *L. edodes* era realizado de forma mais tecnificada. Tecnologias para o cultivo comercial de outras espécies vem sendo desenvolvidas em outros países. Por exemplo, *V. volvacea* na China, Taiwan, Japão, Filipinas e Indonésia, *F. velutipes* em alguns países de Europa e Ásia, e *P. ostreatus* na Itália, Hungria e Alemanha. O crescente interesse na produção comercial de diversas espécies de cogumelo estimula o desenvolvimento de novas técnicas de cultivo que por sua vez tem um impacto no aumento da produção mundial e consumo de cogumelos (CHAN & MILES, 2004).

4.5 PRODUÇÃO E CONSUMO DE COGUMELOS COMESTÍVEIS NO BRASIL

Nos países latino-americanos, o consumo de cogumelos ainda é muito precário devido ao desconhecimento do sistema de cultivo, falta de compreensão da importância do consumo de cogumelos, falta de inoculante de qualidade, falta de incentivos e recursos financeiros, e ausência de apoio governamental à toda a cadeia produtiva de cogumelos que permita que seu consumo seja

comparável aos cultivos tradicionais como café, chá, algodão, etc. (MANDEEL *et al.*, 2005; BISWAS, 2014; RAUT, 2019).

O cultivo de cogumelos no Brasil está crescendo e sendo difundindo em várias regiões do país. Atualmente, os estados de São Paulo e Paraná lideram a lista de produtores seguidos pelos estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro, sul da Bahia, Pernambuco, Brasília e Rio Grande do Sul. O país produz cerca de 12.000 toneladas de cogumelo “*in natura*”, quantidade considerada baixa se comparada com a produção (ton/ano) de países como China (5.008.850), Itália (761.858) e Estados Unidos (390.902). Porém, a atividade no país é de grande importância, pois gera mais de 3.000 empregos diretos. No entanto, devido à concorrência frente ao menor preço do cogumelo importado da China, muitos produtores têm sido desestimulados (ANPC, 2020).

Entre as espécies mais produzidas no país encontram-se *A. bisporus*, *Pleurotus* sp. e *L. edodes* (Tabela 4.1), sendo que *A. bisporus* ocupa o primeiro lugar com 66% da produção total. As espécies de *Pleurotus* ocupam o segundo lugar na lista, com somente 16% da produção, similar a *L. edodes* (12%), mostrando que o cultivo de espécies de fungos decompositores de lignina ainda é baixo e que seu cultivo deveria ser estimulado. Além de incentivar a produção local, o cultivo deste tipo de fungos cumpre uma função ecológica fundamental para a ciclagem de carbono na natureza (ANPC, 2020).

Tabela 4.1 – Produção nacional de cogumelos *in natura*.

Espécies de cogumelos cultivadas no Brasil	Produção estimada (toneladas/ano)
<i>Agaricus bisporus</i> (champignon de Paris)	8000
<i>Pleurotus</i> spp.	2000
<i>Lentinula edodes</i> (shiitake)	1500
<i>Agaricus subrufescens</i>	500
Outros	50

Fonte: Associação Nacional de Cogumelos (ANPC, 2020)

Outra razão importante para incentivar o cultivo de cogumelos no país são suas propriedades benéficas e seu sabor único, denominado “umami”. A aceitação do produto fresco

pelos consumidores é um fator importante na expansão do mercado nacional (STEFFEN *et al.*, 2019).

4.6 PROPIEDADES NUTRICIONAIS DOS COGUMELOS COMESTÍVEIS

Os cogumelos são consumidos pelas suas propriedades nutricionais desde épocas muito antigas. Várias propriedades terapêuticas têm sido atribuídas a eles. Entre as mais comuns encontram-se o efeito antitumoral, imunomodulatório, hipocolesterolêmico, antiviral, antibacteriano, antiparasitário, hepatoprotetor e antidiabético. Alguns compostos bioativos têm sido identificados em algumas espécies, por exemplo, o *lentinano*, presente em *L. edodes*, utilizado para tratamento contra o câncer (ALBERTÓ, 2008) e o *mevinolin*, identificado em *P. ostreatus* e que inibe uma importante enzima (enzima 3-hidroxo-3-metilglutaril-coenzima A) relacionada com a hipercolesterolemia (GUNDE-CIMERMAN *et al.*, 1993).

As propriedades medicinais dos cogumelos variam de acordo com a espécie, por exemplo, *Auricularia* sp., tem sido usada para tratar problemas intestinais, *V. volvacea* para reduzir a pressão arterial e melhorar a cicatrização de feridas, *L. edodes* para prevenir o raquitismo e alívio do excesso de acidez gástrica, *Hericiium erinaceus* para o tratamento de úlceras gástricas e *Ganoderma Lucidum*, um fungo muito apreciado na China, conhecido pelos seus múltiplos efeitos benéficos na memória e no processo de envelhecimento (CHANG & BUSWELL, 1996).

Produtos extraídos de cogumelos medicinais com o intuito de suplementar a dieta e melhorar a saúde são classificados como produtos nutracêuticos. Além das suas propriedades medicinais, os cogumelos são muito procurados devido a seu sabor único, aroma e textura que atraem cada vez mais consumidores. Análises composicionais das principais espécies cultivadas têm revelado que normalmente, os cogumelos contêm entre 19% e 35% de proteína (CHANG & BUSWELL, 1996; CHANG, 2009).

O teor de proteína é calculado com base na quantidade de nitrogênio determinado pelo método Kjeldahl, usando um fator de conversão de 4,38 em vez de 6,25 como se faz comumente para outros alimentos. O teor de proteína pode variar de acordo com a espécie, o ciclo de produção e os estágios de desenvolvimento dos basidiomas (estruturas reprodutivas dos basidiomicetos). *Pleurotus ostreatus* pode apresentar valores de proteína de 10.5-30.4% (peso seco), *A. bisporus* de 23.9-34.8%, *L. edodes* de 13.4-17.5%, *V. volvaceae* de 21.3-43% e *F. velutipes* de 17.6% (BUSWELL & CHANG, 1993; ALBERTÓ, 2008).

Pelo conteúdo de proteína e por possuírem aminoácidos essenciais, os cogumelos são candidatos adequados para dietas que buscam substituir os produtos de origem animal (AGARWAL, 2019). Pesquisas demonstram que o conteúdo de proteína de basidiomas de *A. bisporus* é similar à encontrada em várias fontes de proteína animal. Assim, os cogumelos tornam-se uma alternativa de fonte de proteína que pode contribuir ao problema da falta de alimento em países em desenvolvimento (AL-HUSSAINY *et al.*, 2019). O teor de proteína produzido por cogumelos pode ser afetado pela composição do substrato. Patil e colaboradores (2010) avaliaram três resíduos lignocelulósicos para o cultivo de *P. ostreatus*. Eles obtiveram variações no conteúdo de proteína quando o fungo foi cultivado com palha de soja (24,66%), palha de arroz (23,40%) e palha de trigo (21%). De acordo com Wang e colaboradores (2001), não somente o conteúdo de proteína do substrato pode afetar o teor de proteína nos basidiomas, mas o tipo de proteína empregada.

Além de serem uma boa fonte de proteínas, os cogumelos também possuem na sua composição vitaminas como riboflavina e niacina. *Agaricus bisporus*, por exemplo, contém mais riboflavina que a encontrada em ovos e queijo. A niacina, por sua vez, tem sido encontrada em maior quantidade em *P. ostreatus* em comparação com outras espécies como *L. edodes*. Os cogumelos também contêm pequenas quantidades de vitamina C, B₁ e D₂. A iluminação pode afetar o conteúdo da vitamina D₂ pois os cogumelos produzem ergosterol, o precursor desta vitamina, quando expostos à luz. Por isso, cogumelos de *A. bisporus* cultivados na escuridão costumam apresentar menores valores desta vitamina (ALBERTÓ, 2008).

O conteúdo de carboidratos dos cogumelos varia entre 51% e 88% e a fibra alimentar entre 4% e 20.5%, dependendo da espécie. Por exemplo, o conteúdo de fibra para *A. bisporus* varia entre 8% e 10%, para *P. ostreatus* entre 7.5% e 8.7% e para *L. edodes* entre 7.3% e 8% (BUSWELL & CHANG, 1993). Quanto aos ácidos graxos essenciais, a maioria corresponde a ácidos graxos insaturados com presença maioritária de ácido linoleico. Em comparação com os vegetais, os cogumelos contêm uma quantidade significativa de minerais, principalmente fósforo, potássio e magnésio. *Agaricus bisporus* se destaca por possuir maior quantidade de selênio que outras espécies de cogumelos (ALBERTÓ, 2008). Espécies de *Pleurotus* também são uma boa fonte de minerais como cálcio, fósforo, ferro, potássio e sódio (CAĞLARIRMAK, 2007).

4.7 PRODUÇÃO COMERCIAL DE COGUMELOS COMESTÍVEIS

4.7.1 Substratos de produção

Os cogumelos podem ser produzidos praticamente em qualquer resíduo de origem vegetal. Comumente são usadas palhas de cereais como trigo, centeio, sorgo, aveia, alfafa, arroz, dentre outras. No caso dos cogumelos degradadores de lignina, é empregada a serragem de madeira sem resinas (ALBERTÓ, 2008).

A decomposição de matérias derivadas da lignina faz parte de um dos ciclos de carbono mais importantes da natureza. Materiais lignocelulósicos são constituídos principalmente por celulose (cerca de 50%), hemicelulose (cerca de 20%) e lignina (cerca de 30%), tendo uma fração menor formada por compostos fenólicos e resinas que compreendem cerca de 2% a 4% do total da matéria. A lignina é um polímero aromático complexo composto por três álcoois de fenilpropanóides: coniferil, cumaril e sinapil ligados entre si por ligações C-O-C e C-C. Estas ligações fazem com que esta seja uma molécula muito difícil de degradar (DEACON, 2006).

Os fungos decompositores destes materiais são na sua grande maioria pertencentes ao filo Basidiomycota, sendo classificados em fungos de decomposição branca, quando degradam todos os componentes da madeira, e fungos de decomposição parda, quando degradam principalmente polissacarídeos. Estes fungos produzem enzimas hidrolíticas e oxidativas extracelulares que atuam degradando a parede celular vegetal (FERRAZ, 2010).

Os requerimentos de substrato dependem de cada espécie de fungo. As espécies de *Pleurotus* são decompositoras primárias que possuem enzimas para degradar materiais lignocelulósicos e que podem colonizar substratos compostados ou não, diferentemente de *A. bisporus*, que por ser um decompositor secundário, precisa de um substrato previamente compostado (DEACON, 2006). O processo de compostagem tem como finalidade converter a matéria orgânica em um meio estável e seletivo para o crescimento da espécie de cogumelo que se deseja cultivar, mas menos favorável para os microrganismos competidores (CHANG, 2009). Os microrganismos presentes inicialmente no composto como outros fungos filamentosos, actinobactérias, bactérias genéricas e leveduras agem degradando o substrato e reduzindo sua composição gerando calor, CO₂, amônia e outros gases como subproduto deste processo. Neste momento, o substrato é suscetível à invasão de decompositores secundários como *A. bisporus* (STAMETS, 2000).

Os substratos podem ser enriquecidos com suplementos e aditivos (não maior a 30%) como proteínas, carboidratos, vitaminas e ácidos graxos que melhoram os rendimentos da produção. Entre os aditivos mais comuns se encontram os farelos como o de trigo e aveia, as farinhas como a de milho e soja, e as sementes como a de algodão. Podem ser usados também óleos vegetais. Os suplementos devem garantir que o substrato tenha principalmente nitrogênio, fósforo e carboidratos (ALBERTÓ, 2008).

Os cultivos axênicos onde se requer a esterilização do substrato permitem uma frutificação mais previsível, garantindo que a produção seja mais regular e segura em relação às possíveis contaminações (EIRA, 2010). Para produtores que não têm a infraestrutura para realizar um processo de esterilização, o processo de pasteurização é uma opção viável já que é uma tecnologia mais barata que não requer o uso de autoclave nem controles tão estritos do processo de cultivo. Já a esterilização é um processo empregado em nível comercial cuja estrutura requer um ambiente mais controlado. Isto permite que os ciclos de frutificação sejam mais consistentes, porém, necessita de mais cuidados para evitar possíveis contaminações (STAMETS & CHILTON, 1984)

É importante que o substrato tenha uma adequada relação carbono-nitrogênio, já que se for utilizado mais nitrogênio do que carbono pode haver um crescimento excessivo do micélio e inibição da frutificação (ZANNETI & RANAL, 1997). Para o cultivo axênico de *Pleurotus*, Eira (2010) recomenda uma relação C/N de 15-18/1. Esta relação permite obter uma boa produtividade. Já nos cultivos diferentes do axênico, a relação C/N deve ser muito maior para que o cogumelo seja competitivo.

Em relação ao acondicionamento do substrato, este normalmente é disposto em frascos de vidro ou sacos de polipropileno de alta densidade resistentes à autoclavagem. Nos sacos se faz uso de um tampão de algodão ou filtros bacteriológicos na parede dos sacos para permitir a troca gasosa. Uma vez esterilizado e com temperatura adequada, o substrato é inoculado com o micélio fúngico em uma câmara de fluxo laminar, sendo posteriormente incubado a 24 ± 2 °C, no escuro, por 20 a 30 dias. A indução dos primórdios se realiza diminuindo a temperatura a 10-15 °C. Algumas linhagens preferem o choque térmico que se faz refrigerando os blocos a 5-8 °C por 2-5 dias ou mergulhando os blocos em água fria a 5-16 °C por 12-24 h (EIRA, 2000). A primeira indução dura aproximadamente 7 dias e o período de recuperação para a segunda colheita varia entre 10-15 dias. Depois se submete o bloco a um novo choque térmico para realizar a segunda

indução. Comumente, a terceira indução não vale a pena economicamente porque a produtividade costuma ser muito baixa (RAJARATHNAM & BANO, 1988).

4.7.2 O *spawn* na produção de cogumelos comestíveis

Spawn é o nome dado ao inoculante tradicional empregado para o cultivo de cogumelos. O *spawn* comercial pode ser adquirido em duas apresentações: em grãos ou em madeira. O *spawn* em grão utiliza grãos de cereais como trigo, cevada, sorgo, milho, etc. Já o de madeira utiliza serragem, fatias de madeira ou cavilhas (Fig. 4.5). Quando são utilizados grãos, eles passam por um processo prévio de lavagem e cocção que acondicionam o grão antes da inoculação. Aditivos como CaCO_3 são comumente utilizados para ajustar o pH acima de 7,0, o que ajuda acelerar o crescimento micelial. A matriz (grãos ou madeira) deve ser esterilizada antes de inoculada com o micélio fúngico e só então incubada para ativar o crescimento micelial. Uma vez que a matriz é colonizada completamente pelo micélio, o produto é chamado *Spawn* e está pronto para ser inoculado no substrato para a propagação do micélio. Para inoculação em sistemas de cultivo ao ar livre, o *spawn* de madeira é mais adequado já que não tem os nutrientes próprios dos grãos e é menos suscetível ao ataque de insetos e outros animais. O *spawn* de serragem tem a vantagem de ter mais partículas e pontos de inoculação por superfície de substrato que o *spawn* de alguns grãos (STAMETS, 2000; ROYSE *et al.*, 2007; BORAH *et al.*, 2020).

Figura 4.5 – Diferentes tipos de spawn: A: inoculante em grãos; B: inoculante em cavilha; C: inoculante em serragem.



Pelo motivo exposto acima, muitas vezes grãos menores são preferidos porque conseguem cobrir uma maior área superficial do substrato. Porém, grãos maiores como trigo, arroz, cevada e aveia podem preservar o micélio por períodos de tempo mais longos, pois fornecem uma maior reserva de nutrientes (LEE *et al.*, 2014). Sem dúvida, o *spawn* de grãos é o mais utilizado já que além de ser fácil de manipular, os grãos colonizados podem ser empregados para inocular outros grãos, o que permite aumentar a quantidade de *spawn* em um período curto de tempo. Além disso, na inoculação do substrato os grãos permitem uma distribuição uniforme do micélio na superfície do substrato. Devido à sua rápida adaptação ao substrato, o tempo de colonização pelo micélio é reduzido (SILVA, 2011).

A obtenção de um *spawn* confiável e de qualidade ainda é um ponto crítico no cultivo de cogumelos comestíveis, pelo menos no Brasil. A má qualidade de grãos, excesso de umidade do *spawn*, inadequada esterilização ou armazenamento favorecem a aparição de contaminações por bactérias e outros fungos, o que causa perdas de tempo e dinheiro (BORAH *et al.*, 2020).

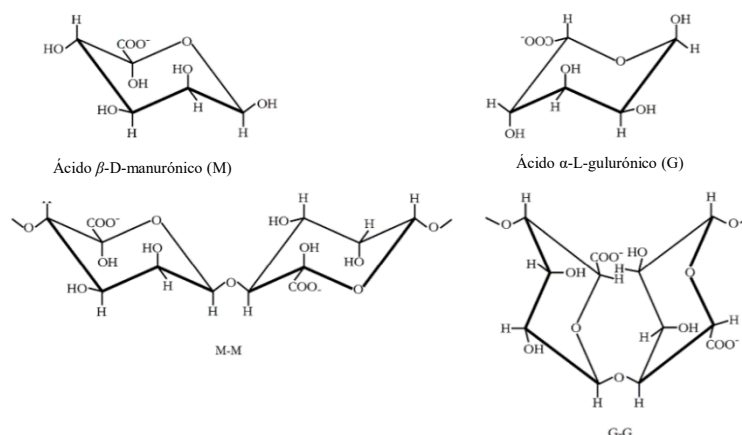
4.7.3 Produção de cogumelos comestíveis empregando *spawn* encapsulado em alginato de sódio

Na agricultura, o alginato tem sido utilizado como carreador de rizobactérias que são empregadas para inocular raízes de plantas e promover seu crescimento. Da mesma forma, tem sido usado para encapsular agentes controladores biológicos como *Pseudomonas fluorescens* que liberam compostos antifúngicos, protegendo as plantas contra o ataque de doenças (BASHAN, 1986; DELUCCA *et al.*, 1990; RUSSO *et al.*, 1996). Na produção de cogumelos, o alginato tem sido utilizado como uma alternativa ao *spawn* em grãos para o encapsulamento de fungos como *P. ostreatus* (GASTON *et al.*, 2017).

O alginato de sódio é um derivado do ácido algínico, um polissacarídeo aniônico linear obtido na sua maioria das paredes celulares de algas pardas (Phaeophyceae) e como exopolissacarídeo de algumas bactérias como *Pseudomonas aeruginosa* e *Azotobacter vinelandii*. O alginato de sódio apresenta propriedades gelificantes e espessantes. É composto por blocos de ácido β -D-manurônico (M) e seu epímero (C-5) ácido α -L-gulurônico (G), unidos por ligações 1-4. A arquitetura da molécula varia podendo se encontrar em arranjos homopoliméricos de blocos MM (manuronato), blocos GG (guluronato) ou sequências alternadas (MG) (Fig. 4.6) (REMMINGHORST & REHM, 2006).

As propriedades reológicas do alginato podem variar de acordo com a proporção dos ácidos que compõem a molécula, sendo que amostras na maior presença de ácido gulurônico tendem a ser mais sensíveis a Ca^{2+} do que as cadeias que possuem maior presença de ácido manurônico por conta de mais sítios de ligação (FUNAMI *et al.*, 2009). Esta característica pode ser aproveitada dependendo do tipo de aplicação biotecnológica pretendida. Como exemplo, fórmulas de alginato com maior proporção de ácido gulurônico são preferidas no campo médico para a fabricação de adesivos para fraturas ósseas (SARMIENTO & SUÁREZ, 2015). Outros usos incluem a indústria de alimentos, farmacêutica e têxtil.

Figura 4.6 – Estrutura química do ácido manurônico (M), ácido gulurônico (G) e suas estruturas secundárias como blocos de MM ou GG na cadeia de alginato.



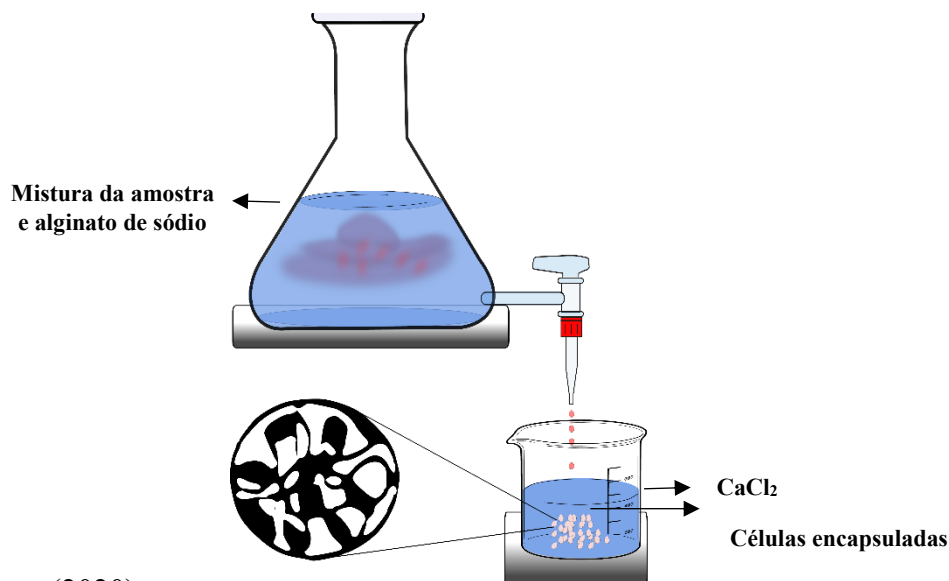
Fonte: Retirado de Remminghorst & Rehm (2006)

O processo de imobilização usando alginato de sódio é um método simples e compatível com a maioria das células. A amostra é misturada com a solução de alginato de sódio e a mistura é gotejada numa solução contendo cátions multivalentes, usualmente Ca^{2+} . Imediatamente, as gotas da mistura formam esferas de gel encapsulando as células numa rede tridimensional de alginato iônicamente reticulado (Fig. 4.7). A reticulação se refere ao processo de interligação que ocorre entre as cadeias poliméricas do alginato mediante ligações covalentes produzindo polímeros tridimensionais com alta massa molar. Uma reticulação mais alta significa uma estrutura mais rígida.

O tamanho das esferas formadas depende da composição do alginato. O alginato misturado com Ca^{2+} tende a encolher durante a formação das esferas levando a uma perda de água a incrementando a concentração do polímero (SMIDSRØD *et al.*, 1990).

O processo de imobilizar ou encapsular células usando alginato apresenta várias vantagens: facilita a manipulação e aplicação, protege os microrganismos contra condições ambientais adversas, permite a liberação gradual dos microrganismos por meio da degradação do polímero pela microbiota presente no local de uso, as esferas podem ser armazenadas durante muito tempo preservando a qualidade do material imobilizado, e permite a adição de nutrientes e outros compostos junto com os microrganismos, o que é útil quando se busca aumentar o tempo de vida de bactérias promotoras do crescimento vegetal (BASHAN, 1986; BASHAN, 1988; PAUL *et al.*, 1993). Pela sua versatilidade, o alginato é considerado o polímero mais comum empregado para o encapsulamento de microrganismos para múltiplas aplicações industriais (BASHAN *et al.*, 2002).

Figura 4.7 – Procedimento geral de encapsulamento usando alginato de sódio.



Fonte: O autor (2020)

4.8 ASSOCIAÇÕES BENÉFICAS ENTRE ESPÉCIES BIOLÓGICAS

A simbiose é definida como a interação próxima que acontece entre diferentes espécies biológicas. Nesta interação, pelo menos um dos organismos é beneficiado sem prejuízo ao outro. Porém, às vezes, um deles é prejudicado como no caso do parasitismo. Quando a interação

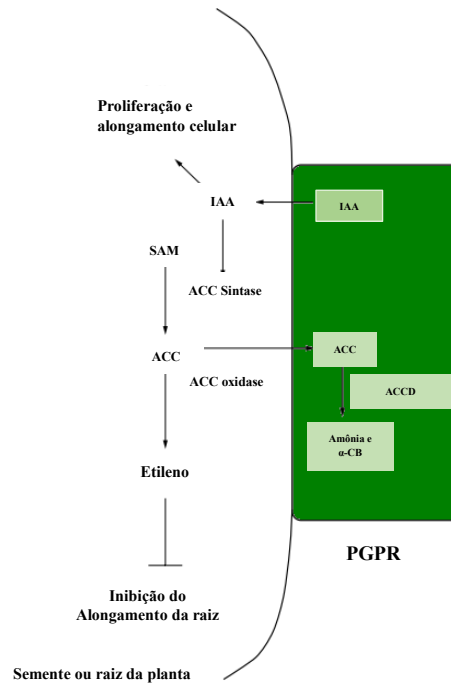
beneficia a ambos os organismos, a relação se denomina mutualismo (VARMA & KHARKWAL, 2009).

Os fungos são capazes de formar uma ampla gama de associações simbióticas com outros organismos. Uma das mais comuns é a relação mutualística entre fungos e plantas. Nela, o fungo auxilia a planta na absorção de nitrogênio inorgânico e fósforo do solo. Um exemplo são as micorrizas, associações benéficas entre as hifas de fungos e as raízes de plantas. Esta associação gera um fluxo bidirecional de nutrientes, em que o fungo recebe da planta carboidratos e aminoácidos, e a planta consegue aumentar sua capacidade de absorção de água e minerais do solo, especialmente íons de alta mobilidade como fósforo, zinco e cobre, e de baixa mobilidade, como enxofre, cálcio, potássio, magnésio, manganês, cloro, bromo e nitrogênio (LINDERMAN, 1987; VARMA & KHARKWAL, 2009). Os fungos micorrízicos também secretam antibióticos que ajudam a proteger as plantas contra fungos e bactérias patogênicas. Muitas micorrizas são formadas por fungos basidiomicetos.

As bactérias, por outro lado, também são capazes de formar relações mutualísticas com as plantas. Bactérias fixadoras de nitrogênio do gênero *Rhizobium* são rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (RPCP ou PGPR da sigla em inglês “plant growth promoting rhizobacteria”) que formam associações com leguminosas (ESQUIVEL-COTE, 2013). A característica principal dessa interação é a formação de nódulos nas raízes das plantas através dos quais a interação consegue fixar o nitrogênio atmosférico. Todas essas associações cumprem um papel ecológico importante, pois além de favorecer a ciclagem de nutrientes num ecossistema, melhoram o desenvolvimento vegetal e permitem que as plantas tenham mais tolerância frente a condições ambientais adversas (HOBBIE, 1992; VARMA & KHARKWAL, 2009).

As PGPR possuem diversos mecanismos diretos e indiretos para favorecer o crescimento vegetal. Entre os mecanismos diretos se encontra a fixação de nitrogênio, a síntese de auxinas, giberelinas, citocininas, vitaminas e enzimas, o incremento na permeabilidade das raízes, e a atividade da enzima ACC deaminase (ACCD) (GLICK, 1995). Glick (1998) sugeriu que algumas rizobactérias promovem o crescimento vegetal por meio da redução dos níveis de etileno em plantas num modelo baseado na interação entre planta-bactéria (Fig. 4.8). O etileno é sintetizado nos tecidos vegetais em resposta a condições adversas como ataque de patógenos, seca, salinidade, e presença de contaminantes induzindo uma aceleração dos processos de senescência na planta.

Figura 4. 8 – Modelo do mecanismo usado por rizobactérias promotoras do crescimento vegetal contendo a enzima ACC deaminase para diminuir os níveis de etileno em plantas e prevenir a inibição do alongamento das raízes causado pelo etileno. IAA: ácido indolacético; ACC: ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico; ACCD: atividade ACC deaminase; SAM: S-adenosil-metionina; CB: cetobutirato; PGPR: Rizobactérias promotoras do crescimento de plantas.



Fonte: adaptado de Glick *et al* (1998)

As rizobactérias contendo a enzima ACCD conseguem desaminar o ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC), que é o precursor imediato do etileno, convertendo-o em α -cetobutirato e amônia. Este último é utilizado pelas plantas e pelas rizobactérias como uma fonte alternativa de nitrogênio. A hidrólise do ACC pelas bactérias interrompe a biossíntese do etileno na planta, reduzindo os efeitos fisiológicos produzidos pelo aumento do etileno.

Em plantas, a biossíntese de etileno é realizada a partir do aminoácido L- metionina que se encontra nos exsudatos das raízes (HONTZEAS *et al.*, 2004a; ESQUIVEL-COTE, 2013). A metionina é ativada pelo ATP para formar S-adenosil-metionina (SAM) por meio de uma reação mediada pela enzima SAM sintase que é induzida sob condições de estresse ambiental. A SAM é convertida em ACC por meio da enzima ACC sintase (ACS) que utiliza piridoxal-5-fosfato como cofator. A ACS é estimulada pelo etileno, e também por outros fitohormônios como auxinas (AIA) e citocininas. Finalmente, por meio da enzima ACC oxidase (ACO), o ACC é oxidado a etileno numa reação dependente de oxigênio e cuja síntese é incrementada com o aumento de CO₂. As

plantas também conseguem converter o ACC em N-malonil-ACC por meio da enzima ACC N-malonil transferasa (ADAMS & YANG, 1979; YU *et al.*, 1979; HONTZEAS *et al.*, 2004b).

A interação sinérgica entre fungos e bactérias produtoras da enzima ACCD tem demonstrado ser benéfica para o crescimento de plantas. Gamalero e colaboradores (2008, 2010) avaliaram o efeito da interação entre *P. putida* UW4 e o fungo micorrízico *Gigaspora rosea* sobre o crescimento das plantas de pepino avaliadas em condições normais e submetidas a estresse salino. Eles observaram que em condições ótimas, a bactéria inoculada sem o fungo não melhorou o crescimento da planta. Porém, quando foi inoculada com o fungo, incrementou a colonização das raízes da planta pelo fungo, melhorando sua eficiência fotossintética. Quando esta interação foi avaliada sob condições de estresse salino, a bactéria auxiliou na modulação dos níveis de etileno produzidos pela planta por meio da enzima ACCD. Os autores destacam que o papel da enzima influencia as interações entre a bactéria, o fungo e a planta de forma diferente: em condições ótimas, a presença da enzima ACCD favoreceu a interação sinérgica entre a bactéria e o fungo, enquanto que sob condições desfavoráveis a enzima auxiliou na interação entre a planta e a bactéria, incrementando a tolerância da planta às condições de estresse causadas pelo aumento do etileno. Estes resultados mostram que bactérias como *P. putida* estimulam relações simbióticas já existentes além de estabelecerem novas interações com outros microrganismos.

Os sinais químicos recebidos pelos microrganismos que habitam o solo são de extrema importância nas interações entre as diferentes espécies. Num estudo de Li e colaboradores (2019) sobre a resposta química de *P. putida* UW4 frente a metabólitos produzidos por plantas e fungos, foi demonstrado que a bactéria teve uma forte quimiotaxia pelo ACC presente no exsudato vegetal o que favoreceu a colonização da rizosfera pela bactéria. Segundo Espinosa-Urgel e colaboradores (2002), o reconhecimento dos exsudatos da planta é o primeiro passo para que a bactéria consiga se estabelecer e colonizar a rizosfera. No estudo de Li e colaboradores (2019), também foi avaliada a resposta de *P. putida* UW4 frente aos exsudatos do micélio de *A. bisporus*. Eles verificaram que a bactéria também mostrou quimiotaxia pelo ACC produzido pelo fungo, resultando na colonização efetiva do micélio junto com a formação de um biofilme microbiano. Os autores concluíram que foi o ACC e não o etileno o metabólito chave para que a bactéria colonizasse tanto o solo como o micélio, e que a quimiotaxia gerada pelo ACC foi muito mais forte que outros aminoácidos e ácidos orgânicos produzidos pelas raízes vegetais ou pelo micélio fúngico.

De forma similar, Masaphy e colaboradores (1987) observaram que *P. putida* era atraída pelos metabólitos presentes nos exsudatos do micélio de *A. bisporus* causando sua aderência e multiplicação na superfície das hifas do fungo. Aparentemente, a bactéria mostrou mais atração por aminoácidos com glutamina, alanina, leucina, fenilalanina e prolina produzidos pelo micélio do fungo que por açúcares como glicose, manose e ramnose (GREWAL & RAINEY, 1991). A aderência de *P. putida* às hifas de *A. bisporus* aconteceu de forma rápida e específica, fato que em *A. bisporus* é um pré-requisito para a frutificação da espécie (MILLER *et al.*, 1995).

Pseudomonas putida é uma bactéria que possui motilidade, o que também pode favorecer sua interação com os fungos. Pion e colaboradores (2013) compararam a migração de duas cepas de *P. putida*, uma selvagem e uma mutante com a motilidade flagelar ausente. Eles observaram que a cepa selvagem migrou rapidamente ao longo das hifas do fungo *Morchella crassipes*, enquanto que a cepa mutante não. De acordo com os autores, sob condições ambientais adversas em que a mobilidade das bactérias poderia ser afetada, elas poderiam usar o micélio fúngico como uma rede de dispersão, melhorando sua colonização no solo.

O deslocamento das bactérias pelas “rodovias dos fungos”, como descrito por Kohlmeier e colaboradores (2005), é fortemente dependente dos microrganismos específicos que interagem e muito útil em estudos de biodegradação em que se busca mobilizar bactérias degradadoras de poluentes em áreas em que a rede de hifas fúngicas incrementa a dispersão das bactérias (KOHLMEIER *et al.*, 2005). Estudos de interação entre *Serratia marcescens* e *Rhizopus oryzae* para o biocontrole de fungos patógenos na agricultura mostraram que a migração da bactéria ao longo do micélio iniciou somente quando as hifas do fungo fizeram contato físico com a borda da colônia de bactérias, formando um biofilme que cobriu e inviabilizou o micélio fúngico patógeno. Os resultados sugerem a necessidade de contato físico para que de fato a interação entre os microrganismos aconteça (HOVER *et al.*, 2016).

As interações entre fungos e bactérias na natureza dependem de múltiplos fatores que incluem a resposta do hospedeiro, parâmetros ambientais e a composição de espécies da comunidade. Portanto, os sistemas *in vitro* são necessários para uma melhor compreensão destas interações entre os microrganismos e suas implicações (WARGO *et al.*, 2006).

4.9 ACC DEAMINASE

A ACCD é uma enzima multimérica formada por três subunidades proteicas com uma massa molecular por subunidade de 35 kDa (JACOBSON *et al.*, 1994). Por cada subunidade, a enzima utiliza uma molécula do co-fator piridoxal fosfato (PLP) (GLICK *et al.*, 2007). Sua atividade está localizada no citoplasma bacteriano e é induzida por baixos níveis de ACC (100 nM). Tem uma temperatura ótima de aproximadamente 30 °C e pH de 8,5 (JACOBSON *et al.*, 1994).

A expressão do gene *acdS* que codifica a enzima ACCD está regulada pelas proteínas AcdR e AcdB, sendo esta última identificada em *P. putida* (GRICHKO & GLICK, 2000; CHENG *et al.*, 2008). O gene *acdS* tem sido identificado em várias espécies de *Pseudomonas*. No entanto, tem sido encontrado em outros gêneros bacterianos presentes em diversos tipos de solo como *Alcaligenes*, *Variovorax*, *Rhodococcus* e *Bacillus*, mostrando que sua distribuição é muito mais ampla que se originalmente imaginado (BELIMOV *et al.*, 2001).

Entre as espécies de um mesmo gênero podem haver cepas com atividade ACCD e outras não. Isto pode acontecer porque os genes *acdS* nem sempre formam parte integral do DNA cromossômico de um microrganismo, mas estão presentes em plasmídeos relativamente estáveis, o que pode facilitar a transmissão do gene entre bactérias (GLICK *et al.*, 2007). Análises filogenéticas de Hontzas e colaboradores (2005) haviam demonstrado que alguns genes *acdS* presentes em bactérias poderiam ter sido adquiridos através da transferência horizontal de genes, como aqueles presentes em espécies de *Pseudomonas* e *Achromobacter*. Os genes *acdS* podem ser adquiridos ocasionalmente por transferência horizontal por bactérias que coexistem com bactérias produtoras da enzima ACCD num ambiente em que a produção da enzima representa alguma vantagem para sua sobrevivência (NASCIMENTO *et al.*, 2014).

A enzima ACCD foi inicialmente identificada em *Pseudomonas* sp. ACP e na lavedura *Hansenula saturnus* (HONMA & SHIMOMURA, 1978). Depois, foi identificada também em outras espécies de *Pseudomonas* (SHEEHY *et al.*, 1991; JACOBSON *et al.*, 1994; DUAN *et al.*, 2009). *Pseudomonas putida* é uma das linhagens descritas com atividade ACCD e tem sido amplamente utilizada para reduzir os níveis de etileno em plantas por meio da hidrólise do ACC (GLICK *et al.*, 1998). Em plantas de canola, por exemplo, *P. putida* GR12-2 contendo a enzima ACCD demonstrou um efeito positivo no alongamento das raízes das plantas. Seu desempenho foi comparado com linhagens mutantes no gene *acdS* e foi observado que as plantas tratadas com as

bactérias mutantes não mostraram os efeitos benéficos observados com as bactérias selvagens (GLICK *et al.*, 1994). Em 2004, Hontzeas e colaboradores (2004a) caracterizaram uma ACCD produzida por *P. putida* UW4 que tinha se mostrado uma linhagem promotora do crescimento vegetal. Esta linhagem se mostrou efetiva para melhorar a tolerância ao estresse salino em plantas de canola e pepino (CHENG *et al.*, 2007; GAMALERO *et al.*, 2010). As propriedades das PGPR atribuídas à presença da ACCD mostram que esta enzima é fundamental na associação entre as plantas e os microrganismos presentes na rizosfera auxiliando ao desenvolvimento de agroecossistemas sustentáveis (HONTZEAS *et al.*, 2004b; SARAF *et al.*, 2010).

A enzima ACCD também sido identificada em fungos como *Penicillium citrinum* (JIA *et al.*, 1999). Os autores encontraram que além de produzir ACCD, o fungo sintetiza ACC a partir de SAM (como acontece nas plantas) por meio da enzima ACS. Eles observaram também que o ACC sintetizado foi acumulado nos espaços intracelulares induzindo a atividade da ACCD produzida pelo fungo, ocasionando a degradação do ACC. No entanto, o ACC produzido pelo fungo foi metabolizado e convertido em amônia e 2-oxobutirato, mas não a etileno, mostrando que o ACC nesse fungo não está estritamente ligado à produção de etileno como nas plantas. Esses resultados mostram que em *P. citrinum* a expressão da ACC deaminase é regulada pelo ACC produzido pelo próprio fungo (JIA *et al.*, 1999; JIA *et al.*, 2000).

Em contrapartida, em *A. bisporus* a produção de ACC resulta na produção de etileno. Em experimentos *in vitro*, a produção de etileno do fungo foi estimulada em presença de ACC e metionina. Foi observado que o etileno produzido pelo fungo inibiu a formação dos primórdios. Quando o fungo foi co-cultivado com *P. putida* UW4 *acdS*⁺ e *P. putida* UW4 *acdS*⁻, os autores encontraram que a inibição causada pelo etileno produzido por *A. bisporus* foi reduzida somente quando o fungo foi co-cultivado em associação com a bactéria selvagem (*P. putida* UW4 *acdS*⁺), mostrando que como acontece com plantas, a enzima ACCD também apresenta um papel importante no desenvolvimento de fungos (CHEN *et al.*, 2014).

REFERÊNCIAS

ADAMS, D. O. *et al.* Ethylene biosynthesis: identification of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid as an intermediate in the conversion of methionine to ethylene. **Proceedings of The National Academy Of Sciences**, [S.L.], v. 76, n. 1, p. 170-174, 1 jan. 1979. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.76.1.170>.

AGARWAL, Sonam *et al.* Nutritional attributes of *Pleurotus* mushroom. In: VERMA, Vinod *et al* (ed.). **Incredible World of Biotechnology**. India: Nova Science Publishers, Inc., 2017. Cap. 2. p. 13-24. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/324965562_Nutritional_attributes_of_Pleurotus_mushroom#:~:text=Pleurotus%20mushroom%20is%20considered%20as,low%20fat%20and%20cholesterol%20content.. Acesso em: 14 jan. 2021.

AHMED, Mostak *et al.* Yield and nutritional composition of oyster mushroom strains newly introduced in Bangladesh. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, [S.L.], v. 48, n. 2, p. 197-202, fev. 2013. Fap UNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-204x2013000200010>.

ALAM, Nuhu *et al.* Influence of Different Supplements on the Commercial Cultivation of Milky White Mushroom. **Mycobiology**, [S.L.], v. 38, n. 3, p. 184-188, ago. 2010. Mycobiology (KAMJE). <http://dx.doi.org/10.4489/myco.2010.38.3.184>.

AL-HUSSAINY, K s J *et al.* Comparison between protein and amino acids of mushroom *Agaricus bisporus* with some kinds of meat and meat's products. **Iop Conference Series: Earth and Environmental Science**, [S.L.], v. 388, p. 012059-012075, 5 dez. 2019. IOP Publishing. <http://dx.doi.org/10.1088/1755-1315/388/1/012059>.

ANPC (ASSOCIAÇÃO NACIONAL DE PRODUTORES DE COGUMELOS). **O setor de cogumelos**. 2013. Disponível em: <https://www.anpccogumelos.org/cogumelos>. Acesso em: 20 out. 2020.

ALBERTÓ, Edgardo. **Cultivo intensido de los hongos comestibles**. Buenos Aires: Editorial Hemisferio Sur S.A., 2008. 265 p.

BAARS, Johan J. P. *et al.* Critical Factors Involved in Primordia Building in *Agaricus bisporus*: a review. **Molecules**, [S.L.], v. 25, n. 13, p. 2984-3004, 29 jun. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules25132984>.

BASHAN, Yoav *et al.* Alginate Beads as Synthetic Inoculant Carriers for Slow Release of Bacteria That Affect Plant Growth. **Applied And Environmental Microbiology**, Israel, v. 51, n. 5, p. 1089-1098, maio 1986a. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC239016/>. Acesso em: 14 jan. 2021.

BASHAN, Yoav. Migration of the Rhizosphere Bacteria *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens* Towards Wheat Roots in the Soil. **Journal Of General Microbiology**, Grã-Bretanha, v. 132, n. 12, p. 3407-3414, jul. 1986. Disponível em: <http://www.bashanfoundation.org/publications/towardswheat.pdf>. Acesso em: 14 jan. 2021.

BASHAN, Yoav. Alginate microbeads as inoculant carriers for plant growth-promoting bacteria. **Biology And Fertility Of Soils**, Israel, v. 35, n. 5, p. 359-368, jun. 2002. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00374-002-0481-5>. Acesso em: 14 jan. 2021.

BHATTI, Muhammad Ismail. Growth, development and yield of oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus* (Jacq. Ex. Fr.) Kummer as affected by different spawn rates. **Pakistan Journal Of Botany**, [s. l.], v. 39, n. 7, p. 2685-2692, nov. 2007. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/259079812_Growth_development_and_yield_of_oyster_mushroom_Pleurotus_ostreatus_Jacq_Ex_Fr_Kummer_as_affected_by_different_spawn_rates. Acesso em: 14 jan. 2021.

BELLETTINI, Marcelo Barba *et al.* Factors affecting mushroom *Pleurotus* spp. **Saudi Journal Of Biological Sciences**, [S.L.], v. 26, n. 4, p. 633-646, maio 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.12.005>.

A BELIMOV, Andrei *et al.* Characterization of plant growth promoting rhizobacteria isolated from polluted soils and containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase. **Canadian Journal Of Microbiology**, [S.L.], v. 47, n. 7, p. 642-652, 1 jul. 2001. Canadian Science Publishing. <http://dx.doi.org/10.1139/w01-062>.

BISWAS, M. K.. Techniques for Increasing the Biological Efficiency of Paddy Straw Mushroom (*Volvariella Volvacea*) in Eastern India. **Food Science And Technology**, [s. l.], v. 4, n. 2, p. 52-57, abr. 2014. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/324111305_Techniques_for_Increasing_the_Biological_Efficiency_of_Paddy_Straw_Mushroom_Volvarella_Volvacea_in_Eastern_India. Acesso em: 14 jan. 2021.

BORAH, Tasvina R. *et al.* **Spawn Production and Mushroom Cultivation Technology**. Mile: Icar Research Complex For Neh Region, 2020. 46 p. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/341822811_Spawn_Production_and_Mushroom_Cultivation_Technology. Acesso em: 15 jan. 2021.

BRESINSKY, Andreas *et al.* **Tratado de botânica de Strasburger**. Alemanha: Artmed Editora, 2012. 627 p.

BURTON, Kerry *et al.* **Understanding mushroom nutrition: Project aimed at improving yield, substrate efficiency, utilisation, and flavor**. Ilha de Man, Irlanda: Agriculture And Horticulture Development Board, 2015.

BUSWELL, John A. *et al.* Edible Mushrooms: Attributes and Applications. In: CHANG, Shu-Ting *et al.* **Genetics and breeding of edible mushrooms**. Estados Unidos: Overseas Publishers Association Nv, 1993. p. 297-324.

CAGLARIRMAK, N. The nutrients of exotic mushrooms (*Lentinula edodes* and *Pleurotus* species) and an estimated approach to the volatile compounds. **Food Chemistry**, [S.L.], v. 105, n. 3, p. 1188-1194, 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.02.021>.

CHANG, Shu-Ting *et al.* **Training manual on mushroom cultivation technology**. Beijing, China: United Nations-Asian And Pacific Centre For Agricultural Engineering And Machinery (Un-Apcaem), 2009. 65 p.

CHANG, S. T.; BUSWELL, J. A. Mushroom nutraceuticals. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, [S.L.], v. 12, n. 5, p. 473-476, set. 1996. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/bf00419460>.

CHANG, Shu-Ting. **Mushrooms: cultivation, nutritional value, medicinal effect, and environmental impact**. 2. ed. Estados Unidos: Crc Press, 2004. 451 p.

CHENG, Zhenyu; PARK, Eunmi; GLICK, Bernard R.. 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase from *Pseudomonas putida* UW4 facilitates the growth of canola in the presence of salt. **Canadian Journal of Microbiology**, [S.L.], v. 53, n. 7, p. 912-918, jul. 2007. Canadian Science Publishing. <http://dx.doi.org/10.1139/w07-050>.

CHENG, Zhenyu *et al.* Transcriptional regulation of ACC deaminase gene expression in *Pseudomonas putida* UW4. **Canadian Journal of Microbiology**, [S.L.], v. 54, n. 2, p. 128-136, fev. 2008. Canadian Science Publishing. <http://dx.doi.org/10.1139/w07-128>.

CHUNG, Hwan-Chae *et al.* Basic Informations on the Characteristics of Strains of Oyster Mushroom. **The Korean Journal of Mycology**, Korea, v. 9, n. 3, p. 129-132, out. 1981. Disponível em: <https://www.koreascience.or.kr/article/JAKO198103040053758.pdf>. Acesso em: 14 jan. 2021.

COELHO, Rui. **Vantagens e desvantagens dos vários tipos de inóculo para cogumelos em troncos**: Laboratório de produção de micélio para cogumelos. 2017. Disponível em: <http://www.quadrante-natural.pt>. Acesso em: 10 dez. 2020.

DEACON, J.W.. **Fungal Biology**. 4. ed. Inglaterra: Oxford: Blackwell Publishing Ltd, 2006. 371 p.

DELUCCA, Anthony J. *et al.* The use of bacterial alginates to prepare biocontrol formulations. **Journal of Industrial Microbiology**, [S.L.], v. 6, n. 2, p. 129-134, out. 1990. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/bf01576432>.

DUAN, Jin *et al.* 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate (ACC) Deaminase Genes in Rhizobia from Southern Saskatchewan. **Microbial Ecology**, [S.L.], v. 57, n. 3, p. 423-436, 12 jun. 2008. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00248-008-9407-6>.

EIRA, Augusto Ferreira da *et al.* FUNGOS COMESTÍVEIS. In: ESPOSITO, Elisa; AZEVEDO, João Lúcio de. **Fungos uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. 2. ed. Caxias do Sul: Editora da Universidade de Caxias do Sul, 2010. Cap. 12. p. 379-448.

ESPOSITO, Elisa; AZEVEDO, João Lúcio de (org.). **Fungos uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. 2. ed. Caxias do Sul: Editora da Universidade de Caxias do Sul, 2010. 638 p.

ESPINOSA-URGEL, Manuel. *et al.* Root colonization by *Pseudomonas putida*: love at first sight. **Microbiology**, [S.L.], v. 148, n. 2, p. 341-343, 1 fev. 2002. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/00221287-148-2-341>.

EASTWOOD, Daniel C. *et al.* Environmental regulation of reproductive phase change in *Agaricus bisporus* by 1-octen-3-ol, temperature and CO₂. **Fungal Genetics And Biology**, [S.L.], v. 55, p. 54-66, jun. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fgb.2013.01.001>.

ESQUIVEL-COTE, Rosalba *et al.* IMPORTANCIA AGROBIOTECNOLÓGICA DE LA ENZIMA ACC DESAMINASA EN RIZOBACTERIAS, UNA REVISIÓN. **Revista Fitotecnia Mexicana**, [S.L.], v. 36, n. 3, p. 251-258, 11 set. 2013. Sociedad Mexicana de Fitogenetica A.C. <http://dx.doi.org/10.35196/rfm.2013.3.251>.

FERRAZ, André Luiz. FUNGOS DECOMPOSITORES DE MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS. In: ESPOSITO, Elisa; AZEVEDO, João Lúcio de. **Fungos uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. 2. ed. Caxias do Sul: Editora da Universidade de Caxias do Sul, 2010. Cap. 6. p. 215-242.

FUNAMI, Takahiro *et al.* Rheological properties of sodium alginate in an aqueous system during gelation in relation to supermolecular structures and Ca²⁺ binding. **Food Hydrocolloids**, [S.L.], v. 23, n. 7, p. 1746-1755, out. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.02.014>.

GAMALERO, Elisa. *et al.* Interactions between *Pseudomonas putida* UW4 and *Gigaspora rosea* BEG9 and their consequences for the growth of cucumber under salt-stress conditions. **Journal of Applied Microbiology**, [S.L.], v. 108, n. 1, p. 236-245, jan. 2010. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04414.x>.

GAMALERO, Elisa *et al.* Synergistic interactions between the ACC deaminase-producing bacterium *Pseudomonas putida* UW4 and the AM fungus *Gigaspora rosea* positively affect cucumber plant growth. **Fems Microbiology Ecology**, [S.L.], v. 64, n. 3, p. 459-467, 15 abr. 2008. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6941.2008.00485.x>.

GALVAGNO, Miguel Angel; FORCHIASSIN, Flávia. FISILOGIA DOS FUNGOS: NUTRIÇÃO E METABOLISMO. In: ESPOSITO, Elisa; AZEVEDO, João Lúcio de. **Fungos uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. 2. ed. Caxias do Sul: Editora da Universidade de Caxias do Sul, 2010. Cap. 4. p. 125-169.

GASTON, Ortiz *et al.* Artificial spawn generation based on alginate encapsulated mycelium as inoculum for mushroom cultivation. **African Journal Of Biotechnology**, [S.L.], v. 16, n. 34, p. 1776-1783, 23 ago. 2017. Academic Journals. <http://dx.doi.org/10.5897/ajb2017.16065>

GLICK, Bernard R. *et al.* The enhancement of plant growth by free-living bacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, [S.L.], v. 41, n. 2, p. 109-117, 1 fev. 1995. Canadian Science Publishing. <http://dx.doi.org/10.1139/m95-015>.

GLICK, Bernard R. *et al.* A Model For the Lowering of Plant Ethylene Concentrations by Plant Growth-promoting Bacteria. **Journal of Theoretical Biology**, [S.L.], v. 190, n. 1, p. 63-68, jan. 1998. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1006/jtbi.1997.0532>.

GLICK, Bernard R. *et al.* 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase mutants of the plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2 do not stimulate canola root elongation. **Canadian Journal of Microbiology**, [S.L.], v. 40, n. 11, p. 911-915, 1 nov. 1994. Canadian Science Publishing. <http://dx.doi.org/10.1139/m94-146>.

GLICK, Bernard R. *et al.* Promotion of Plant Growth by Bacterial ACC Deaminase. **Critical Reviews in Plant Sciences**, [S.L.], v. 26, n. 5-6, p. 227-242, 23 out. 2007. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/07352680701572966>.

GRICHKO, Varvara P *et al.* Identification of DNA sequences that regulate the expression of the *Enterobacter cloacae* UW4 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase gene. **Canadian Journal of Microbiology**, [S.L.], v. 46, n. 12, p. 1159-1165, 1 dez. 2000. Canadian Science Publishing. <http://dx.doi.org/10.1139/w00-113>.

GUNDE-CIMERMAN, Nina *et al.* *Pleurotus* fungi produce mevinolin, an inhibitor of HMG CoA reductase. **Fems Microbiology Letters**, [S.L.], v. 113, n. 3, p. 333-337, nov. 1993. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.1993.tb06536.x>.

JACOBSON, Christian B. *et al.* Partial purification and characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase from the plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2. **Canadian Journal of Microbiology**, [S.L.], v. 40, n. 12, p. 1019-1025, 1 dez. 1994. Canadian Science Publishing. <http://dx.doi.org/10.1139/m94-162>.

JANG, Kab-Yeul *et al.* Characterization of Fruitbody Morphology on Various Environmental Conditions in *Pleurotus ostreatus*. **Mycobiology**, [S.L.], v. 31, n. 3, p. 145-150, 2003. Mycobiology (KAMJE). <http://dx.doi.org/10.4489/myco.2003.31.3.145>.

JIA, Yan-Jun *et al.* Synthesis and Degradation of 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic Acid by *Penicillium citrinum*. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, [S.L.], v. 63, n. 3, p. 542-549, jan. 1999. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1271/bbb.63.542>.

JIA, Yan-Jun *et al.* 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) Deaminase Induced by ACC Synthesized and Accumulated in *Penicillium citrinum* Intracellular Spaces. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, [S.L.], v. 64, n. 2, p. 299-305, jan. 2000. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1271/bbb.64.299>.

KHAN, Foziya *et al.* EFFECT OF PHYSIOCHEMICAL FACTORS ON FRUITING BODY FORMATION IN MUSHROOM. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, [S.L.], v. 9, n. 10, p. 33-36, 2 out. 2017. Innovare Academic Sciences Pvt Ltd. <http://dx.doi.org/10.22159/ijpps.2017v9i10.20086>.

KHAN, M. Wajid *et al.* Effect of different levels of lime and pH on mycelial growth and production efficiency of oyster mushroom (*Pleurotus* spp.). **Pakistan Journal of Botany**, [s. l.], v. 45, n. 1, p. 297-302, jan. 2013. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/287905250_Effect_of_different_levels_of_lime_and_pH_on_mycelial_growth_and_production_efficiency_of_oyster_mushroom_Pleurotus_SPP. Acesso em: 15 jan. 2021.

KUMMER, P. Der Führer in die Pilzkunde 23. **Verlag von E. Luppe's Buchhandlung**, Zerbst, 1871.

GALVAGNO, Miguel Angel; FORCHIASSIN, Flávia. FISILOGIA DOS FUNGOS: NUTRIÇÃO E METABOLISMO. In: ESPOSITO, Elisa; AZEVEDO, João Lúcio de. **Fungos uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. 2. ed. Caxias do Sul: Editora da Universidade de Caxias do Sul, 2010. Cap. 4. p. 125-169.

GREWAL, S. I. S. *et al.* Phenotypic variation of *Pseudomonas putida* and *P. tolaasii* affects the chemotactic response to *Agaricus bisporus* mycelial exudate. **Journal of General Microbiology**, [S.L.], v. 137, n. 12, p. 2761-2768, 1 dez. 1991. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/00221287-137-12-2761>.

HAMPP, R.; TARKKA, M. T. Interaction with Soil Microorganisms. **Soil Biology**, [S.L.], p. 197-210, 2009. Springer Berlin Heidelberg. http://dx.doi.org/10.1007/978-3-540-95894-9_12.

HOBBIE, Sarah E. *et al.* Effects of plant species on nutrient cycling. **Trends in Ecology & Evolution**, [S.L.], v. 7, n. 10, p. 336-339, out. 1992. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0169-5347\(92\)90126-v](http://dx.doi.org/10.1016/0169-5347(92)90126-v).

HOFFMAN, Ira C. *et al.* **Effect of supplementary B-complex vitamins on yields and vitamin content of mushrooms**: research bulletin 815. Ohio: Ohio Agricultural Experiment Station, 1958. 27 p.

HONTZEAS, Nikos *et al.* Changes in Gene Expression in Canola Roots Induced by ACC-Deaminase-Containing Plant-Growth-Promoting Bacteria. **Molecular Plant-Microbe Interactions®**, [S.L.], v. 17, n. 8, p. 865-871, ago. 2004a. Scientific Societies. <http://dx.doi.org/10.1094/mpmi.2004.17.8.865>.

HONTZEAS, Nikos *et al.* Expression and characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase from the rhizobacterium *Pseudomonas putida* UW4: a key enzyme in bacterial plant growth promotion. **Biochimica Et Biophysica Acta (Bba) - Proteins And Proteomics**, [S.L.], v. 1703, n. 1, p. 11-19, dez. 2004b. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbapap.2004.09.015>.

HONMA, Mamoru *et al.* Metabolism of 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic Acid. **Agricultural and Biological Chemistry**, [S.L.], v. 42, n. 10, p. 1825-1831, out. 1978. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/00021369.1978.10863261>.

HONTZEAS, N. *et al.* Evidence for Horizontal Transfer of 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate Deaminase Genes. **Applied and Environmental Microbiology**, [S.L.], v. 71, n. 11, p. 7556-7558, nov. 2005. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.71.11.7556-7558.2005>.

HOVER, Tal *et al.* Mechanisms of Bacterial (*Serratia marcescens*) Attachment to, Migration along, and Killing of Fungal Hyphae. **Applied and Environmental Microbiology**, [S.L.], v. 82, n. 9, p. 2585-2594, 19 fev. 2016. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.04070-15>.

KOHLMEIER, Stefanie *et al.* Taking the Fungal Highway: mobilization of pollutant-degrading bacteria by fungi. **Environmental Science & Technology**, [S.L.], v. 39, n. 12, p. 4640-4646, jun. 2005. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/es047979z>.

LAMBERT, Edmund B. *et al.* EFFECT OF EXCESS CARBON DIOXIDE ON GROWING MUSHROOMS. **Journal of Agricultural Research**, Washington, v. 47, n. 8, p. 599-608, out. 1933. Disponível em: <https://naldc.nal.usda.gov/download/IND43968375/PDF#:~:text=The%20second%20group%20of%20experiments,distinct%20stunting%20of%20the%20mushrooms..> Acesso em: 15 jan. 2021.

LEE, Byung-Joo *et al.* Characteristics and suitability of various cereal grains in spawn production of button mushroom. **Journal of Mushroom**, [S.L.], v. 12, n. 4, p. 237-243, 31 dez. 2014. The Korean Society of Mushroom Science. <http://dx.doi.org/10.14480/jm.2014.12.4.237>.

LI, Tao *et al.* 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate: a novel and strong chemoattractant for the plant beneficial rhizobacterium *pseudomonas putida* UW4. **Molecular Plant-Microbe Interactions®**, [S.L.], v. 32, n. 6, p. 750-759, jun. 2019. Scientific Societies. <http://dx.doi.org/10.1094/mpmi-11-18-0317-r>.

LEITE, Clarice Loguercio. TAXONOMIA DOS FUNGOS. In: ESPOSITO, Elisa; AZEVEDO, João Lúcio de. **Fungos uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. 2. ed. Caxias do Sul: Editora da Universidade de Caxias do Sul, 2010. Cap. 2. p. 47-88.

LEITE, Clarice Loguercio; ESPOSITO, Elisa. FUNGOS: ESTRUTURA E ULTRAESTRUTURA. In: ESPOSITO, Elisa *et al.* **Fungos uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. 2. ed. Caxias do Sul: Editora da Universidade de Caxias do Sul, 2010. Cap. 1. p. 15-44.

LINDERMAN, R. G. *et al.* Mycorrhizal Interactions with the Rhizosphere Microflora: The Mycorrhizosphere Effect. **Phytopathology**, Estados Unidos, v. 78, n. 3, p. 366-371, 1988. Disponível em: https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1988Articles/Phyto78n03_366.PDF. Acesso em: 15 jan. 2021.

MANDEEL, Q. A. *et al.* Cultivation of oyster mushrooms (*Pleurotus* spp.) on various lignocellulosic wastes. **World Journal of Microbiology And Biotechnology**, [S.L.], v. 21, n. 4, p. 601-607, jun. 2005. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11274-004-3494-4>.

MARINO, Regina Helena *et al.* Morphomolecular characterization of *Pleurotus ostreatus* (Jacq. Fr.) kummer strains in relation to luminosity and temperature of frutification. **Scientia Agricola**, [S.L.], v. 60, n. 3, p. 531-535, 2003. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0103-90162003000300018>.

MASAPHY, Segula *et al.* Scanning Electron Microscope Studies of Interactions between *Agaricus bisporus* (Lang) Sing Hyphae and Bacteria in Casing Soil. **Applied and Environmental Microbiology**, [S.L.], v. 53, n. 5, p. 1132-1137, 1987. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.53.5.1132-1137.1987>.

MILLER, N. *et al.* The involvement of microbiological components of peat based casing materials in fructification of *Agaricus bisporus*. **The International Society of Mushroom Science**, Estados Unidos, v. 14, n. 38, p. 327-345, 1995.

NASCIMENTO, Francisco X. *et al.* New Insights into 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate (ACC) Deaminase Phylogeny, Evolution and Ecological Significance. **Plos One**, [S.L.], v. 9, n. 6, p. 99168-99184, 6 jun. 2014. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0099168>.

OHM, Robin. **Regulation of mushroom formation in *Schizophyllum commune***. 2010. 187 f. Tese (Doutorado) - Curso de Molecular Microbiology, Utrecht University, Holanda, 2010.

PARK, J. Y. *et al.* Sporophore production of *Agaricus bisporus* in aseptic environments. **Antonie van Leeuwenhoek**, [S.L.], v. 35, n. 1, p. 523-528, dez. 1969. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/bf02219169>.

PATEL, Hardik *et al.* Effect of different culture conditions and inducers on production of lacasse by a basidiomycete fungal isolate *Pleurotus ostreatus* HP-1 under solid-state fermentation.. **Bioresources**, India, v. 4, n. 1, p. 268-284, 2009.

PATIL, Shyam Soplanrao *et al.* The nutritional value of *Pleurotus ostreatus* (Jacq:Fr) Kumm cultivated on different lignocellulosic agrowastes. **Innovative Romanian Food Biotechnology**, Maharashtra, India, v. 7, p. 66-76, 2010. Disponível em: <http://www.bioaliment.ugal.ro/revista/7/paper%2079.pdf>. Acesso em: 15 jan. 2021.

PAUL, Etienne *et al.* Survival of alginate-entrapped cells of *Azospirillum lipoferum* during dehydration and storage in relation to water properties. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [S.L.], v. 40, n. 1, p. 34-39, out. 1993. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/bf00170425>.

PION, Martin *et al.* Gains of Bacterial Flagellar Motility in a Fungal World. **Applied and Environmental Microbiology**, [S.L.], v. 79, n. 22, p. 6862-6867, 30 ago. 2013. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.01393-13>.

QUEIROZ, Elvio Cardoso *et al.* Mineral supplementation and productivity of the *Shiitake* mushroom on eucalyptus logs. **Scientia Agricola**, [S.L.], v. 61, n. 3, p. 260-265, jun. 2004. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0103-90162004000300003>.

RAJARATHNAM, S. *et al.* *Pleurotus* mushrooms. Part IB. Pathology, in vitro and in vivo growth requirements, and world status. **C R C Critical Reviews in Food Science And Nutrition**, [S.L.], v. 26, n. 3, p. 243-311, jan. 1988. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/10408398809527469>.

RAJARATHNAM, S. *et al.* *Pleurotus* mushrooms. Part I A. morphology, life cycle, taxonomy, breeding, and cultivation. **C R C Critical Reviews in Food Science And Nutrition**, [S.L.], v. 26, n. 2, p. 157-223, jan. 1987. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/10408398709527465>.

RAUT, Jay Kant *et al.* Trade and Conservation of Morel Mushrooms in Nepal. **International Journal of Natural Resource Ecology and Management**, [S.L.], v. 4, n. 6, p. 183-187, 2019. Science Publishing Group. <http://dx.doi.org/10.11648/j.ijnrem.20190406.14>.

REMMINGHORST, Uwe *et al.* Bacterial alginates: from biosynthesis to applications. **Biotechnology Letters**, [S.L.], v. 28, n. 21, p. 1701-1712, 16 ago. 2006. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10529-006-9156-x>.

RODRÍGUEZ, Gustavo. Cultivo de hongos comestibles. **Fruticultura & Diversificación**, Comahue, Argentina, n. 52, p. 10-15, 2007. Disponível em: https://inta.gob.ar/sites/default/files/inta_revista-fd_52_hongos-comestibles.pdf. Acesso em: 15 jan. 2021.

ROYSE, Daniel J. *et al.* **Six steps to mushroom farming**: college of agricultural sciences agricultural research and cooperative extension. 2. ed. Pennsylvania: Pennstate, 2007. 17 p.

RUSSO, A. *et al.* Improved delivery of biocontrol *Pseudomonas* and their antifungal metabolites using alginate polymers. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [S.L.], v. 44, n. 6, p. 740-745, fev. 1996. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/bf00178612>.

SARAF, Meenu *et al.* The Role of ACC Deaminase Producing PGPR in Sustainable Agriculture. **Plant Growth and Health Promoting Bacteria**, [S.L.], p. 365-385, 2010. Springer Berlin Heidelberg. http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-13612-2_16.

HAQ, Saima Sadiq M Inam Ul *et al.* Bioremediation Potential of White Rot Fungi, *Pleurotus* Spp against Organochlorines. **Journal of Bioremediation & Biodegradation**, [S.L.], v. 06, n. 05, p. 71-78, 2015. OMICS Publishing Group. <http://dx.doi.org/10.4172/2155-6199.1000308>.

SMIDSROD, O *et al.* Alginate as immobilization matrix for cells. **Trends in Biotechnology**, [S.L.], v. 8, p. 71-78, 1990. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0167-7799\(90\)90139-o](http://dx.doi.org/10.1016/0167-7799(90)90139-o).

SRIVASTAVA, H. C. *et al.* Nutrition Requirements of *Pleurotus flabellatus*. **Applied Microbiology**, [S.L.], v. 19, n. 1, p. 166-169, 1970. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.19.1.166-169.1970>.

SHEEHY, R e *et al.* Isolation, sequence, and expression in *Escherichia coli* of the *Pseudomonas* sp. strain ACP gene encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase. **Journal of Bacteriology**, [S.L.], v. 173, n. 17, p. 5260-5265, 1991. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jb.173.17.5260-5265.1991>.

STAMETS, Paul. **Growing Gourmet and Medicinal Mushrooms**. 3. ed. California: Speed Press, 2001. 592 p.

STAMETS, Paul. **The Mushroom Cultivator- A Practical Guide to Growing Mushrooms at home**. Estados Unidos: Seattle: Homestead Book Co, 1984. 415 p.

STANEK, M. Bacteria Associated with Mushroom Mycelium (*Agaricus bisporus* (Lg.) Sing.) in Hyphosphere. **The International Society for Mushroom Science**, Estados Unidos, v. 9, n. 9, p. 327-345, 1976.

STEFFEN, Gerusa *et al.* **Produção de cogumelos comestíveis no Brasil – Um mercado em ascensão: campo e negócios**. Campo e negócios. 2019. Disponível em: <http://revistacamponegocios.com.br>. Acesso em: 10 dez. 2020.

SULTANA, Rebeka. Influence of Substrate pH and Watering Frequency on the Growth of Oyster Mushroom. **International Journal of Plant Biology & Research**, Bangladesh, v. 6, n. 4, p. 1097-2002, 2018. Disponível em: <https://www.jscimedcentral.com/PlantBiology/plantbiology-6-1097.pdf>. Acesso em: 15 jan. 2021.

TURNER, E. M. *et al.* Production of Ethylene and Other Volatiles and Changes in Cellulase and Laccase Activities during the Life Cycle of the Cultivated Mushroom, *Agaricus bisporus*. **Journal of General Microbiology**, [S.L.], v. 91, n. 1, p. 167-176, 1 nov. 1975. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/00221287-91-1-167>.

WANG, Dianxia *et al.* Biological efficiency and nutritional value of *Pleurotus ostreatus* cultivated on spent beer grain. **Bioresource Technology**, [S.L.], v. 78, n. 3, p. 293-300, jul. 2001. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0960-8524\(01\)00002-5](http://dx.doi.org/10.1016/s0960-8524(01)00002-5).

WARGO, Matthew J *et al.* Fungal—bacterial interactions: a mixed bag of mingling microbes. **Current Opinion in Microbiology**, [S.L.], v. 9, n. 4, p. 359-364, ago. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2006.06.001>.

YILDIZ, Sibel *et al.* Some lignocellulosic wastes used as raw material in cultivation of the *Pleurotus ostreatus* culture mushroom. **Process Biochemistry**, [S.L.], v. 38, n. 3, p. 301-306, nov. 2002. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0032-9592\(02\)00040-7](http://dx.doi.org/10.1016/s0032-9592(02)00040-7).

YU, Yeong-Biau *et al.* 1-Aminocyclopropanecarboxylate synthase, a key enzyme in ethylene biosynthesis. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, [S.L.], v. 198, n. 1, p. 280-286, nov. 1979. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0003-9861\(79\)90420-x](http://dx.doi.org/10.1016/0003-9861(79)90420-x).

ZANETTI, Ana Luísa *et al.* Suplementação da cana-de-açúcar com guandu no cultivo de *Pleurotus* sp. 'Florida'. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 7, p. 959-964, set. 1997. Disponível em: <https://core.ac.uk/download/pdf/228691678.pdf>. Acesso em: 15 jan. 2021.

ZHANG, Chaohui *et al.* Downregulation of Ethylene Production Increases Mycelial Growth and Primordia Formation in the Button Culinary-Medicinal Mushroom, *Agaricus bisporus* (Agaricomycetes). **International Journal of Medicinal Mushrooms**, [S.L.], v. 18, n. 12, p. 1131-1140, 2016. Begell House. <http://dx.doi.org/10.1615/intjmedmushrooms.v18.i12.80>.

5 CAPÍTULO I

Bactérias com atividade ACC deaminase na produção de etileno por *Pleurotus ostreatus* *in vitro*

RESUMO

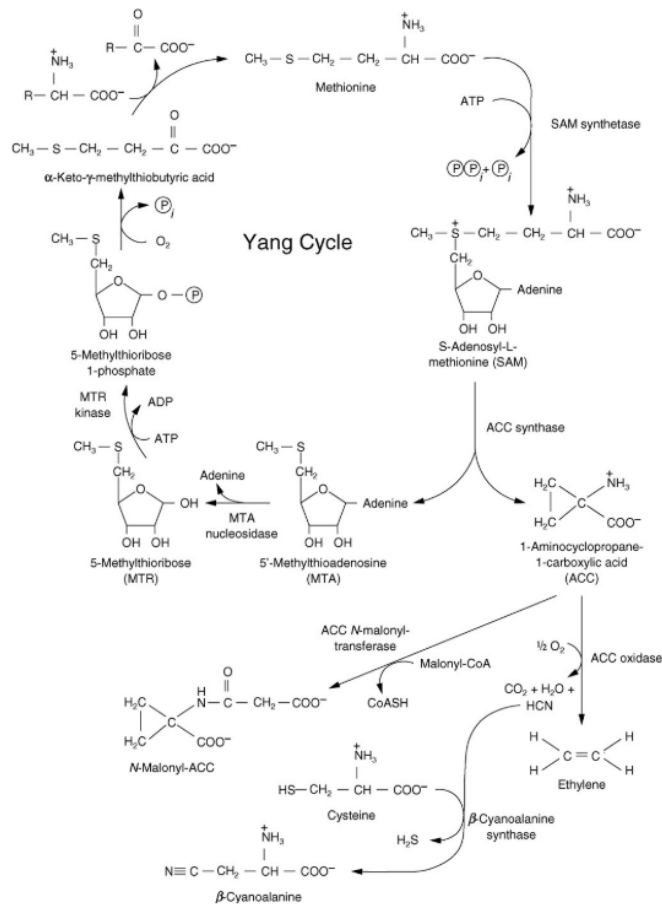
O etileno é um hormônio conhecido por regular o crescimento vegetal. Seu precursor imediato é o ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) que é convertido a etileno por meio da enzima ACC oxidase (ACO). Sob condições de estresse as plantas respondem aumentando a concentração de etileno a níveis deletérios acelerando os processos de florescimento e senescência. A enzima ACC deaminase (ACCD) codificada pelo gene *acdS* é produzida por algumas bactérias e tem sido usada na agricultura para degradar o excesso de ACC produzido pelas plantas. Diversas pesquisas têm apontado que o papel regulador do etileno descrito nas plantas acontece também em fungos, particularmente em basidiomicetos. Resultados de trabalhos realizados com *Agaricus bisporus* indicam que o co-cultivo com bactérias produtoras da enzima ACCD teve efeitos positivos na diminuição dos níveis de etileno produzidos pelo fungo. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de *Pseudomonas putida* UW4 *acdS*⁺ na redução dos níveis de etileno produzidos por *Pleurotus ostreatus in vitro*. Para comparar o efeito da presença/ausência do gene *acdS* foi empregada uma cepa mutante da bactéria, ou seja, sem o gene *acdS* (UW4 *acdS*⁻). As bactérias foram inoculadas na superfície do micélio de *P. ostreatus* previamente inoculado em frascos de vidro tipo penicilina e incubados para permitir sua interação. Alíquotas de 1 mL foram retiradas do espaço livre dos frascos com auxílio de seringas hipodérmicas. As amostras foram injetadas em cromatógrafo a gás GC-6890 (Hewlett-Packard, CA, EUA) acoplado a um detector por ionização de chama (FID). Os dados da produção bruta de etileno foram normalizados considerando a concentração inicial de etileno de cada tratamento. Assim, foi obtida a proporção de etileno (%) produzida por cada tratamento ao longo do tempo. A análise do perfil temporal de etileno mostrou que o fungo produziu 140 nL/g/h de etileno depois de 60 h de incubação, acumulando 361,39 nL/g/h depois de 156 h de crescimento. Quanto ao co-cultivo com as bactérias, foi observado uma proporção de etileno $\varepsilon = 42\%$ no fungo inoculado com a bactéria *P. putida* UW4 *acdS*⁺, $\varepsilon = 74\%$ no fungo inoculado com *P. putida* UW4 *acdS*⁻, e $\varepsilon = 97\%$ no tratamento controle. Verifica-se, assim, que a associação de bactérias contendo o gene *acdS* apresenta potencial para reduzir os níveis de etileno produzidos pelo fungo e que este comportamento pode ser aproveitado em aplicações biotecnológicas em que se precise regular os níveis de etileno em produções comerciais de cogumelos comestíveis.

Palavras chave: Etileno. ACC deaminase. Ácido ACC. Co-cultivo. *Pseudomonas putida*. *Pleurotus ostreatus*.

5.1 INTRODUÇÃO

O etileno (C_2H_4) é um hidrocarboneto insaturado da família das olefinas. É um gás incolor, levemente adocicado e de odor etéreo que no começo era conhecido como o “hormônio do amadurecimento”. Porém, mais tarde, diversas pesquisas revelaram que seu papel era muito mais amplo dado seus vários efeitos no crescimento e desenvolvimento vegetal (ARSHAD & FRANGENBERGER, 2002). O etileno regula vários processos fisiológicos em plantas, estimulando a germinação de sementes, a indução de respostas ao estresse biótico e abiótico, as interações planta-microrganismo, a senescência floral, entre outros. (KHAN, 2006; TAIZ *et al.*, 2009; MANZANO *et al.*, 2014).

Figura 5.1 – Ciclo de Yang e formação de etileno e outros produtos a partir do ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC).

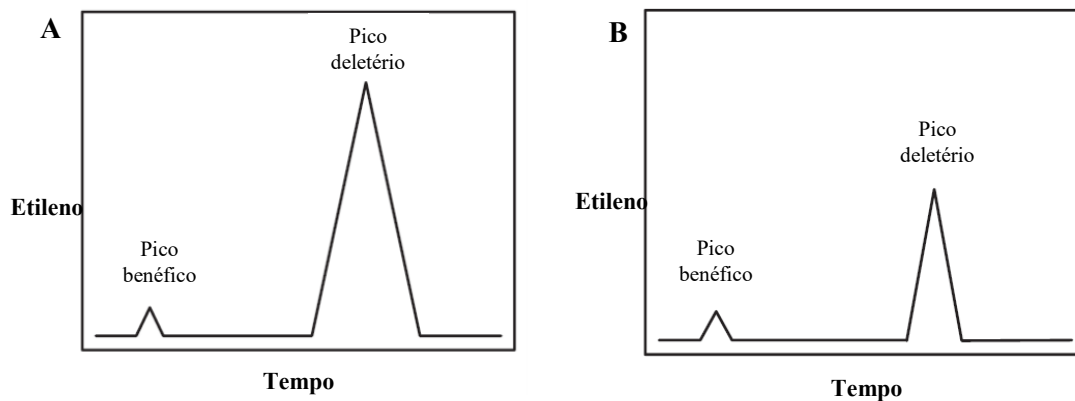


Fonte: retirado de Bradford (2008)

Sua síntese é realizada a partir da metionina, que com a participação do ATP, via enzima AdoMet sintase, é convertida em S-adenosil-metionina (SAM). A SAM é convertida no precursor imediato do etileno, o ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) por meio da enzima ACC sintase (ACS). Finalmente, o etileno é produzido pela oxidação do ACC num processo mediado pela enzima ACC oxidase (ACO). A via metabólica do etileno em plantas foi descrita por Adams e Yang (1979) que identificaram a síntese do ACC como o passo limitante na produção do etileno, destacando a importância bioquímica da enzima ACS na conversão de SAM a ACC (ADAMS & YANG, 1979; YU *et al.*, 1979) (Fig. 5.1).

Quando as plantas são submetidas a algum estresse ambiental, é produzido um pico inicial de etileno que ativa a transcrição de genes de defesa da planta. Pouco depois é produzido um segundo pico de etileno muito maior que pode causar a inibição do alongamento das raízes e da nodulação, o aparecimento de hipertrofias e a aceleração dos processos de senescência e abscisão (GLICK *et al.*, 2007) (Fig. 5.2.). Uma das formas de controlar as altas concentrações de etileno reside na utilização de bactérias produtoras da enzima ACC deaminase (ACCD). Por meio desta enzima, as bactérias degradam o ACC, transformando-o em α -cetobutirato e amônia, o que causa redução dos níveis de etileno. As bactérias com atividade ACCD diminuem a extensão da inibição causada logo após o maior pico de etileno (Fig. 5.2).

Figura 5.2 – Representação esquemática da produção de etileno em plantas em função do tempo após ser submetida a um estresse ambiental. A: Na ausência de bactérias exógenas. B: Na presença de bactérias produtoras da enzima ACC deaminase (ACCD).



Fonte: adaptado de Glick (2007)

Como consequência, as plantas que crescem em associação com esse tipo de bactéria são mais resistentes aos efeitos do estresse desencadeado pelo aumento do etileno. A enzima ACCD pertence ao grupo das deaminases dependentes de piridoxal fosfato (PLP). Ela é codificada pelo gene *acdS* que tem sido identificado e caracterizado em vários microrganismos, majoritariamente bactérias e fungos (SHEENY *et al.*, 1991; MINAMI *et al.*, 1998; JIA *et al.*, 1999; HONZEATS *et al.*, 2005).

A presença desta enzima é fundamental para o funcionamento de muitas bactérias e fungos promotores do crescimento vegetal. Estudos conduzidos com *Pseudomonas putida* GR12-2 e *Pseudomonas* sp. UW4 mostraram que quando o gene *acdS* foi deletado dessas cepas, elas perderam sua habilidade para promover o alongamento de raízes de plantas de canola (GLICK *et al.*, 1994).

A produção de etileno não é exclusiva das plantas. Curiosamente, sua produção também tem sido observada em fungos como *Penicillium digitatum*, *Mucor hiemalis*, *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus flavus*, *Thielavia* sp., *Chaetomium* sp., *Botrytis cinerea*, entre outros (ILAG; CURTIS, 1968; SMITH, 1976; GRAHAM; LINDERMAN, 1980; CHALUTZ *et al.*, 1983; CRISTESCU, 2002).

Técnicas como a cromatografia gasosa têm sido úteis para medir a produção de etileno em fungos. Wood e Hammond (1977) consideraram o etileno um metabólito importante para a frutificação dos fungos. Eles estudaram a produção de etileno em culturas de *Agaricus bisporus* e observaram que a concentração do hormônio aumentava com a formação dos basidiomas. Por outro lado, Turner e colaboradores (1975) sugeriram que o etileno era responsável pelas “quebras” observadas em basidiomas de *A. bisporus* durante o armazenamento em embalagens comerciais (TURNER *et al.*, 1975), mostrando que o etileno pode apresentar dupla função. De acordo com Fries (1973), este metabólito pode provocar tanto um efeito estimulador quanto inibitório do crescimento fúngico, dependendo da sua concentração e a resposta específica do fungo.

A biossíntese de etileno em microrganismos, pode acontecer por duas vias: a via do 2- ceto-4-ácido metilbutírico (KMB), como acontece com *Escherichia coli* e *Cryptococcus albidus*, ou a via do 2-oxoglutarato que está presente em *P. digitatum* e *Pseudomonas syringae* (INCE & KNOWLES, 1986; FUKUDA, *et al.*, 1989; NAGAHAMA, *et al.*, 1991). No entanto, a via metabólica do etileno em fungos tem sido discutida. Alguns autores sugerem que certos fungos são

capazes de produzir etileno pela mesma via que as plantas, isto é, a via ACC (JIA *et al.*, 2000; VITERBO *et al.*, 2010). Análises filogenéticas têm revelado a presença de genes homólogos da ACS em várias cepas de fungos como *Penicillium citrinum*, que é capaz de sintetizar ACC por meio desta enzima (JIA *et al.*, 1999; NASCIMENTO *et al.*, 2014). Da mesma forma, Chen e colaboradores (2014) observaram que a produção de etileno em *A. bisporus* foi estimulada na presença de metionina, comprovando que nesse fungo a produção de etileno é dependente do ACC. Com o objetivo de verificar se *A. bisporus* tem um mecanismo similar às plantas para produzir etileno, os autores avaliaram os efeitos do hormônio em *A. bisporus in vitro* quando associado a cepas de *P. putida* UW4 com atividade ACCD e sua respectiva mutante. Os autores observaram um efeito inibidor do etileno na formação dos primórdios, e encontraram que a inibição foi reduzida quando o fungo foi co-cultivado em associação com a bactéria contendo o gene *acdS*. O estudo sugere que a enzima produzida pela cepa UW4 foi capaz de hidrolisar o ACC produzido pelas hifas do fungo, diminuindo a concentração de etileno no meio e promovendo seu crescimento. Esses resultados indicam que mecanismos similares aos que ocorrem no modelo mutualístico entre plantas e bactérias para promover o crescimento vegetal podem estar envolvidos na formação das estruturas de frutificação de fungos em presença de bactérias expressando o gene *acdS* (GLICK *et al.*, 1998).

Em contraste com *A. bisporus*, os efeitos de bactérias com atividade ACDD em *Pleurotus ostreatus* não têm sido descritos. Alguns estudos têm relatado efeitos positivos de cepas de *Pseudomonas* sp. na formação de primórdios nesse fungo (CHO *et al.*, 2003; CHO *et al.*, 2008; KIM *et al.*, 2008). Kim e colaboradores (2008) observaram um efeito estimulante de *Pseudomonas* sp. P7014 no crescimento micelial e na formação de basidiomas de *Pleurotus eryngii* cultivado comercialmente. No entanto, os mecanismos envolvidos nesses efeitos positivos não são bem compreendidos. Alguns desses mecanismos incluem a habilidade das bactérias em se aderirem ao micélio do fungo e a liberação de certos compostos produzidos pelas bactérias que poderiam ter um efeito gatilho na promoção do crescimento micelial e na formação de basidiomas (KIM *et al.*, 2008; SIMON *et al.*, 2015).

Considerando a evidencia relacionada ao sinergismo entre fungos e bactérias e a importância de elucidar os mecanismos envolvidos no desenvolvimento dos fungos relacionados ao etileno, este trabalho teve como objetivo utilizar *P. ostreatus* como modelo fúngico num sistema de co-cultivo com bactérias com atividade ACCD. Assim, este capítulo propõe vários objetivos:

1. Determinar a produção de etileno (*in vitro*) num isolado de *P. ostreatus*;
2. Estimar o perfil de produção de etileno de *P. ostreatus* ao longo do tempo;
3. Avaliar o efeito de bactérias com atividade ACCD na redução dos níveis de etileno em *P. ostreatus*;
4. Determinar se o efeito na redução dos níveis de etileno produzidos por *P. ostreatus* está relacionado ao gene *acdS*;
5. Comprovar se a produção de etileno (*in vitro*) em *P. ostreatus* é estimulada na presença do ACC em meio de cultura.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Cepas

A cepa *P.ostreatus* FB-PL224 usada neste estudo foi fornecida pela empresa *Fungi Brasilis & Vegetais Verdes* e foi mantida no laboratório em meio BDA (batata-dextrose-ágar) a 25 °C até o momento das análises. Com auxílio de um furador, discos de micélio de 8 mm de diâmetro foram obtidos de placas de Petri com colônias de aproximadamente 20 dias de crescimento.

As duas cepas de *P. putida* UW4, a selvagem (UW4 *acdS*⁺) e a mutante (UW4 *acdS*⁻) foram fornecidas pelo Dr. B. R. Glick, da Universidade de Waterloo, Canada. As bactérias foram mantidas a 28 °C em Ágar Triptona de Soja (TSA). O meio de cultura da cepa mutante foi suplementado com tetraciclina para manter a mutação do gene *acdS* (resistente à tetraciclina). Para a obtenção das suspensões bacterianas, as bactérias foram semeadas em meio TSA pelo método de estriamento e incubadas a 28° C durante 24 h. A massa bacteriana de 1 placa/bactéria foi retirada com o auxílio de uma alça estéril e transferida para um frasco tipo Erlenmeyer de 250 mL contendo 150 mL de meio caldo Tripticaseína de Soja (TSB). Os Erlenmeyers inoculados foram dispostos em uma mesa agitadora a 180 rpm, a 28° C overnight para a multiplicação das bactérias. As suspensões bacterianas foram ajustadas em uma densidade óptica (DO) de 0,25 em meio TSB com o auxílio de um espectrotômetro HEWLET PACKARD 8453. Uma alíquota de 100 µL de cada suspensão bacteriana foi diluída em 900 µL de meio TSB para determinar as unidades formadoras de colônia (UFC) correspondentes à DO de 0,25 pelo método de microplaqueamento. Para isso, uma alíquota de 5 µL foi semeado em placas contendo meio TSA e incubado a 28° C durante 24

h. No fim desse período, foi realizada a contagem bacteriana. A contagem resultante de células bacterianas foi na ordem de 10^{-8} UFC/mL.

5.2.2 Perfil temporal de produção de etileno de *Pleurotus ostreatus*

O perfil de produção de etileno de *P. ostreatus* foi determinado com e sem a presença de bactérias. Para isso, *P. ostreatus* foi inoculado em frascos de vidro tipo penicilina vedados com tampa de silicone para evitar a perda do etileno produzido. As leituras de etileno foram realizadas a cada 24 h para avaliar o perfil de produção de etileno do fungo ao longo do tempo.

5.2.2.1 Preparo das amostras e tratamentos

As amostras foram constituídas por frascos de vidro tipo penicilina de 60 mL contendo 15 mL de meio ágar extrato de malte. Estes foram esterilizados em autoclave a 121 °C durante 15 min e na sequência mantidos em temperatura ambiente até a solidificação do meio de cultura. Uma vez em temperatura ambiente os frascos foram inoculados em capela de fluxo laminar com 1 disco de micélio de *P. ostreatus* de 8 mm de diâmetro realizados com auxílio de um furador. Somente quando o fungo completou 60 h de crescimento, foi co-cultivado com bactérias (Fig. 5.3).

Figura 5.3 – Frascos de penicilina inoculados com micélio de *Pleurotus ostreatus*.



Fonte: o autor (2020)

Para isso, as suspensões das cepas selvagem (PL+UW4 *acdS*⁺) e mutante (PL+UW4 *acdS*⁻) foram preparadas previamente em meio TSB como descrito no item 5.2.1. A DO foi ajustada em

0,25 com auxílio de um espectrofotômetro para um equivalente de células bacterianas na ordem de 10^{-8} UFC/mL.

Para o co-cultivo do fungo com as bactérias, foram definidos 3 tratamentos com 5 repetições: tratamento Controle (*P. ostreatus* sem bactéria), tratamento UW4*acdS*⁺ (*P. ostreatus* inoculado com *P. putida acdS*⁺) e tratamento UW4*acdS*⁻ (*P. ostreatus* inoculado com *P. putida acdS*⁻). Os frascos dos tratamentos com bactéria foram inoculados com 20 µL da suspensão da bactéria ajustada na DO 0,25. A suspensão bacteriana foi inoculada sobre o micélio do fungo para promover a interação fungo-bactéria. Depois da inoculação com as bactérias, os frascos foram vedados com tampas de silicone e incubados a e incubados a 28 °C.

Separadamente, foram inoculados frascos somente com *P. putida* UW4 *acdS*⁺ ou *P. putida* UW4 *acdS*⁻ para ter um controle da produção de etileno das bactérias sem a presença do fungo. Os valores obtidos foram descontados nos cálculos da produção total de etileno de *P. ostreatus*. Finalmente, para a determinação da biomassa do fungo de cada tratamento, foram inoculados 5 frascos adicionais por cada hora de leitura. As amostras foram filtradas usando filtração a vácuo e a biomassa fúngica foi seca em estufa a 65 °C até peso constante. Os dados gerados foram processados para obter a produção de etileno do fungo por unidade de biomassa/hora.

5.2.3 Estimativas de produção de etileno de *Pleurotus ostreatus*

O cultivo dos microrganismos foi realizado no Laboratório de Química, Bioquímica e Biologia Molecular de Alimentos, no Departamento de Alimentos e Nutrição experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (USP). As medições de etileno foram realizadas no Food Research Center (FoRC) em espaço disponibilizado pelo departamento de Engenharia Química da Escola Politécnica da USP.

A emissão de etileno do fungo foi estimada retirando dos frascos de penicilina uma amostra alíquota de 1 ml de ar proveniente do *headspace* (espaço livre) de cada frasco com auxílio de uma seringa. As amostras de ar contidas na seringa foram injetadas em um cromatógrafo a gás GC-6890 (Hewlett-Packard, CA, EUA) acoplado a um detector por ionização de chama (FID). A coluna utilizada foi a HP-Plot Q (30 m x 0,53 mm).

Foram estabelecidas as seguintes condições cromatográficas para as corridas de etileno: injeção de 1 mL de amostra empregando o modo de injeção *pulsed splitless*; pressão de 20 psi por

2 min; fluxo de ventilação de 20 mL min⁻¹ após 30 segundos de injeção e temperatura do injetor em 200 °C; corrida isotérmica a 30 °C empregando hélio como gás carregador em fluxo constante de 1 mL min⁻¹; temperatura do detector em 250 °C, fluxo de ar e hidrogênio no detector em 450 mL min⁻¹ e 50 mL min⁻¹, respectivamente. A estimativa da quantidade de etileno produzida pelo fungo foi feita em relação à injeção de um padrão de 0,1 µL de etileno L⁻¹ em ar sintético.

As corridas cromatográficas para estimar a produção de etileno de *P. ostreatus* sem bactéria iniciaram 24 h depois da inoculação do fungo nos frascos até a hora 60 de crescimento que foi a leitura onde o etileno produzido pelo fungo foi detectado pelo equipamento. Esta condição foi estabelecida com a finalidade de obter a concentração inicial de etileno produzida pelo fungo sem a presença de bactérias. Depois do fungo ter completado 60 h de crescimento, os frascos foram inoculados com as suspensões das bactérias como descrito em 5.2.2.1 e incubados novamente. Depois de ter completado 24 h após a inoculação das bactérias (84 h de crescimento em total), as corridas cromatográficas continuaram a cada 24 h até completar 156 h de incubação. Portanto, a hora 60 pode ser considerada como o tempo zero (0).

Para realizar uma comparação apropriada da produção de etileno entre os tratamentos avliados, os dados gerados da produção bruta de etileno (nL/g/h) de cada hora de leitura foram normalizados em relação a concentração inicial de etileno de cada tratamento. Desta forma foi possível analisar a proporção de etileno (%) produzida por cada tratamento ao longo do tempo, $\varepsilon(t)$, em relação a concentração inicial de cada tratamento, como apresentado na equação (1):

$$\varepsilon(t) = \left[\frac{E(t)}{E(t_i)} - 1 \right] * 100, \quad (1)$$

onde t_i representa o tempo inicial no qual o etileno bruto mensurado é $E(t_i)$. E $E(t)$ é calculado como a média da produção bruta de etileno de todas as N replicatas por tratamento:

$$E(t) = \frac{\sum_{j=1}^N E_j(t)}{N}. \quad (2)$$

Sendo que E_j representa a produção bruta de etileno da replicata j .

Para comparar o etileno acumulado entre os tratamentos, os dados foram analisados usando a análise de variância (ANOVA) separadamente para cada hora de leitura.

O teste de comparação múltipla utilizado foi o de Tukey ao nível de significância de 5%.

5.2.4 Influência do ácido 1-carboxílico-1-aminociclopropano (ACC) na produção de etileno de *Pleurotus ostreatus*

Com o objetivo de verificar se a via de biossíntese de etileno em *P. ostreatus* é dependente do ACC, o fungo foi inoculado com ACC no meio de cultura. Para isso, 1 disco de micélio do fungo foi inoculado em frascos de vidro de 25 mL contendo 10 mL de caldo extrato de malte. Foram definidos 2 tratamentos: tratamento PL (controle) em que somente o fungo foi inoculado, e tratamento PL+ACC em que o fungo foi inoculado com adição de 100 µL (5 mM) de ACC (CHEN *et al.*, 2013). O experimento foi realizado com 5 repetições para cada tratamento. Depois da inoculação os frascos foram vedados com tampa de silicone e incubados a 25 °C durante 60 h antes de realizar as estimativas da produção de etileno. Adicionalmente foram inoculados frascos para a determinação da biomassa correspondente a cada hora de leitura usando filtração a vácuo. Os dados gerados foram usados para obter a produção de etileno do fungo por unidade de biomassa/hora. Os dados foram analisados usando a ANOVA e teste de comparação múltipla de Tukey ao nível de significância de 5%.

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

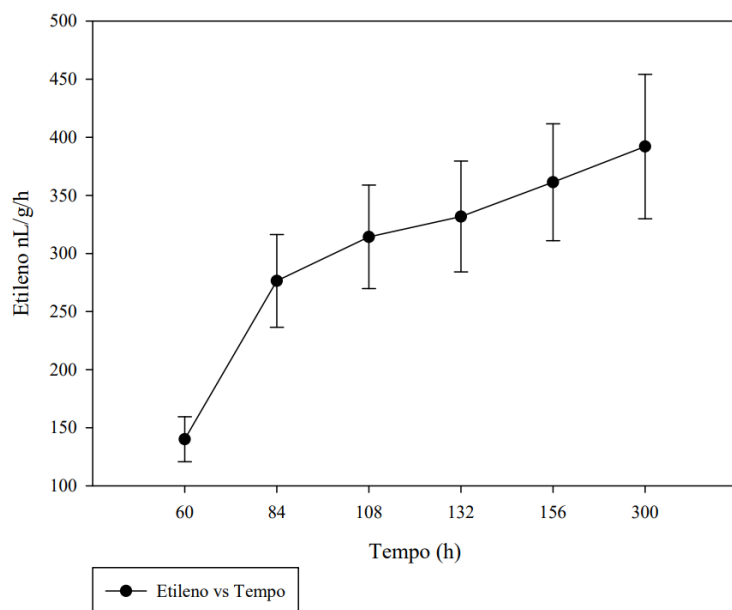
5.3.1 Perfil temporal de produção de Etileno de *Pleurotus ostreatus*

A Fig. 5.4 ilustra a produção acumulada de *P. ostreatus* ao longo de 300 h de crescimento, tempo que, em testes preliminares, foi observado como viável para o crescimento do fungo no sistema de cultivo escolhido.

É possível observar também que a produção de etileno somente aparece depois de 60 h de crescimento do fungo. Em testes prévios foi observado que o etileno produzido pelo fungo somente era detectado pelo equipamento depois de 60 h de incubação. Depois desse tempo o etileno produzido foi de 140 nL/g/h. Como não existem relatos na literatura sobre valores de etileno produzido por fungos basidiomicetos, não foi possível realizar uma comparação entre os dados aqui obtidos com dados disponíveis na literatura. Os valores da produção bruta de etileno, não

acumulados (apresentados na Tabela 5.1), mostram que a maior produção de etileno ficou concentrada entre a hora 60 e 84 de crescimento do fungo, com uma produção de aproximadamente 77% da produção total de etileno.

Figura 5.4 – Perfil da produção acumulada de etileno de *Pleurotus ostreatus* ao longo do tempo.



Fonte: o autor (2020)

Depois de 84 horas a produção de etileno diminuiu consideravelmente. A maior produção de etileno nas primeiras horas de leitura pode ser atribuída provavelmente a uma maior atividade metabólica do fungo nesse estágio de desenvolvimento. Esta tendência foi observada num estudo *in vitro* com *B. cinerea* em que a maior produção de etileno foi obtida durante o período em que o crescimento do fungo era mais ativo (CRISTESCU, 2002). De acordo com os valores da tabela 5.1, o aumento na produção de etileno não é diretamente proporcional ao aumento da biomassa.

Porém, o pico de etileno nas primeiras horas (60 h e 84 h) pode ter estimulado o crescimento micelial nas horas seguintes (108 h e 132 h) causando, por conseguinte, uma diminuição na quantidade de etileno produzida. É possível notar que após a hora 132, a produção de etileno e a biomassa não apresentaram um aumento considerável quando comparados com a leitura anterior, podendo indicar um declínio no metabolismo fúngico.

Tabela 5.1 – Produção bruta de etileno de *Pleurotus ostreatus*.

t [h]	$\bar{E}(t)$ [nL/g/h]	$\bar{\varepsilon}(t)$ (%)	\bar{W} [g]
60	140,09	38,76	0,034
84	136,32	37,72	0,079
108	37,94	10,49	0,174
132	17,54	4,85	0,325
156	29,50	8,16	0,372
Total acumulado	361,39	100%	N.A.

t [h]: tempo; $\bar{E}(t)$: valor médio de etileno bruto; $\bar{\varepsilon}(t)$: valor médio da proporção de etileno; \bar{W} : valor médio de biomassa fúngica acumulada por frasco; N.A.: não se aplica

Fonte: o autor (2020)

5.3.2 Efeito da inoculação de bactérias com atividade *acdS* no perfil de produção de etileno de *Pleurotus ostreatus*

Apesar de todos os frascos terem sido inoculados sob as mesmas condições, a concentração inicial de etileno presente, previamente à inoculação das bactérias, foi diferente entre os tratamentos como mostra a tabela 5.2.

Tabela 5.2 – Concentração inicial de etileno de *Pleurotus ostreatus* antes da inoculação de *Pseudomonas putida* UW4 *acdS*⁺ e UW4 *acdS*⁻.

Tratamento	$\bar{E}(t_i)$ [nL/g/h] ¹
Controle	140,09±43,33
PL+UW4 <i>acdS</i> ⁻	35,51±16,70
PL+UW4 <i>acdS</i> ⁺	70,42±56,19

¹ $\bar{E}(t_i)$: valor médio da concentração inicial de etileno. Controle: *Pleurotus ostreatus* sem bactéria; PL+UW4*acdS*⁺: *Pleurotus ostreatus* co-inoculado com *Pseudomonas putida* UW4 *acdS*⁺; PL+UW4*acdS*⁻: *Pleurotus ostreatus* co-inoculado com *Pseudomonas putida* UW4 *acdS*⁻

Fonte: o autor (2020)

A tabela 5.3 mostra os resultados da análise de Tukey do etileno acumulado por hora em cada tratamento após a normalização dos dados. Como é possível observar, no painel A, na hora 84, o tratamento controle foi o que acumulou mais etileno (97%), seguido pelo tratamento PL+UW4*acdS*⁻ (74%), sendo o tratamento PL+UW4*acdS*⁺ o que menos acumulou etileno (42%).

Essa tendência se manteve ao longo das horas de leitura (painel B e C), exceto na hora 156 (painel D) em que o tratamento PL+UW4*acdS*⁻ foi o que mais acumulou etileno em comparação com os demais tratamentos. Para aquela condição (hora 156), o menor acúmulo de etileno foi observado para o tratamento PL+UW4*acdS*⁺, seguido pelo tratamento PL+UW4*acdS*⁻, este último muito similar ao tratamento controle (Fig. 5.5). O teste de Tukey não detectou diferença estatística, entre os tratamentos nas horas de leitura avaliadas (Tabela 5.3) devido a alta variabilidade dos dados (Fig. 5.5).

Tabela 5.3 – Análise da proporção de etileno acumulado ao longo do tempo. A: Análise de Tukey da hora 84; B: Análise de Tukey da hora 108; C: Análise de Tukey da hora 132; D: Análise de Tukey da hora 156.

Hora 84		Hora 108	
Tratamento	Proporção de etileno acumulado ($\bar{\epsilon}$)*	Tratamento	Proporção de etileno Acumulado ($\bar{\epsilon}$)*
Controle	97a	Controle	124a
PL+UW4 <i>acdS</i> ⁻	74a	PL+UW4 <i>acdS</i> ⁻	109a
PL+UW4 <i>acdS</i> ⁺	42a	PL+UW4 <i>acdS</i> ⁺	56a
A		B	
Hora 132		Hora 156	
Tratamento	Proporção de etileno Acumulado ($\bar{\epsilon}$)*	Tratamento	Proporção de etileno Acumulado ($\bar{\epsilon}$)*
Controle	137a	Controle	158a
PL+UW4 <i>acdS</i> ⁻	135a	PL+UW4 <i>acdS</i> ⁻	163a
PL+UW4 <i>acdS</i> ⁺	68a	PL+UW4 <i>acdS</i> ⁺	90a
C		D	

*Médias seguidas por uma mesma letra na mesma coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). $\bar{\epsilon}$: valor médio da proporção de etileno acumulado

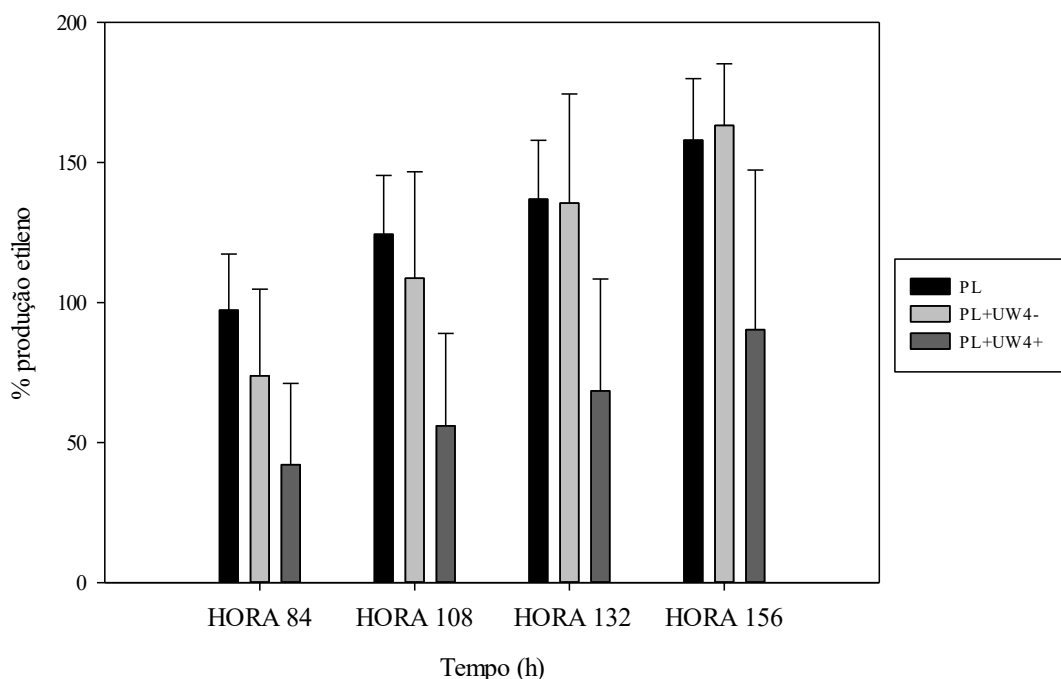
Fonte: o autor (2020)

A variabilidade é típica de sistemas dinâmicos complexos como o da interação fungo-bactéria. Neste caso, não foi possível isolar todas as variáveis envolvidas nessa interação e suas

implicações na produção/redução do etileno. No entanto, o tratamento PL+UW4*acdS*⁺, que contém a bactéria com o gene *acdS*, merece destaque já que em comparação com o tratamento PL+UW4*acdS*⁻ foi o que menos etileno acumulou em todas as horas de leitura (uma redução de aproximadamente 40%).

Na Fig. 5.5 é possível observar que o etileno acumulado pelo tratamento PL+UW4*acdS*⁻ é similar ao tratamento controle em todas as horas de leitura, o que poderia ser explicado pela ausência do gene *acdS* nesse tratamento.

Figura 5.5 – Proporção de etileno acumulado de *Pleurotus ostreatus* ao longo do tempo associado a bactérias com atividade *acdS*. PL: *Pleurotus ostreatus*; PL+UW4⁻: *Pleurotus ostreatus* co-inoculado com *Pseudomonas putida acdS*⁻; PL+UW4⁺: *Pleurotus ostreatus* co-inoculado com *Pseudomonas putida acdS*⁺.



Fonte: o autor (2020)

Esses resultados mostram que o gene *acdS* presente na bactéria UW4*acdS*⁺ teve um efeito positivo na diminuição da proporção de etileno produzido pelo fungo, sugerindo assim que *P. ostreatus* produz etileno via ACC.

Na tabela 5.4 é apresentada a redução da proporção de etileno (R_E) do tratamento contendo a bactéria selvagem em comparação com o tratamento contendo a bactéria mutante, calculada como:

$$R_E = 100 - \frac{\varepsilon^+}{\varepsilon^-} * 100, \quad (3)$$

onde ε^- e ε^+ representam a proporção de etileno acumulado pelos tratamentos contendo a bactéria mutante (PL+UW4*acdS*⁻) e a bactéria selvagem (PL+UW4*acdS*⁺), respectivamente.

Tabela 5.4 – Proporção de redução do etileno de *Pleurotus ostreatus* associado a *Pseudomonas putida* com atividade *acdS*.

$t[h]^1$	$\bar{\varepsilon}^- [\%]^1$	$\bar{\varepsilon}^+ [\%]^1$	$\bar{R}_E [\%]^1$
84	74	42	43
108	109	56	48
132	135	68	49
156	163	90	45

¹ $t[h]$: tempo; $\bar{\varepsilon}^-$: valor médio da porcentagem de etileno acumulado do tratamento PL+UW4*acdS*⁻; $\bar{\varepsilon}^+$: valor médio da proporção de etileno acumulado do tratamento PL+UW4*acdS*⁺ \bar{R}_E : valor médio da proporção de redução de etileno do tratamento PL+UW4 *acdS*⁺.

Fonte: o autor (2020)

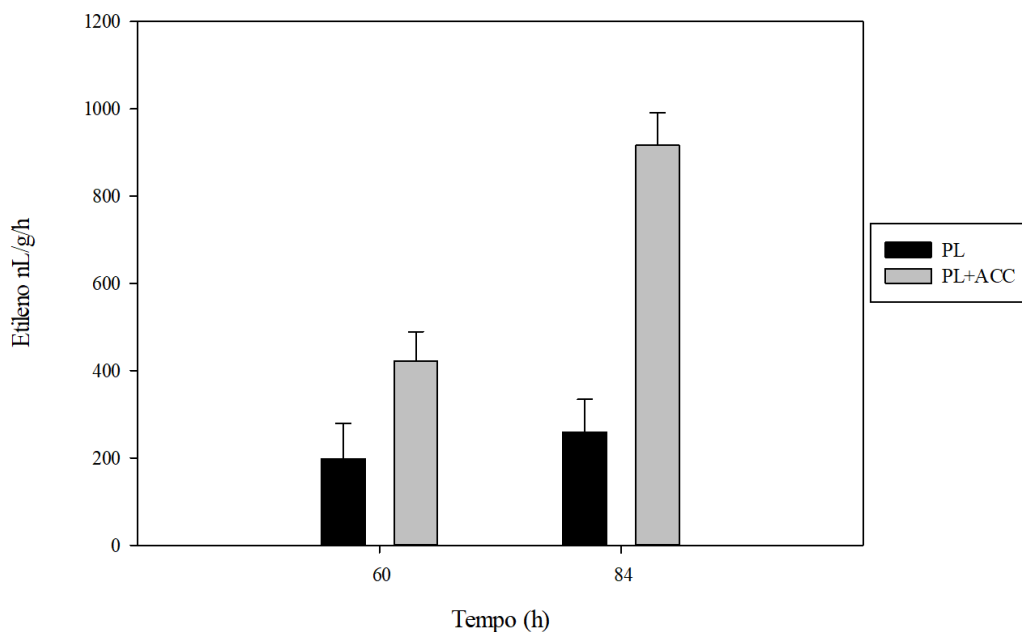
5.3.3 Via de biossíntese de etileno em *Pleurotus ostreatus*

As estimativas da produção de etileno do fungo inoculado com ACC no meio de cultura não puderam ser realizadas em todos os tempos de leitura programados (5 leituras em intervalos de 24 h) devido a um problema técnico do equipamento. Por esse motivo, somente puderam ser realizadas 2 estimativas correspondente a hora 60 e hora 84. Como é possível observar na Fig. 5.6 a produção de etileno foi maior no tratamento PL+ACC que no tratamento controle nos dois tempos de leitura avaliados.

Esses resultados sugerem que a produção de etileno em *P. ostreatus* é estimulada pelo ACC, indicando que a via de biossíntese de etileno no fungo poderia ser dependente de ACC, como acontece com *A. bisporus* (CHEN *et al.*, 2013). Porém, dado que as leituras não puderam ser realizadas em todos os tempos programados, não é possível afirmar esta hipótese. Contudo,

considerando que até hoje a via de produção de etileno em *P. ostreatus* não foi descrita, este resultado preliminar somado aos efeitos positivos observados no co-cultivo com bactérias com atividade ACCD, são um ponto de partida importante para dilucidar a via de biossíntese do etileno neste fungo.

Figura 5. 6 – Produção de etileno acumulado por *Pleurotus ostreatus* inoculado com ACC. PL: *Pleurotus ostreatus*; PL+ACC: *Pleurotus ostreatus* inoculado com ACC.



Fonte: o autor (2020)

5.4 CONCLUSÕES

Este estudo relata, de forma inédita, a produção de etileno *in vitro* a partir de *P. ostreatus*. Os resultados mostram o perfil de produção de etileno do fungo ao longo do tempo e como os níveis de etileno mudam quando o fungo é co-inoculado com bactérias contendo ou não o gene *acdS*.

A bactéria com atividade ACCD se mostrou eficiente na redução dos níveis de etileno produzidos pelo fungo. Em contrapartida, a bactéria mutante mostrou um efeito similar ao tratamento controle, em que os níveis de etileno permaneceram elevados. Esse resultado sugere que a redução dos níveis de etileno produzido pelo fungo é devida ao gene *acdS* presente na bactéria *P. putida* UW4 *acdS*⁺.

A presença do ACC no meio de cultura estimulou a produção de etileno *in vitro* em *P. ostreatus* indicando que, provavelmente, a via metabólica de produção de etileno no fungo utiliza ACC como substrato. Porém, para afirmar que a via de biossíntese de etileno no fungo é dependente de ACC é necessário realizar experimentos adicionais. Neste sentido, o cultivo do fungo com compostos inibidores das enzimas envolvidas na síntese de ACC como o ácido amino-oxiacético (AOA) que é inibidor da ACS e o cloreto de cobalto (CoCl_2) que é inibidor da ACO poderiam por exemplo, elucidar se as enzimas envolvidas na síntese de ACC se encontram presentes no fungo.

De forma geral, os resultados obtidos mostram que bactérias com atividade ACCD possuem potencial biotecnológico para melhorar o crescimento fúngico de cogumelos comestíveis e reduzir os níveis de etileno produzidos pelos fungos.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, D. O. *et al.* Ethylene biosynthesis: identification of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid as an intermediate in the conversion of methionine to ethylene. **Proceedings of The National Academy of Sciences**, [S.L.], v. 76, n. 1, p. 170-174, 1 jan. 1979. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.76.1.170>.
- ARSHAD, Muhammad *et al.* **Ethylene: agricultural sources and applications**. Estados Unidos: Springer Science & Business Media, 2012. 342 p.
- BRADFORD, Kent J.. Shang Fa Yang: pioneer in plant ethylene biochemistry. **Plant Science**, [S.L.], v. 175, n. 1-2, p. 2-7, jul. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plantsci.2008.01.005>.
- CAGLARIRMAK, N. The nutrients of exotic mushrooms (*Lentinula edodes* and *Pleurotus* species) and an estimated approach to the volatile compounds. **Food Chemistry**, [S.L.], v. 105, n. 3, p. 1188-1194, 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.02.021>.
- CHALUTZ, E. *et al.* Fermentative production of ethylene by *Penicillium digitatum* from citrus fruit peel. **European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, [S.L.], v. 18, n. 5, p. 293-297, 1983. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/bf00500494>.
- CHEN, Shichang *et al.* Effect of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase producing bacteria on the hyphal growth and primordium initiation of *Agaricus bisporus*. **Fungal Ecology**, [S.L.], v. 6, n. 1, p. 110-118, fev. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.funeco.2012.08.003>.
- CHO, Yong-Sup *et al.* Growth promotion of the edible fungus *Pleurotus ostreatus* by *fluorescent pseudomonads*. **Fems Microbiology Letters**, [S.L.], v. 218, n. 2, p. 271-276, jan. 2003. Oxford University Press (OUP). [http://dx.doi.org/10.1016/s0378-1097\(02\)01144-8](http://dx.doi.org/10.1016/s0378-1097(02)01144-8).
- CHO, Young Sub *et al.* Effect of Casing Layer on Growth Promotion of the Edible Mushroom *Pleurotus ostreatus*. **Mycobiology**, [S.L.], v. 36, n. 1, p. 40-44, 2008. Mycobiology (KAMJE). <http://dx.doi.org/10.4489/myco.2008.36.1.040>.
- CRISTESCU, Simona M. *et al.* Ethylene Production by *Botrytis cinerea* In Vitro and in Tomatoes. **Applied and Environmental Microbiology**, [S.L.], v. 68, n. 11, p. 5342-5350, nov. 2002. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.68.11.5342-5350.2002>.
- FRIES, Nils *et al.* Effects of volatile organic compounds on the growth and development of fungi. **Transactions of the British Mycological Society**, [S.L.], v. 60, n. 1, p. 1-21, fev. 1973. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0007-1536\(73\)80055-5](http://dx.doi.org/10.1016/s0007-1536(73)80055-5).
- GLICK, Bernard R. *et al.* 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase mutants of the plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2 do not stimulate canola root elongation. **Canadian Journal of Microbiology**, [S.L.], v. 40, n. 11, p. 911-915, 1 nov. 1994. Canadian Science Publishing. <http://dx.doi.org/10.1139/m94-146>.

GLICK, Bernard R. *et al.* A Model For the Lowering of Plant Ethylene Concentrations by Plant Growth-promoting Bacteria. **Journal of Theoretical Biology**, [S.L.], v. 190, n. 1, p. 63-68, jan. 1998. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1006/jtbi.1997.0532>.

GLICK, Bernard R. *et al.* Promotion of Plant Growth by Bacterial ACC Deaminase. **Critical Reviews in Plant Sciences**, [S.L.], v. 26, n. 5-6, p. 227-242, 23 out. 2007. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/07352680701572966>.

GRAHAM, J. H. *et al.* Ethylene production by ectomycorrhizal fungi, *Fusarium oxysporum* f. sp. pini, and by aseptically synthesized ectomycorrhizae and Fusarium-infected Douglas-fir roots. **Canadian Journal of Microbiology**, [S.L.], v. 26, n. 11, p. 1340-1347, 1 nov. 1980. Canadian Science Publishing. <http://dx.doi.org/10.1139/m80-222>

HONTZEAS, N. *et al.* Evidence for Horizontal Transfer of 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate Deaminase Genes. **Applied and Environmental Microbiology**, [S.L.], v. 71, n. 11, p. 7556-7558, nov. 2005. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.71.11.7556-7558.2005>.

INCE, J. E. *et al.* Ethylene formation by cell-free extracts of *Escherichia coli*. **Archives of Microbiology**, [S.L.], v. 146, n. 2, p. 151-158, nov. 1986. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/bf00402343>.

ILAG, L. *et al.* Production of Ethylene by Fungi. **Science**, [S.L.], v. 159, n. 3821, p. 1357-1358, 22 mar. 1968. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.159.3821.1357>.

JIA, Yan-Jun *et al.* Synthesis and Degradation of 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic Acid by *Penicillium citrinum*. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, [S.L.], v. 63, n. 3, p. 542-549, jan. 1999. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1271/bbb.63.542>.

KAKUTA, Yukiko *et al.* 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate Synthase of *Penicillium citrinum*: primary structure and expression in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, [S.L.], v. 65, n. 7, p. 1511-1518, jan. 2001. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1271/bbb.65.1511>

KHAN, Naffes *et al.* (ed.). **Ethylene Action in Plants**. Estados Unidos: Springer Berlin Heidelberg, 2006. 206 p.

KIM, Min Keun *et al.* Effect of *Pseudomonas* sp. P7014 on the growth of edible mushroom *Pleurotus eryngii* in bottle culture for commercial production. **Bioresource Technology**, [S.L.], v. 99, n. 8, p. 3306-3308, maio 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2007.06.039>.

NASCIMENTO, Francisco X. *et al.* New Insights into 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate (ACC) Deaminase Phylogeny, Evolution and Ecological Significance. **Plos One**, [S.L.], v. 9, n. 6, p. 99168-99184, 6 jun. 2014. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0099168>.

LIANG, X. *et al.* The 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene family of *Arabidopsis thaliana*. **Proceedings of The National Academy Of Sciences**, [S.L.], v. 89, n. 22, p. 11046-11050, 15 nov. 1992. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.89.22.11046>.

MANZANO, Susana *et al.* Involvement of ethylene in sex expression and female flower development in watermelon (*Citrullus lanatus*). **Plant Physiology and Biochemistry**, [S.L.], v. 85, p. 96-104, dez. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.11.004>.

MINAMI, R. *et al.* Properties, Sequence, and Synthesis in *Escherichia coli* of 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate Deaminase from *Hansenula saturnus*. **Journal of Biochemistry**, [S.L.], v. 123, n. 6, p. 1112-1118, 1 jun. 1998. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a022050>.

UCHIUMI, Toshiki *et al.* Expression Islands Clustered on the Symbiosis Island of the *Mesorhizobium loti* Genome. **Journal of Bacteriology**, [S.L.], v. 186, n. 8, p. 2439-2448, 15 abr. 2004. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jb.186.8.2439-2448.2004>.

SHEEHY, R e *et al.* Isolation, sequence, and expression in *Escherichia coli* of the *Pseudomonas* sp. strain ACP gene encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase. **Journal of Bacteriology**, [S.L.], v. 173, n. 17, p. 5260-5265, 1991. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jb.173.17.5260-5265.1991>.

SIMON, Anaele *et al.* Exploiting the fungal highway: development of a novel tool for the in situ isolation of bacteria migrating along fungal mycelium. **Fems Microbiology Ecology**, [S.L.], v. 91, n. 11, p. 116-129, 1 out. 2015. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/femsec/fiv116>.

SMITH, A M *et al.* Ethylene in Soil Biology. **Annual Review of Phytopathology**, [S.L.], v. 14, n. 1, p. 53-73, set. 1976. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.py.14.090176.000413>.

SUN, Yili *et al.* The presence of a 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase deletion mutation alters the physiology of the endophytic plant growth-promoting bacterium *Burkholderia phytofirmans* PsJN. **Fems Microbiology Letters**, [S.L.], v. 296, n. 1, p. 131-136, jul. 2009. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01625.x>.

TAIZ, Lincoln. **Fisiologia vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 719 p.

UCHIUMI, Toshiki *et al.* Expression Islands Clustered on the Symbiosis Island of the *Mesorhizobium loti* Genome. **Journal of Bacteriology**, [S.L.], v. 186, n. 8, p. 2439-2448, 15 abr. 2004. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jb.186.8.2439-2448.2004>.

VITERBO, Ada *et al.* Characterization of ACC deaminase from the biocontrol and plant growth-promoting agent *Trichoderma asperellum* T203. **Fems Microbiology Letters**, [S.L.], v. 305, n. 1, p. 42-48, 4 mar. 2010. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.2010.01910.x>.

TURNER, E. M. *et al.* Production of Ethylene and Other Volatiles and Changes in Cellulase and Laccase Activities during the Life Cycle of the Cultivated Mushroom, *Agaricus bisporus*. **Journal**

of General Microbiology, [S.L.], v. 91, n. 1, p. 167-176, 1 nov. 1975. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/00221287-91-1-167>.

WOOD, D. A. *et al.* Ethylene Production by Axenic Fruiting Cultures of *Agaricus bisporus*. **Applied and Environmental Microbiology**, [S.L.], v. 34, n. 2, p. 228-229, 1977. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.34.2.228-229.1977>.

YU, Yeong-Biau *et al.* 1-Aminocyclopropanecarboxylate synthase, a key enzyme in ethylene biosynthesis. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, [S.L.], v. 198, n. 1, p. 280-286, nov. 1979. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0003-9861\(79\)90420-x](http://dx.doi.org/10.1016/0003-9861(79)90420-x).

6 CAPÍTULO II

Efeito de bactérias com atividade ACC deaminase (ACCD) na frutificação do cogumelo comestível *Pleurotus ostreatus* cultivado em condições de laboratório

RESUMO

A sinergia entre organismos tem um papel importante na ecologia do solo e no ciclo do carbono. Em fungos, a associação com bactérias produtoras da enzima ACC deaminase (ACCD) é crucial para seu desenvolvimento e frutificação. Por meio desta associação, as bactérias conseguem reduzir o excesso de etileno produzido pelos fungos, quebrando o precursor direto do etileno, o ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) através da enzima ACC deaminase. Assim, as bactérias conseguem regular os níveis de etileno no fungo, diminuindo possíveis efeitos adversos para seu crescimento. Usando este princípio, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de bactérias contendo o gene *acdS* na frutificação e conteúdo proteico de *Pleurotus ostreatus* cultivado em condições de laboratório. Para isso, foi desenvolvido um inoculante alternativo ao inoculante tradicional usando alginato de sódio, que serviu como veículo para encapsular a biomassa fúngica e as bactérias de interesse. Foram empregadas duas bactérias com atividade ACCD: *Pseudomonas fluorescens* YsS6 *acdS*⁺ e *Pseudomonas putida* UW4 *acdS*⁺ com suas respectivas mutantes (sem o gene *acdS*). Quando o fungo foi inoculado com a cepa *P. putida* UW4 *acdS*⁺, o rendimento foi de 151,88 g/kg, enquanto que com a bactéria mutante o rendimento foi de 113,93 k/kg, representando um aumento no rendimento de 33,31%. Pelo contrário, quando o fungo foi inoculado com a bactéria *P. fluorescens* YsS6 *acdS*⁺, o rendimento obtido não foi diferente da bactéria mutante nem do tratamento controle. A co-inoculação com *P. putida* UW4 *acdS*⁺ aumentou a produtividade de *P. ostreatus*, produzindo cogumelos 15 dias mais cedo que o tratamento controle. Da mesma forma, o conteúdo de proteína do cogumelo, quando associado a *P. putida*, foi maior (18,81%) em comparação com o controle (13,07%). Esses resultados mostram que o inoculante à base de alginato facilita o encapsulamento de distintas associações fungo-bactéria, permitindo avaliar o efeito de bactérias na frutificação dos fungos. O uso de bactérias com atividade ACCD mostra ser uma estratégia promissória para melhorar o rendimento da atividade de produção de cogumelos comestíveis.

Palavras chave: Associação fungo-bactéria. Etileno. ACC deaminase. Ácido ACC. Co-cultivo. Gene *acdS*. Cogumelos comestíveis. *Pseudomonas putida*. *Pleurotus ostreatus*.

6.1 INTRODUÇÃO

As bactérias promotoras do crescimento vegetal (PGPB) cumprem um papel fundamental na estimulação do crescimento de plantas, já que além de promover seu desenvolvimento, aumentam a resistência ao ataque de pragas e condições ambientais adversas (YOUNG *et al.*, 2012). Seus benefícios têm sido amplamente descritos na literatura, mostrando efeitos estimulantes em plantas através de diversos mecanismos. Um deles é a diminuição dos níveis de etileno produzido pelas plantas quando submetidas a condições de estresse. As bactérias capazes de reduzir os níveis de etileno são produtoras de uma enzima chamada ACC deaminase (ACCD) que é codificada pelo gene *acdS* (GLICK *et al.*, 1998).

O gene *acdS* tem sido identificado e caracterizado em vários microrganismos, majoritariamente bactérias e fungos (SHEENY *et al.*, 1991; MINAMI *et al.*, 1998; JIA *et al.*, 1999; HONZEATS *et al.*, 2005). A presença da ACCD é fundamental no funcionamento de muitas bactérias e fungos promotores do crescimento vegetal. Quando o gene *acdS* foi deletado de cepas de *Pseudomonas putida* GR12-2 e *Pseudomonas* sp. UW4, estas perderam a habilidade para promover o alongamento de raízes de plantas de canola (GLICK *et al.*, 1994). A eficiência simbiótica das bactérias fixadoras de nitrogênio como *Rhizobium leguminosarum* e *Mesorhizobium loti* MAFF303099, diminuiu após a deleção do gene *acdS* (UCHIUMI *et al.*, 2004). Da mesma forma, as bactérias endofíticas promotoras de crescimento *Burkholderia phytophirmans* PsJN, *Pseudomonas fluorescens* YsS6 e *Pseudomonas migulae* 8R6 se tornaram menos efetivas com a deleção do gene *acdS* (SUN *et al.*, 2009). No fungo *Trichoderma asperellum* T203, a deleção do gene também afetou suas habilidades para promover o crescimento de plantas (VITERBO *et al.*, 2010). Desta forma, as evidências apresentadas por esses estudos reforçam a utilização de bactérias produtoras de ACCD como uma ferramenta importante na proteção de plantas sob condições de estresse, resultando assim numa maior tolerância frente a esses fatores (GLICK *et al.*, 2007).

Por meio da ACCD, as bactérias presentes no solo conseguem clivar o precursor imediato do etileno produzido pelas plantas, o ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC). Desta forma, sem o ACC disponível a síntese do etileno é interrompida e os níveis de etileno na planta são reduzidos, evitando os efeitos fisiológicos derivados do aumento do etileno (GLICK, 2005).

A bactéria *P. putida*, considerada uma PGPB, contém também o gene *acdS*. Além de ter sido usada em plantas, seu uso tem sido relatado no cultivo de fungos como *Agaricus bisporus*, reduzindo a quantidade de etileno produzido pelo fungo e melhorando seu desenvolvimento

(CHEN *et al.*, 2013). Esses estudos evidenciam a importância da sinergia existente entre fungos e bactérias e abrem a possibilidade de estudar o efeito destas bactérias também em outros cogumelos comestíveis de importância econômica para o país, como é o caso de *Pleurotus ostreatus*.

Um dos mecanismos envolvidos na interação entre fungos e bactérias é a aderência de bactérias no micélio dos fungos. Tal mecanismo tem tido observado por meio de técnicas de microscopia eletrônica, e acredita-se que esta aderência é fundamental para que a interação entre esses microrganismos aconteça (FREY-KLETT *et al.*, 2011; SIMON *et al.*, 2012).

Considerando as evidências dos estudos que mostram os efeitos benéficos de bactérias em fungos e as possíveis aplicações biotecnológicas que a associação fungo-bactéria tem, este capítulo propõe os seguintes objetivos:

1. Avaliar o potencial biotecnológico de um inoculante (à base de alginato de sódio) contendo o consórcio fungo-bactéria;
2. Quantificar a produção de cogumelos de *P. ostreatus* inoculado *in vitro* conjuntamente com bactérias com atividade ACCD em substrato comercial;
3. Comprovar se bactérias contendo o gene *acdS* promovem a frutificação de *P. ostreatus* em condições de laboratório;
4. Verificar se o método e tempos de co-inoculação no substrato afetam o rendimento de *P. ostreatus in vitro*;
5. Avaliar se a co-inoculação de *P. ostreatus* com *P. putida* aumenta a quantidade de proteína do fungo.

6.2. MATERIAIS E MÉTODOS

6.2.1 Cepas

A cepa *P. ostreatus* FB-PL224 usada neste estudo foi fornecida pela empresa *Fungi Brasilis & Vegetais Verdes* e foi mantida no laboratório em meio BDA (batata-dextrose-ágar) a 25 °C até o momento das análises. As cepas *P. putida* UW4 *acdS*⁺, *P. putida* UW4 *acdS*⁻, *P. fluorescens* YsS6 *acdS*⁺ e *P. fluorescens* YsS6 *acdS*⁻ foram fornecidas pelo Dr. B. R. Glick da Universidade de Waterloo (Canadá), sendo conservadas a -70 °C em caldo Tripticaseína de Soja (TSB) com glicerol. Para as análises, as bactérias foram reativadas em Ágar Tripton de Soja (TSA) e incubadas a 28 °C durante 24-48 h. As cepas mutantes (*acdS*⁻), foram semeadas em TSA

suplementado com tetraciclina para manter a mutação do gene *acdS* (resistente à tetraciclina). Para preparar as suspensões bacterianas, foi usado meio TSB e as bactérias foram incubadas overnight sob agitação constante (150 rpm) a 28 °C.

6.2.2 Desenho experimental

Para avaliar o efeito de bactérias com atividade ACCD na frutificação de *P. ostreatus*, foram realizados dois experimentos em condições de laboratório. Os dois experimentos foram conduzidos de forma similar, porém, mudando algumas condições como resumido na tabela 6.1. No experimento 1, foi verificada a influência da presença/ausência do gene *acdS* na frutificação de *P. ostreatus*. Para isso, foram comparadas duas bactérias com conhecida atividade ACCD (contendo o gene *acdS*): *P. putida* UW4 *acdS*⁺ e *P. fluorescens* YsS6 *acdS*⁺ e suas correspondentes cepas mutantes sem atividade ACCD (sem o gene *acdS*): *P. putida* UW4 *acdS*⁻ e *P. fluorescens* YsS6 *acdS*⁻. Baseado nos resultados do experimento 1, a bactéria *P. putida acdS*⁺ foi selecionada para dar continuidade ao experimento 2, em que o objetivo foi avaliar se diferentes métodos de inoculação do fungo+bactéria influenciam a frutificação do fungo.

Tabela 6. 1 – Resumo das condições experimentais (experimento 1 e 2).

Experimento	Condição							
	Incubação prévia dos microrganismos	Peso do substrato	Tamanho sacos	Abertura Sacos	Esterilização	Inóculo	Controle temperatura	Controle Umidade
Experimento 1	Sim (48 h)	260g	15x25 cm	Algodão e gaze	30min 121 °C	12g caps/saco	Sazonal	Umidificador sem sensor
Experimento 2	Não	600g	20x30 cm	Sem abertura	60min 121 °C	12g caps/saco	Sazonal	Umidificador com sensor

Fonte: o autor (2020)

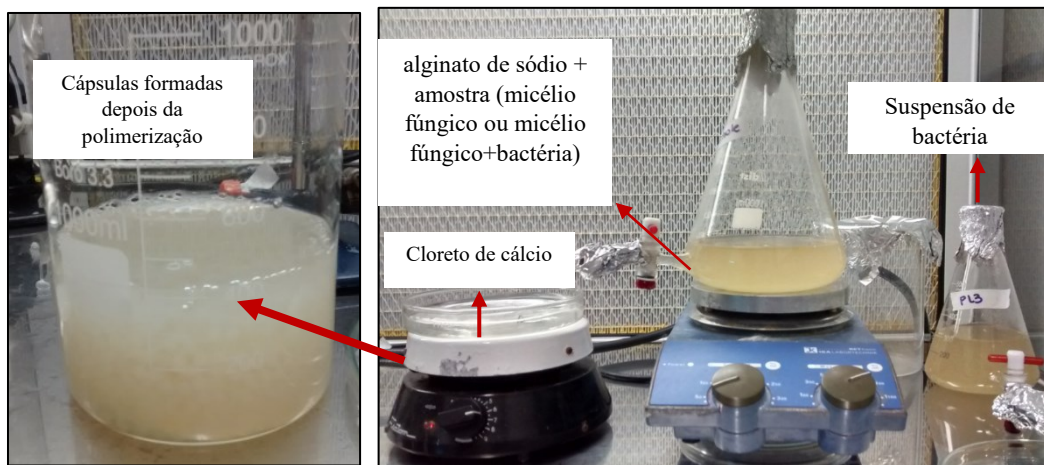
6.2.2.1 Experimento 1

O experimento 1 foi desenhado em delineamento em blocos casualizados com 6 repetições por tratamento. Foram definidos 5 tratamentos: tratamento PL (*P. ostreatus* sem bactéria), tratamento UW4*acdS*⁺ (*P. ostreatus* + *P. putida* UW4 *acdS*⁺), tratamento UW4*acdS*⁻ (*P. ostreatus* + *P. putida* UW4 *acdS*⁻), tratamento YsS6*acdS*⁺ (*P. ostreatus* + *P. fluorescens* YsS6 *acdS*⁺) e tratamento YsS6*acdS*⁻ (*P. ostreatus* + *P. fluorescens* YsS6 *acdS*⁻).

Para avaliar a interação de *P. ostreatus* com diversas bactérias foi empregado um inoculante diferente do tradicional (comumente obtido de grãos de cereais) que facilita a veiculação do micélio fúngico junto com as bactérias em suspensão. Desta forma, foi seguida a metodologia descrita por Rossi (2006) para o encapsulamento de fungos. Para tanto, foram elaboradas cápsulas de alginato de cálcio contendo, de acordo com o tratamento, somente o fungo, ou a combinação fungo-bactéria. Para isso, discos de micélio de 3 semanas de idade de *P. ostreatus* foram inoculados em frascos tipo Erlenmeyer contendo caldo de cultivo Melin-Norkrans Modificado (MNM) composto de glicose, extrato de malte e sais. Os Erlenmeyers inoculados foram incubados a 28 °C por ± 15 dias. Depois desse tempo a biomassa fúngica foi fragmentada em solução salina (0,85%) com o auxílio de um liquidificador industrial por 20 segundos. A biomassa foi ajustada a uma concentração de 1g/L.

Separadamente, as bactérias foram cultivadas overnight a 28 °C em meio caldo TSB e em seguida ajustadas em uma densidade óptica (DO) de 0,5 usando espectrofotômetro BEL PHOTONICS SP 1105. Para a obtenção do inoculante, a suspensão miceliana fragmentada foi previamente incubada junto com as bactérias em suspensão por 48 h antes do encapsulamento com a finalidade de promover a interação fungo-bactéria. Foi adicionado 1 mL de bactéria por cada 100 mL de suspensão miceliana (1%). Depois das 48 h, as misturas de cada tratamento foram transferidas separadamente para frascos gotejadores contendo solução estéril de alginato de sódio (2%; m:v). Cada mistura foi gotejada individualmente em uma solução de CaCl_2 (50g/L), sob agitação constante, até a polimerização total das cápsulas (Fig. 6.1).

Figura 6.2 – Polimerização das cápsulas de alginato de sódio.



Fonte: o autor (2020)

Em seguida as cápsulas foram lavadas em água destilada estéril para retirar o excesso de CaCl_2 e transferidas para um frasco contendo solução salina (0,85% de NaCl). Parte das cápsulas produzidas foram transferidas para placas de Petri contendo meio BDA para verificar a viabilidade do fungo. As cápsulas não utilizadas imediatamente na inoculação foram conservadas a 8 °C para verificar a viabilidade do fungo ao longo do tempo. Sendo assim, foram obtidos 5 inoculantes correspondentes aos 5 tratamentos definidos (Tabela 6.2).

Tabela 6.2 – Combinações fungo-bactéria do experimento 1.

Inoculante	Descrição
PL	<i>Pleurotus ostreatus</i> encapsulado sem bactéria
UW4 <i>acdS</i> ⁺	<i>Pleurotus ostreatus</i> encapsulado juntamente com <i>Pseudomonas putida</i> UW4 <i>acdS</i> ⁺ ¹
UW4 <i>acdS</i> ⁻	<i>Pleurotus ostreatus</i> encapsulado juntamente com <i>Pseudomonas putida</i> UW4 <i>acdS</i> ⁻ ¹
YsS6 <i>acdS</i> ⁺	<i>Pleurotus ostreatus</i> encapsulado juntamente com <i>Pseudomonas fluorescens acdS</i> ⁺ ¹
YsS6 <i>acdS</i> ⁻	<i>Pleurotus ostreatus</i> encapsulado juntamente com <i>Pseudomonas fluorescens acdS</i> ⁻ ¹

¹A suspensão miceliana foi previamente incubada junto com a suspensão de bactéria durante 48 h antes do encapsulamento

Fonte: o autor (2020)

Para avaliar a frutificação do fungo foi utilizado um substrato comercial à base de serragem de eucalipto e grãos fornecido pela empresa *Fungi Brasilis & Vegetais Verdes*. O substrato foi disposto em sacos de polipropileno de 15x25 cm acondicionados com uma abertura de algodão e gaze para permitir a troca gasosa (Fig. 6.2A).

Os sacos foram preenchidos com 260 gramas de substrato/saco e esterilizados por 30 min a 121 °C. Antes da inoculação os sacos foram resfriados à temperatura ambiente. Para dosar as cápsulas obtidas de cada inoculante, estas foram drenadas usando uma peneira estéril e pesadas em câmara de fluxo laminar, sendo então inoculadas 12 g de cápsulas por saco (aproximadamente 211 cápsulas) (Fig. 6.2B).

Figura 6.5 – A: Sacos de polipropileno preenchidos com 260 g de substrato comercial para o cultivo de *Pleurotus ostreatus*. B: Inoculação do substrato com o inoculante de alginato de sódio.



Fonte: o autor (2020)

Essa quantidade de inoculante (aproximadamente 90 μg de biomassa fúngica/cápsula) se mostrou eficiente em testes de viabilidade realizados previamente. As cápsulas foram inoculadas na superfície do substrato. Para verificar a viabilidade das cápsulas, uma amostra foi inoculada em placas de Petri contendo meio BDA incubadas a 28 °C no mesmo dia da inoculação dos sacos. Após a inoculação, os sacos foram dispostos aleatoriamente usando o método de sorteio em prateleiras acondicionadas com um umidificador (Fig. 6.3).

Figura 6.8 – Prateleiras empregadas para o cultivo de *Pleurotus ostreatus*.



Fonte: o autor (2020)

A variável temperatura não foi controlada e foi dependente da sazonalidade do local (julho–setembro 2017). A frutificação dos cogumelos foi monitorada ao longo dos ciclos de produção, acompanhando o aparecimento dos primórdios até o desenvolvimento de basidiomas maduros (com o píleo aberto). O peso fresco dos basidiomas colhidos foi registrado e empregado para avaliar as seguintes variáveis:

- 1 Rendimento:** definido como a produção de cogumelo fresco em gramas em relação ao peso úmido do substrato, dado por:

$$R = \frac{P_f}{P_u}, \quad (1)$$

onde P_f é o peso fresco do cogumelo e P_u é o peso úmido do substrato.

- 2 Eficiência Biológica:** a eficiência biológica se refere à conversão do substrato em basidiomas e é definida como a porcentagem de cogumelo fresco produzido em relação ao substrato em base seca. É calculada como:

$$EB = \frac{P_f}{P_s} * 100, \quad (2)$$

onde P_f é o peso fresco do cogumelo e P_s é o peso seco do substrato.

- 3 Produtividade:** definida como a rapidez da produção de cogumelo dada por:

$$Produtividade(t_i) = \frac{P_{i+1} - P_i}{t_{i+1} - t_i}, \quad (i = 0, 1 \dots), \quad (3)$$

onde P_i representa o peso fresco medido no tempo t_i .

Os dados foram analisados de forma acumulativa, isto é, os pesos diários obtidos para cada replicata foram usados para obter a média de peso por tratamento. Os dados foram analisados utilizando a análise de variância (ANOVA) e comparando as médias pelo teste de Tukey com significância de 5% empregando o software estatístico SigmaPlot versão 12.3.

6.2.2.1.1 Análise de proteína

Parte dos basidiomas colhidos no experimento 1 foi empregada para realizar a análise de proteína. Para isso, foram separadas amostras de basidiomas por cada tratamento avaliado. Para isso, os basidiomas foram desidratados em estufa a aproximadamente 40 °C e depois macerados com auxílio de nitrogênio líquido até se obter um pó fino. A análise de proteína foi realizada no laboratório de Química e Bioquímica de Alimentos da Universidade de São Paulo, seguindo o método Kjeldahl da AACC 46-10 (AACC, 1995) que determina o nitrogênio orgânico total de uma amostra. Os resultados foram submetidos à ANOVA e as médias foram comparadas pelo teste de comparação múltipla de Tukey com significância de 5% com o auxílio do software estatístico SigmaPlot versão 12.3.

6.2.2.2 Experimento 2

O delineamento do experimento 2 também foi desenhado em blocos casualizados com 6 repetições por tratamento. Nesse experimento, *P. putida* UW4 *acdS*⁺ foi encapsulada separadamente do fungo seguindo a mesma metodologia descrita no experimento 1 ([item 6.2.2.1](#)). Foram definidos 3 tratamentos: tratamento controle (*P. ostreatus* encapsulado sem bactéria), tratamento PL_{t0}UW4⁺_{t1} (*P. ostreatus* inoculado no substrato 72 h antes de *P. putida* UW4 *acdS*⁺) e tratamento UW4*acdS*⁺_{t0}PL_{t1} (*P. putida* UW4 *acdS*⁺ inoculada no substrato 72 h antes de *P. ostreatus*). No total foram obtidos 2 inoculantes (um contendo somente o fungo e outro contendo somente a bactéria) adicionados no substrato em tempos diferentes de acordo com os tratamentos definidos (Tabela 6.3).

Tabela 6. 3 – Combinações fungo-bactéria do experimento 2.

Tratamento	Descrição
PL	<i>P. ostreatus</i> encapsulado sem bactéria
PL _{t0} +UW4 <i>acdS</i> ⁺ _{t1}	<i>P. ostreatus</i> encapsulado e inoculado no substrato 72 h antes de <i>P. putida acdS</i> ⁺
UW4 <i>acdS</i> ⁺ _{t0} PL _{t1}	<i>P. putida acdS</i> ⁺ encapsulada e inoculada no substrato 72 h antes de <i>P. ostreatus</i>

Fonte: o autor (2020)

O substrato empregado foi o mesmo que para o experimento 1, porém os sacos de polipropileno utilizados foram de 20x30 cm sem abertura (Fig. 6.4). Os sacos foram enchidos com 600g de substrato, esterilizados por 60 min a 121 °C e resfriados à temperatura ambiente antes da inoculação. Diferente do experimento 1, o processo de encapsulamento foi realizado diretamente sem o processo de incubação, mas a dosagem das cápsulas (12 g de cápsulas por saco equivalente a 90 µg de biomassa fúngica/cápsula), a inoculação e incubação dos blocos inoculados foram realizadas da mesma forma que o experimento 1 (item [6.2.2.1](#)). Para um melhor controle da variável umidade o experimento foi realizado acoplado um sensor de umidade ao umidificador. A temperatura não foi controlada e foi dependente da sazonalidade (dezembro 2017-fevereiro 2018).

Figura 6.10 – Sacos sem abertura preenchidos com 600 g de substrato comercial para o cultivo de *Pleurotus ostreatus*.



Fonte: o autor (2020)

A frutificação dos cogumelos foi monitorada da mesma forma que no experimento 1 e os dados do peso fresco acumulado foram empregados para determinar *R* e *EB* de *P. ostreatus*.

Os resultados foram submetidos à ANOVA e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey com significância de 5% com o auxílio do software estatístico SigmaPlot versão 12.3.

6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.3.1 Experimento 1

6.3.1.1 Colonização

O fungo não colonizou uniformemente o substrato. Portanto, por conta da ausência de um padrão linear de colonização, não foi possível mensurar a ocupação do substrato pelo fungo (Fig. 6.5).

Figura 6.13 – Diferenças de colonização do substrato de *Pleurotus ostreatus*.



Fonte: o autor (2020)

Figura 6.14 – Substrato colonizado por *Pleurotus ostreatus*.



Fonte: o autor (2020)

Apesar que o inoculante foi posicionado superficialmente sobre o substrato, durante o fechamento dos sacos contendo o substrato algumas cápsulas se distribuíram nas partes laterais do saco, o que fez com que o fungo tivesse pontos de crescimento desuniformes. Além disso, o crescimento do micélio ocorreu de dentro para fora, dificultando a visualização do início da colonização. Porém, uma vez que a colonização iniciou, a ocupação do substrato aconteceu normalmente e o substrato foi 100% colonizado (Fig. 6.6).

6.3.1.2 Frutificação

A frutificação apresentou 2 ciclos de produção caracterizados por uma maior concentração da produção nas 2 semanas iniciais do experimento, sendo que o primeiro ciclo representou aproximadamente 70% da produção total. Portanto, as análises estatísticas foram realizadas separadamente considerando o rendimento obtido no 1° ciclo e o rendimento total (1° e 2° ciclos). Os resultados do rendimento e eficiência biológica *P. ostreatus* são apresentados na tabela 6.4.

O rendimento e eficiência biológica do 1° ciclo do tratamento UW4*acdS*⁺ foram diferentes significativamente em comparação com o tratamento controle e o tratamento UW4*acdS*⁻. Porém, no ciclo 2 essa diferença não é evidente, provavelmente devido ao fato que a maioria do peso produzido ficou concentrado no 1° ciclo. O tratamento UW4*acdS*⁺ (bactéria selvagem), apresentou um rendimento maior (151,88g/kg) que o tratamento PL (108,94g/kg) e o tratamento UW4*acdS*⁻ (bactéria mutante) (113,93g/kg), o que representa um aumento no rendimento de 39,41% e 33,31%, respectivamente. Considerando que a única diferença entre os tratamentos é a presença do gene *acdS*, este resultado sugere que o aumento no rendimento observado no tratamento UW4*acdS*⁺ é devido a presença do gene ACCD. No entanto, o efeito associado ao gene *acdS* não foi observado nos tratamentos contendo a bactéria *P. fluorescens*. Neste caso, o tratamento contendo a bactéria selvagem (*P. fluorescens acdS*⁺) não foi diferente significativamente do tratamento controle ou do tratamento com a respectiva bactéria mutante (*P. fluorescens* UW4 *acdS*⁻). A ausência de um efeito positivo nessa bactéria evidencia que é provável que os efeitos do gene *acdS* produzido pelas bactérias sejam específicos para cada espécie fúngica. Além disso, é possível que *P. fluorescens* não possua algum mecanismo que está presente em *P. putida* e que nesta bactéria permite que a enzima ACCD efetivamente degrade o ACC produzido pelo fungo.

Tabela 6. 4 – Rendimento e eficiência biológica de *Pleurotus ostreatus* cultivado em laboratório em substrato comercial (Experimento 1).

Tratamento ²	Dias até primeira colheita	R (g/kg) ¹		R Total (g/kg) ^{*1}	EB(%) ¹		EB Total (%)* ¹
		Ciclo 1 [*]	Ciclo 2 [*]		Ciclo 1 [*]	Ciclo 2 [*]	
PL	32,83 ^a	108,94±11,31 ^a	42,28±14,58 ^a	151,22±23,85 ^a	16,93±1,76 ^a	6,57±2,26 ^a	23,50±3,70 ^a
UW4acdS ⁺	35,17 ^a	151,88±11,94 ^b	50,84±12,58 ^a	202,72±17,14 ^b	23,60±1,85 ^b	7,90±1,95 ^a	31,50±2,66 ^b
UW4acdS ⁻	35,50 ^a	113,93±17,12 ^a	63,72±8,25 ^a	177,65±16,59 ^{ab}	17,75±2,50 ^a	10,25±1,26 ^a	28,00±2,16 ^{ab}
YsS6acdS ⁺	33,80 ^a	121,51±15,62 ^{abc}	44,46±21,07 ^a	165,96±30,61 ^{ab}	18,88±2,43 ^{abc}	6,91±3,27 ^a	25,79±4,76 ^{ab}
YsS6acdS ⁻	33,83 ^a	136,36±13,70 ^{ab}	48,40±14,74 ^a	184,76±17,10 ^{ab}	21,25±2,06 ^{ab}	7,75±2,36 ^a	29,00±2,45 ^{ab}

*Médias seguidas por uma mesma letra na mesma coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). ¹R= Rendimento; R Total= Rendimento total; EB= Eficiência biológica; EB Total= Eficiência biológica total.²PL: *Pleurotus ostreatus* encapsulado sem bactéria; UW4acdS⁺: *Pleurotus ostreatus* encapsulado com *Pseudomonas putida* UW4 acdS⁺; UW4acdS⁻: *Pleurotus ostreatus* encapsulado com *Pseudomonas putida* UW4 acdS⁻; YsS6acdS⁺: *Pleurotus ostreatus* encapsulado com *Pseudomonas fluorescens* YsS6acdS⁺; YsS6acdS⁻: *Pleurotus ostreatus* encapsulado com *Pseudomonas fluorescens* YsS6acdS⁻

Fonte: o autor (2020)

Os resultados mostram que *P. putida* UW4 acdS⁺ melhorou significativamente a frutificação de *P. ostreatus* em relação ao tratamento controle e o tratamento contendo a bactéria sem o gene. As diferenças significativas entre a bactéria selvagem e a mutante sugere que o efeito positivo observado na frutificação pode ser atribuído ao gene *acdS* e que o mecanismo utilizado pela bactéria para melhorar o desempenho do fungo está relacionado com a enzima ACCD. Ao que parece, a presença da enzima melhorou a capacidade do fungo de converter o substrato de cultivo em biomassa fúngica de forma mais eficiente, o que é evidente nos dados de eficiência biológica conforme exibido na tabela 6.4. É possível observar que a eficiência biológica do tratamento controle (16,93%) e do tratamento UW4 acdS⁻ (17,75%) são similares, o que reforça a hipótese de que o melhor desempenho observado com o tratamento UW4 acdS⁺ possa ser atribuído ao gene *acdS*.

Alguns trabalhos com espécies de *Pleurotus* têm mostrado que bactérias do gênero *Pseudomonas* podem promover o crescimento do fungo. O estudo de Kim e colaboradores (2008) mostrou que a adição do sobrenadante de *Pseudomonas* sp. P7014 reduziu o tempo de colonização do substrato e o tempo de formação dos primórdios. Da mesma forma, Cho e colaboradores (2003) relataram como várias cepas de *Pseudomonas* sp. promoveram o desenvolvimento do micélio de *P. ostreatus in vitro*, assim como a formação de primórdios e basidiomas. No outro estudo, Cho (2008) avaliou o efeito de bactérias do gênero *Pseudomonas* presentes no substrato de cultivo de

P. ostreatus. O autor observou uma redução no tempo de formação dos cogumelos do fungo. No entanto, nesses estudos os possíveis mecanismos envolvidos na promoção do crescimento do fungo não são elucidados.

A maioria dos estudos sobre o efeito de bactérias na frutificação de cogumelos tem sido conduzidos com *A. bisporus* (GREWAL & RAINEY, 1991; MILLER *et al.*, 1995; NOBLE *et al.*, 2008; CHEN *et al.*, 2013). Os resultados do presente trabalho indicam que mecanismos similares aos descritos em *A. bisporus* ocorram com *P. ostreatus*. O aumento no rendimento do fungo observado com a bactéria com atividade ACCD indica que é provável que o etileno produzido por *P. ostreatus* estimule a interação do fungo com *P. putida* como acontece com *A. bisporus*. No capítulo I, as análises de cromatografia gasosa mostram que o micélio de *P. ostreatus* produz etileno e que a associação com bactérias com atividade ACCD reduz os níveis do hormônio. É plausível que o mesmo aconteça no substrato de produção de cogumelo, durante a fase de colonização do fungo. Embora os resultados da biossíntese de etileno no fungo não sejam conclusivos, os resultados preliminares sugerem que *P. ostreatus* produz etileno via ACC, o que explicaria o efeito positivo da bactéria selvagem. Se a via de produção de etileno do fungo é via ACC, este metabólito poderia estimular a bactéria durante a colonização do substrato melhorando o desempenho do fungo e, portanto, sua frutificação.

Nos experimentos conduzidos com *P. ostreatus* e *P. fluorescens* YsS6, a bactéria selvagem mostrou um comportamento diferente, sem diferenças significativas com o tratamento controle e com o tratamento contendo a bactéria selvagem. Esse resultado poderia ser atribuído provavelmente a um efeito relacionado com a especificidade da interação fungo-bactéria como descrito no trabalho de Kohlmeier e colaboradores (2005). Eles afirmam que a mobilização de bactérias no micélio fúngico é dependente dos microrganismos que interagem. Esse comportamento poderia explicar porque diferentes espécies de bactérias com atividade ACCD podem apresentar efeitos opostos na mesma espécie fúngica. O potencial da interação entre *P. putida* e *P. ostreatus* e sua importância para o cultivo de cogumelos levanta a necessidade de avaliar a influência desta bactéria sob condições comerciais, abrindo possibilidade de aplicar o uso de bactérias em escala industrial.

6.3.1.3 Conteúdo de proteína

Na tabela 6.5 é possível observar que o teor de proteína nos basidiomas de *P. ostreatus* foi significativamente maior nos tratamentos em que o fungo foi associado a bactéria. Em comparação como o tratamento controle, o aumento de proteína obtido com o tratamento UW4*acdS*⁺ foi de 44%, e com o tratamento UW4 *acdS*⁻ foi de 29%. Entre o tratamento com a bactéria selvagem e a mutante não foi observado diferença estatística. Esse resultado sugere que o aumento no conteúdo de proteína no fungo parece ser devido à presença da bactéria e não ao gene *acdS*. Esses resultados mostram que *P. putida* não somente tem a capacidade de melhorar o rendimento de *P. ostreatus*, mas que também tem o potencial de melhorar suas características nutricionais.

Tabela 6. 5 – Análise de Tukey do %proteína em base seca pelo método de Kjeldahl.

Tratamento ²	% proteína base seca ¹
PL	13,07±076 ^a
UW4 <i>acdS</i> ⁺	18,81±1,51 ^b
UW4 <i>acdS</i> ⁻	16,98±2,19 ^b

¹Médias seguidas por uma mesma letra na mesma coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). ²PL: *Pleurotus ostreatus*; UW4*acdS*⁺: *Pleurotus ostreatus* encapsulado com *Pseudomonas putida acdS*⁺; UW4*acdS*⁻: *Pleurotus ostreatus* encapsulado com *Pseudomonas putida acdS*⁻

Fonte: o autor (2020)

O efeito de bactérias no conteúdo nutricional de cogumelos foi estudado por Kumar e colaboradores (2018). Os autores obtiveram um resultado similar empregando *P. putida* para melhorar o rendimento de *A. bisporus*. Eles aplicaram uma solução da bactéria em forma de spray sobre o substrato de produção do fungo. *P. putida* estimulou a frutificação do fungo, aumentou o conteúdo de proteína e de carboidratos. O aumento de proteína nos basidiomas de *A. bisporus* pulverizados com a bactéria em relação ao tratamento controle foi de 42%. Han (1999) também estudou a influência da bactéria fotosintética *Rhodospseudomonas palustris* na produtividade e conteúdo de proteína de *A. bisporus*. A bactéria também foi aplicada pulverizando uma suspensão do microrganismo sobre o substrato de produção do cogumelo. Neste caso, os aumentos do rendimento foram de quase 40%, porém, não houve um aumento significativo no conteúdo de proteína. Ainda outro estudo com *A. bisporus* mostrou que adição de *P. putida* em suspensão no substrato de produção do fungo resultou em um aumento no conteúdo de nitrogênio total e proteína em comparação com o substrato no inoculado (KHALILI *et al.*, 2013). Todos esses resultados

sugerem que *P. putida* possui algum mecanismo que permite melhorar o conteúdo proteico de fungos como *P. ostreatus* avaliado neste trabalho. O aumento no conteúdo de proteína obtido com as duas cepas, a selvagem e a mutante, mostra que o mecanismo não é dependente da produção da enzima ACC deaminase, mas sim da presença da bactéria.

De acordo com Kumar (2018), as bactérias servem como suprimento de nutrientes para o cultivo de cogumelos liberando compostos no substrato que ajudam à frutificação e a elaboração de constituintes bioquímicos do fungo. Kumar afirma também que *P. putida* libera ferro no substrato, o que estimula a frutificação do fungo. Em concordância com isso, Condé e colaboradores (2017) encontraram que a suplementação do substrato com ferro afetou o conteúdo nutricional de *P. ostreatus*. Eles observaram que os basidiomas absorveram o ferro e que a porcentagem de proteína aumentou com o aumento das doses de Fe adicionadas ao substrato, em comparação com o tratamento controle. Desta forma, o uso de bactérias se apresenta como uma alternativa para melhorar o conteúdo nutricional de cogumelos de interesse comercial.

Considerando os resultados positivos obtidos, *P. putida* UW4 *acdS*⁺ foi selecionada para dar continuidade aos experimentos de frutificação em nível de laboratório e verificar se o método de inoculação influencia o desempenho do fungo.

6.3.2 Experimento 2

6.3.2.1 Colonização

Similar ao experimento 1, a colonização do fungo no substrato não apresentou um padrão uniforme.

Além disso, o inoculante ficou preponderantemente distribuído nas partes laterais do saco, dificultando uma colonização homogênea do substrato pelo fungo. Porém, o fungo colonizou 100% do substrato em todos os tratamentos (Fig. 6.7).

6.3.2.2 Frutificação

A frutificação apresentou 2 ciclos de produção para todos os tratamentos. Porém, a concentração da produção nas primeiras 3 semanas foi diferente entre eles: o tratamento controle (PL) produziu somente 45% da sua produção total nesse período, enquanto que os tratamentos PL_{t0}+UW4 *acdS*⁺_{t1} e UW4*acdS*⁺_{t0}PL_{t1} produziram 74% e 81% da sua produção total,

respectivamente. Os resultados das análises estatísticas do rendimento e da eficiência biológica de *P. ostreatus* nos dois ciclos podem ser observados na tabela 6.6.

Figura 6.17 – Colonização de *Pleurotus ostreatus* em substrato comercial. A: distribuição do inoculante no substrato. B: Colonização completa do substrato.



Fonte: o autor (2020)

Como observado na tabela 6.6, no 1º ciclo de cultivo os tratamentos em que o fungo foi associado à bactéria produziram rendimentos significativamente maiores em comparação com o tratamento controle.

Tabela 6.6 – Rendimento e eficiência biológica de *Pleurotus ostreatus* cultivado em laboratório em substrato comercial (Experimento 2).

Tratamento ²	Dias até a primeira colheita*	R (g/kg)		R Total (g/kg) ^{*1}	EB (%) ¹		EB Total (%) ^{*1}
		Ciclo 1*	Ciclo 2*		Ciclo 1*	Ciclo 2*	
PL	29,00	66,44±20,89a	81,13±18,19a	147,58±26,97a	17,77±5,59a	21,69±4,86a	39,46±7,21a
PL ₁₀ +UW4 <i>acdS</i> ⁺ ₁₁	33,50	111,23±24,33b	37,52±34,64b	148,76±23,31a	29,74±6,51b	10,03±9,26b	39,77±6,23a
UW4 <i>acdS</i> ⁺ ₁₀ PL ₁₁	31,83	140,82±30,41b	31,79±30,96b	172,61±13,95a	37,65±8,13b	8,50±8,28b	46,15±3,73a

*Médias seguidas por uma mesma letra na mesma coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). ¹R= Rendimento; R Total= Rendimento total; B= Eficiência biológica; EB Total= Eficiência biológica total. ²PL: *Pleurotus ostreatus* encapsulado sem bactéria; PL₁₀+UW4 *acdS*⁺₁₁: *Pleurotus ostreatus* encapsulado e inoculado no substrato 72 h antes de *Pseudomonas putida acdS*⁺; UW4*acdS*⁺₁₀PL₁₁: *Pseudomonas putida acdS*⁺ encapsulada e inoculada no substrato 72 h antes de *Pleurotus ostreatus*

Fonte: o autor (2020)

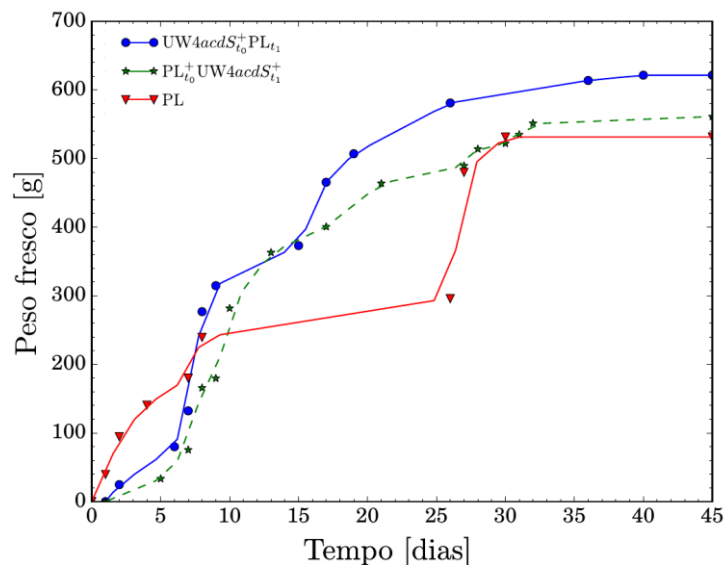
Os resultados da eficiência biológica também mostraram que a bactéria aumentou a eficiência do fungo para converter o substrato disponível em biomassa fúngica, o que foi

evidenciado no maior rendimento nos dois tratamentos com a bactéria. No tratamento em que o fungo foi adicionado ao substrato antes da bactéria ($PL_{t_0}+UW4\ acdS^+_{t_1}$), a frutificação do fungo aumentou em 67% em comparação com o controle. No tratamento em que o fungo foi adicionado depois da bactéria ($UW4acdS^+_{t_0}PL_{t_1}$) o aumento foi de 111,96%. No entanto, entre os tratamentos contendo bactéria não houve diferença estatística significativa.

No 2º ciclo de produção o tratamento controle produziu seu maior rendimento em comparação com o 1º ciclo, diferente dos tratamentos contendo bactéria. Estes tiveram os menores rendimentos, já que produziram mais de 70% da sua produção no 1º ciclo. Esse resultado mostrou que nos tratamentos $PL_{t_0}+UW4\ acdS^+_{t_1}$ e $UW4acdS^+_{t_0}PL_{t_1}$ a associação com a bactéria proporcionou ao fungo maior capacidade de usar o substrato e, portanto, maior produção de basidiomas em um tempo menor em relação ao tratamento controle.

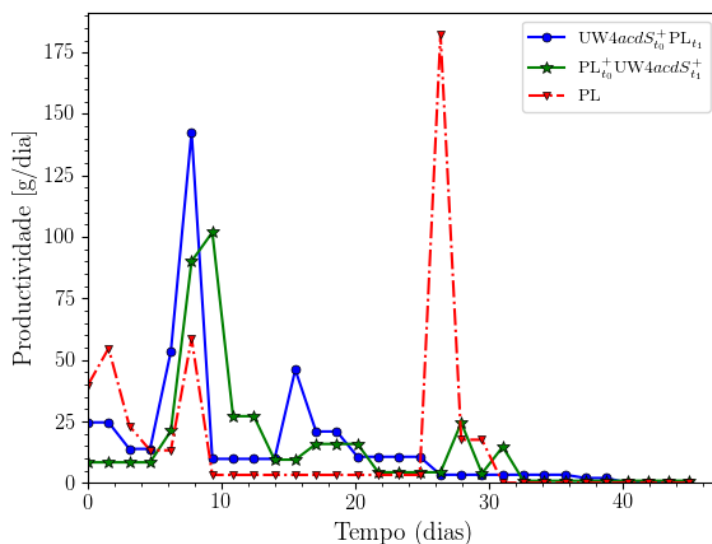
O rendimento total mostrou que os tratamentos não se diferenciaram significativamente, o que implicou que no final de dos ciclos de produção todos os tratamentos se igualam no rendimento. No entanto, os tratamentos com bactéria alcançaram o máximo rendimento num período de tempo menor, ou seja, tiveram uma maior produtividade. A Fig. 6.8 mostra o rendimento do fungo ao longo do tempo e a Fig. 6.9 mostra a produtividade dos tratamentos, ou seja, a produção de cogumelo em função do tempo.

Figura 6.19 – Rendimento de *Pleurotus ostreatus* ao longo do tempo. $UW4acdS^+_{t_0}PL_{t_1}$: *Pseudomonas putida acdS^+* encapsulada e inoculada no substrato 72 h antes de *Pleurotus ostreatus*; $PL_{t_0}+UW4\ acdS^+_{t_1}$: *Pleurotus ostreatus* encapsulado e inoculado no substrato 72 h antes de *Pseudomonas putida acdS^+*; PL: *Pleurotus ostreatus* encapsulado sem bactéria.



Fonte: o autor (2020)

Figura 6.20 – Produtividade de *Pleurotus ostreatus*. UW4acdS⁺_{t0}PL_{t1}: *Pseudomonas putida* acdS⁺ encapsulada e inoculada no substrato 72 h antes de *Pleurotus ostreatus*; PL_{t0}+UW4acdS⁺_{t1}: *Pleurotus ostreatus* encapsulado e inoculado no substrato 72 h antes de *Pseudomonas putida* acdS⁺; PL: *Pleurotus ostreatus* encapsulado sem bactéria.



Fonte: o autor (2020)

É possível observar que os picos de produtividade dos tratamentos contendo bactéria foram atingidos em tempos menores, aproximadamente 15 dias antes, em comparação com o tratamento controle. Também foi observado que depois da indução da frutificação os tratamentos contendo a bactéria começaram a frutificar mais cedo (7 dias mais cedo), enquanto que o tratamento controle demorou 25 dias para apresentar as primeiras frutificações.

Esta mesma tendência tem sido observada em *P. ostreatus* associado com outras espécies de *Pseudomonas* (CHO *et al.*, 2008), mostrando que a interação do fungo com bactérias benéficas melhora seu desempenho no substrato, aumentando sua produtividade. De acordo com os resultados do presente trabalho, este efeito é independente do método de inoculação, sendo que a bactéria poderia ser adicionada no substrato antes ou depois do fungo.

6.4 CONCLUSÕES

Este trabalho mostra que *P. putida* UW4 contendo a enzima ACCD melhora o desempenho de *P. ostreatus* cultivado em substrato comercial, o que evidencia que esta enzima tem um papel importante no processo de frutificação do fungo.

A enzima ACCD foi responsável pelo aumento no rendimento e produtividade de *P. ostreatus* quando em condições de co-cultivo.

Os resultados mostram que os efeitos do gene *acdS* podem ser específicos para cada espécie, já que a associação do fungo com *P. fluorescens acdS⁺* não se mostrou benéfica para sua frutificação.

A bactéria *P. putida* UW4 proporciona maior teor de proteína nos basidiomas de *P. ostreatus*, mostrando o potencial do uso de bactérias para melhorar as propriedades nutricionais de cogumelos.

O emprego do alginato de sódio como inoculante alternativo facilitou a avaliação da interação fungo-bactéria em substrato comercial sob condições de laboratório e abre a possibilidade de estudar outro tipo de bactéria como biofertilizante de cogumelos de interesse comercial.

REFERÊNCIAS

- AACC (American Association of Cereal Chemists). **Approved Methods**, v. I, Ninth edition, 1995.
- CHEN, Shichang *et al.* Effect of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase producing bacteria on the hyphal growth and primordium initiation of *Agaricus bisporus*. **Fungal Ecology**, [S.L.], v. 6, n. 1, p. 110-118, fev. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.funeco.2012.08.003>.
- CHO, Yong-Sup *et al.* Growth promotion of the edible fungus *Pleurotus ostreatus* by fluorescent *pseudomonads*. **Fems Microbiology Letters**, [S.L.], v. 218, n. 2, p. 271-276, jan. 2003. Oxford University Press (OUP). [http://dx.doi.org/10.1016/s0378-1097\(02\)01144-8](http://dx.doi.org/10.1016/s0378-1097(02)01144-8).
- CHO, Young Sub *et al.* Effect of Casing Layer on Growth Promotion of the Edible Mushroom *Pleurotus ostreatus*. **Mycobiology**, [S.L.], v. 36, n. 1, p. 40-44, 2008. Mycobiology (KAMJE). <http://dx.doi.org/10.4489/myco.2008.36.1.040>.
- CONDÉ, Viviane Flaviana *et al.* Farinha de *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm.(cogumelo *Hiratake*) enriquecido em ferro. **Ciência e Natura**, [S.L.], v. 39, n. 1, p. 01-6, 29 dez. 2016. Universidade Federal de Santa Maria. <http://dx.doi.org/10.5902/2179460x21437>.
- FREY-KLETT, P. *et al.* Bacterial-fungal interactions: hyphens between agricultural, clinical, environmental, and food microbiologists. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, [S.L.], v. 75, n. 4, p. 583-609, 29 nov. 2011. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/mmbr.00020-11>.
- GLICK, Bernard R. *et al.* Promotion of Plant Growth by Bacterial ACC Deaminase. **Critical Reviews in Plant Sciences**, [S.L.], v. 26, n. 5-6, p. 227-242, 23 out. 2007. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/07352680701572966>.
- GLICK, Bernard R. *et al.* 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase mutants of the plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2 do not stimulate canola root elongation. **Canadian Journal of Microbiology**, [S.L.], v. 40, n. 11, p. 911-915, 1 nov. 1994. Canadian Science Publishing. <http://dx.doi.org/10.1139/m94-146>.
- GLICK, Bernard R. *et al.* A Model For the Lowering of Plant Ethylene Concentrations by Plant Growth-promoting Bacteria. **Journal of Theoretical Biology**, [S.L.], v. 190, n. 1, p. 63-68, jan. 1998. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1006/jtbi.1997.0532>.
- GREWAL, S. I. S. *et al.* Phenotypic variation of *Pseudomonas putida* and *P. tolaasii* affects the chemotactic response to *Agaricus bisporus* mycelial exudate. **Journal of General Microbiology**, [S.L.], v. 137, n. 12, p. 2761-2768, 1 dez. 1991. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/00221287-137-12-2761>.
- HAN, Jianrong *et al.* The influence of photosynthetic bacteria treatments on the crop yield, dry matter content, and protein content of the mushroom *Agaricus bisporus*. **Scientia Horticulturae**, [S.L.], v. 82, n. 1-2, p. 171-178, dez. 1999. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0304-4238\(99\)00043-6](http://dx.doi.org/10.1016/s0304-4238(99)00043-6).

HONTZEAS, N. *et al.* Evidence for Horizontal Transfer of 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate Deaminase Genes. **Applied and Environmental Microbiology**, [S.L.], v. 71, n. 11, p. 7556-7558, nov. 2005. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.71.11.7556-7558.2005>.

JIA, Yan-Jun *et al.* Synthesis and Degradation of 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic Acid by *Penicillium citrinum*. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, [S.L.], v. 63, n. 3, p. 542-549, jan. 1999. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1271/bbb.63.542>.

KHALILI, H.R. *et al.* A. Plant growth promoting rhizobacteria affect button mushroom yield and quality. **Journal of Horticulture Biology and Environment**, Southwest, v. 4, n. 2, p. 83-89, 2013.

KIM, Min Keun *et al.* Effect of *Pseudomonas* sp. P7014 on the growth of edible mushroom *Pleurotus eryngii* in bottle culture for commercial production. **Bioresource Technology**, [S.L.], v. 99, n. 8, p. 3306-3308, maio 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2007.06.039>.

KOHLMEIER, Stefanie *et al.* Taking the Fungal Highway: mobilization of pollutant-degrading bacteria by fungi. **Environmental Science & Technology**, [S.L.], v. 39, n. 12, p. 4640-4646, jun. 2005. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/es047979z>.

KUMAR, Binit *et al.* Comparative Study of the Nutritional Content of White Button Mushroom [*Agaricus bisporus* (Lange) Imbach] after Application of *Pseudomonas putida*. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, [S.L.], v. 7, n. 2, p. 2210-2215, 10 fev. 2018. Excellent Publishers. <http://dx.doi.org/10.20546/ijcmas.2018.702.266>.

MINAMI, R. *et al.* Properties, Sequence, and Synthesis in *Escherichia coli* of 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate Deaminase from *Hansenula saturnus*. **Journal of Biochemistry**, [S.L.], v. 123, n. 6, p. 1112-1118, 1 jun. 1998. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a022050>.

MILLER, N. *et al.* The involvement of microbiological components of peat based casing materials in fructification of *Agaricus bisporus*. **The International Society of Mushroom Science**, Estados Unidos, v. 14, n. 38, p. 327-345, 1995.

NOBLE, Ralph *et al.* Volatile C8 compounds and *pseudomonads* influence primordium formation of *Agaricus bisporus*. **Mycologia**, [S.L.], v. 101, n. 5, p. 583-591, set. 2009. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.3852/07-194>.

ROSSI, Marcio *et al.* **Tecnologia para produção de inoculantes de fungos ectomicorrízicos utilizando cultivo submerso em biorreator airlift**. 2006. 188 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Química, Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006

SHEEHY, R e *et al.* Isolation, sequence, and expression in *Escherichia coli* of the *Pseudomonas* sp. strain ACP gene encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase. **Journal of Bacteriology**, [S.L.], v. 173, n. 17, p. 5260-5265, 1991. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jb.173.17.5260-5265.1991>.

SIMON, Anaele *et al.* Exploiting the fungal highway: development of a novel tool for the in situ isolation of bacteria migrating along fungal mycelium. **Fems Microbiology Ecology**, [S.L.], v. 91, n. 11, p. 116-129, 1 out. 2015. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/femsec/fiv116>.

SUN, Yili *et al.* The presence of a 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase deletion mutation alters the physiology of the endophytic plant growth-promoting bacterium *Burkholderia phytofirmans* PsJN. **Fems Microbiology Letters**, [S.L.], v. 296, n. 1, p. 131-136, jul. 2009. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01625.x>.

VITERBO, Ada *et al.* Characterization of ACC deaminase from the biocontrol and plant growth-promoting agent *Trichoderma asperellum* T203. **Fems Microbiology Letters**, [S.L.], v. 305, n. 1, p. 42-48, 4 mar. 2010. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.2010.01910.x>.

YOUNG, Li-Sen *et al.* Beneficial bacterial strains on *Agaricus blazei* cultivation. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, [S.L.], v. 47, n. 6, p. 815-821, jun. 2012. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-204x2012000600012>.

7 CAPÍTULO III

Produção comercial de *Pleurotus ostreatus* associado a bactérias com atividade ACC deaminase (ACCD)

RESUMO

O cultivo comercial de cogumelos como *Pleurotus ostreatus* representa uma importante aplicação biológica no aproveitamento de resíduos agroindustriais. Os inoculantes tradicionais são elaborados a partir de grãos como trigo, cevada, sorgo e milho. O uso de inoculantes alternativos, que permitam encapsular células vivas, é uma estratégia biotecnológica que facilita o emprego de associações fungo-bactéria que possam ser benéficas para a produção de cogumelos comestíveis. Usando um inoculante à base de alginato de sódio, *P. ostreatus* foi encapsulado com bactérias com atividade ACC deaminase (ACCD) que têm se mostrado favoráveis para o desenvolvimento de fungos como *A. bisporus*. As bactérias avaliadas foram: *Pseudomonas putida* UW4 *acdS*⁺, *Pseudomonas palleroriana* *acdS*⁺ e *Pseudomonas* sp. PL3 *acdS*⁻. Somente *P. putida* foi encapsulada juntamente com o fungo e também foi inoculada em forma de suspensão. *P. palleroriana* e *Pseudomonas* sp. PL3 foram inoculadas somente na forma de suspensão. Os resultados mostram que o rendimento do fungo foi significativamente maior quando associado com *P. putida* UW4 (25% na sua forma livre e 21% encapsulada junto com o fungo) e *P. palleroriana* MAB3 (23%). Não houve melhora no rendimento quando o fungo foi associado com *Pseudomonas* sp. PL3. Esses resultados evidenciam que bactérias produtoras da enzima ACCD têm grande potencial biotecnológico para serem empregadas no cultivo comercial de cogumelos comestíveis. Adicionalmente, destaca-se que *P. putida* exibiu resultados similares na sua forma livre e encapsulada junto com o fungo, mostrando que a forma de inoculação não afeta o efeito da bactéria sobre o desenvolvimento do fungo.

Palavras chave: Inoculante. Encapsulamento. Alginato de sódio. ACC deaminase. Associação fungo-bactéria. *Pleurotus ostreatus*. *Pseudomonas putida*.

7.1 INTRODUÇÃO

A produção comercial de cogumelos, principalmente de espécies lignocelulolíticas, torna-se cada vez mais importante no Brasil devido à disponibilidade de resíduos agroindústrias que podem ser empregados como substrato de cultivo. *Pleurotus ostreatus* destaca-se entre este tipo de fungos por ser uma espécie pouco exigente e de rápido crescimento, o que permite que seja cultivada em temperaturas um pouco mais altas que outras espécies (CHANG & MILES, 2004). Por isso, é um dos cogumelos mais consumidos no mundo depois de *Agaricus bisporus* (CHANG, 2009).

Tradicionalmente, o cultivo de cogumelos é realizado a partir de grãos de cereais previamente colonizados com o micélio fúngico. Entre os mais usados encontram-se o trigo, a cevada, o sorgo e o milho. Os grãos colonizados recebem o nome de “spawn” que é usado como o *starter* ou iniciador do cultivo (BORAH *et al.*, 2020). O *spawn* é de extrema importância para os produtores, pois sua qualidade inicial afeta todo o processo de produção dos cogumelos.

Outro fator que afeta a produção de cogumelos é a interação dos fungos com outros microrganismos presentes no substrato. Este aspecto tem sido amplamente estudado em *A. bisporus* (HAYES *et al.*, 1969; PARK & AGNIHOTRI *et al.*, 1969; CURTO & FAVELLI *et al.*, 1972; ZARENEJAD *et al.*, 2012; ZHANG *et al.*, 2019). No cultivo de *A. bisporus* os fungos e as bactérias presentes no substrato convertem os resíduos lignocelulósicos em um composto rico em nutrientes, seletivo para seu crescimento. Nas etapas subsequentes, esses microrganismos interagem com o micélio do fungo no substrato durante o alongamento das hifas, induzindo a formação dos cogumelos (KERTESZ & THAI, 2018).

Pseudomonas putida é uma das bactérias descritas como promotoras da frutificação de vários fungos, incluindo *A. bisporus*. Acredita-se que o papel deste tipo de bactéria seja a remoção de compostos voláteis como o 1-octen-3-ol e o etileno que são emitidos pelo micélio do fungo e que podem inibir a formação dos primórdios (NOBLE *et al.*, 2009; ZHANG *et al.*, 2016). A interação de *P. putida* com *A. bisporus* provoca a redução dos níveis de etileno produzidos pelo fungo, minimizando os efeitos inibitórios para seu crescimento (CHEN *et al.*, 2013). Essa bactéria produz a enzima ACC deaminase (ACCD), codificada pelo gene *acdS*. Por meio desta enzima, *P. putida* degrada o ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) impedindo que este seja oxidado a etileno pela enzima ACC oxidase (ACO). Desta forma, a bactéria consegue inibir a síntese de etileno e, portanto, os níveis de etileno produzidos pelo fungo são reduzidos (ZHANG

et al., 2019). Chen e colaboradores (2013) conseguiram comprovar, em experimentos *in vitro*, que este mecanismo acontece de fato em *A. bisporus* já que este fungo produz etileno via ACC.

Existem evidências de que algumas *Pseudomonas* também têm um efeito benéfico em espécies de *Pleurotus* (CHO *et al.*, 2003; KIM *et al.*, 2008). Estudos empregando substrato compostado para o cultivo de *P. ostreatus* têm encontrado que *Pseudomonas* é o gênero mais abundante no início do processo de compostagem (VIEIRA *et al.*, 2019). Alguns autores têm comprovado que bactérias pertencentes a este gênero têm um papel importante na estimulação da formação de primórdios e desenvolvimento de basidiomas de *P. ostreatus*, mostrando que a inoculação do micélio com bactérias específicas tem aplicações favoráveis para a produção deste cogumelo. No entanto, em *P. ostreatus* os mecanismos envolvidos nos efeitos benéficos produzidos pelas bactérias são menos compreendidos que em *A. bisporus* (CHO *et al.*, 2003; CHO *et al.*, 2008).

Uma alternativa tecnológica que facilita associar fungos e bactérias para estudar os efeitos benéficos desta interação é o *spawn* à base de alginato de sódio. Diferente do *spawn* em grão, o de alginato de sódio permite encapsular microrganismos que podem ser usados com fins comerciais. O uso de inoculantes microbianos para incrementar a produtividade de cogumelos foi relatado pela primeira vez por Ahlawat & Rai (1997) usando *Azotobacter* sp. para inocular o micélio de *A. bisporus*. Eyini e colaboradores (2005) também usaram *Azotobacter* sp. para melhorar a produtividade de *P. ostreatus*. Tradicionalmente, os inoculantes à base de alginato de sódio têm sido empregados na agricultura para encapsular bactérias que ao ser liberadas no solo, colonizam as raízes das plantas e as protegem contra agentes patogênicos (DELUCCA *et al.*, 1990; RUSSO *et al.*, 1996).

Considerando o potencial biotecnológico de encapsular consórcios de microrganismos benéficos para melhorar a produtividade de fungos produtores de cogumelos comestíveis, este capítulo pretende avaliar o efeito de bactérias com atividade ACCD na produção comercial de *P. ostreatus*. Para isso, os seguintes objetivos foram propostos:

1. Quantificar a produção de *P. ostreatus* inoculado com *P. putida* UW4 *acdS*⁺, *P. palleroriana* MAB3 e *Pseudomonas* sp. PL3;
2. Verificar se a associação do fungo com bactérias produtoras da enzima ACCD melhoram o desempenho de *P. ostreatus* em termos de rendimento e eficiência biológica;
3. Determinar se o *spawn* à base de alginato de sódio é viável para o cultivo comercial de cogumelos.

7.2 MATERIAIS E MÉTODOS

7.2.1. Cepas

A cepa *P. ostreatus* FB-PL224 foi fornecida pela empresa Fungi Brasilis & Vegetais Verdes e foi mantida no laboratório em meio BDA (batata-dextrose-ágar) a 25 °C até o momento das análises. *Pseudomonas putida* UW4 *acdS*⁺ (com atividade ACCD) foi fornecida pelo Dr. B. R. Glick da Universidade de Waterloo (Canada), sendo conservada a -70 °C em caldo Tripticaseína de Soja (TSB) com glicerol e reativada para as análises em Ágar Triptona de Soja (TSA) a 28 °C durante 24-48 h. Adicionalmente, foram empregadas duas bactérias isoladas e caracterizadas previamente no laboratório a partir de basidiomas de cogumelos e que mostraram efeitos positivos no crescimento *in vitro* de fungos: *Pseudomonas palleroriana* MAB3 *acdS*⁺ (com atividade ACCD) isolada de basidiomas de *Amanita* sp., e *Pseudomonas* sp. PL3 *acdS*⁻ (sem atividade ACCD) isolada a partir de basidiomas de *P. ostreatus* FB PL224 que foram conservadas a -70 °C em caldo TSB com glicerol e reativada para as análises em TSA a 28 °C durante 24-48 h. Para a obtenção das suspensões bacterianas, a massa bacteriana de 1 placa/bactéria foi retirada com o auxílio de uma alça estéril e transferida para um frasco tipo Erlenmeyer de 250 mL contendo 150 mL de meio TSB. Os Erlenmeyers inoculados foram dispostos em uma mesa agitadora a 180 rpm, a 28° C overnight para a multiplicação das bactérias. As suspensões bacterianas foram ajustadas em uma densidade óptica (DO) de 0,5 em meio TSB com o auxílio de um espectrofotômetro BEL PHOTONICS SP 1105. Uma alíquota de 100 µL de cada suspensão bacteriana foi diluída em 900 µL de meio TSB para determinar as unidades formadoras de colônia (UFC) correspondentes à DO de 0,5 pelo método de microplaqueamento. Para isso, uma alíquota de 5 µL foi semeado em placas contendo meio TSA e incubado a 28° C durante 24 h. No fim desse período, foi realizada a contagem bacteriana. A contagem resultante de células bacterianas foi na ordem de 10⁻⁹ UFC/mL.

7.2.2 Desenho Experimental

O micélio de *P. ostreatus* foi encapsulado com e sem bactérias, de acordo com o procedimento descrito no capítulo 2. Em alguns casos, as bactérias não foram encapsuladas junto com o fungo e só foram adicionadas em suspensão junto com as cápsulas de *P. ostreatus* no momento da inoculação dos blocos de substrato para produção dos cogumelos. Esta etapa teve a

finalidade de avaliar se a forma de associação fungo-bactéria (livre ou em cápsulas) influencia de alguma forma a frutificação do fungo em condições comerciais.

Foram definidos 7 tratamentos no total, com 10 replicatas cada, para um total de 70 blocos de substrato de produção. A tabela 7.1 mostra as combinações de associação fungo-bactéria definidas nos tratamentos.

A inoculação dos sacos de produção de cogumelos e as etapas referentes à frutificação foram realizadas nas instalações da empresa *Fungi brasiliis & Verduras Verdes*, uma empresa de produção orgânica de cogumelos situada a 40 km de Florianópolis no município de Biguaçu (SC). O experimento foi conduzido sob condições de produção comercial da *Fungi Brasiliis* com o intuito de confirmar se os resultados obtidos previamente em condições de laboratório seriam reproduzíveis em condições comerciais. O substrato utilizado para a produção foi fornecido pela empresa e a formulação foi a mesma utilizada no experimento realizado em laboratório. Esse substrato consistiu em uma mistura à base de serragem suplementado com grãos de cereais, acondicionado em sacos esterilizáveis de polietileno de alta densidade com 0,08 micras de espessura e sem filtro.

Tabela 7.1 – Combinações fungo-bactéria utilizadas nos tratamentos.

Tratamento	Descrição
Controle	<i>Pleurotus ostreatus</i> encapsulado sem bactéria
PL+UW4+	<i>Pleurotus ostreatus</i> encapsulado juntamente com <i>Pseudomonas putida</i> UW4 <i>acdS</i> ⁺
PL+UW4-	<i>Pleurotus ostreatus</i> encapsulado juntamente com <i>Pseudomonas putida</i> UW4 <i>acdS</i> ⁻
UW4+	<i>Pleurotus ostreatus</i> encapsulado sem bactéria com adição posterior de <i>Pseudomonas putida</i> UW4 <i>acdS</i> ⁺ em suspensão
UW4-	<i>Pleurotus ostreatus</i> encapsulado sem bactéria com adição posterior de <i>Pseudomonas putida</i> UW4 <i>acdS</i> ⁻ em suspensão
MAB3	<i>Pleurotus ostreatus</i> encapsulado sem bactéria com adição posterior de <i>Pseudomonas palleroriana</i> MAB3 em suspensão
PL3	<i>Pleurotus ostreatus</i> encapsulado sem bactéria com adição posterior de <i>Pseudomonas</i> sp. PL3 em suspensão

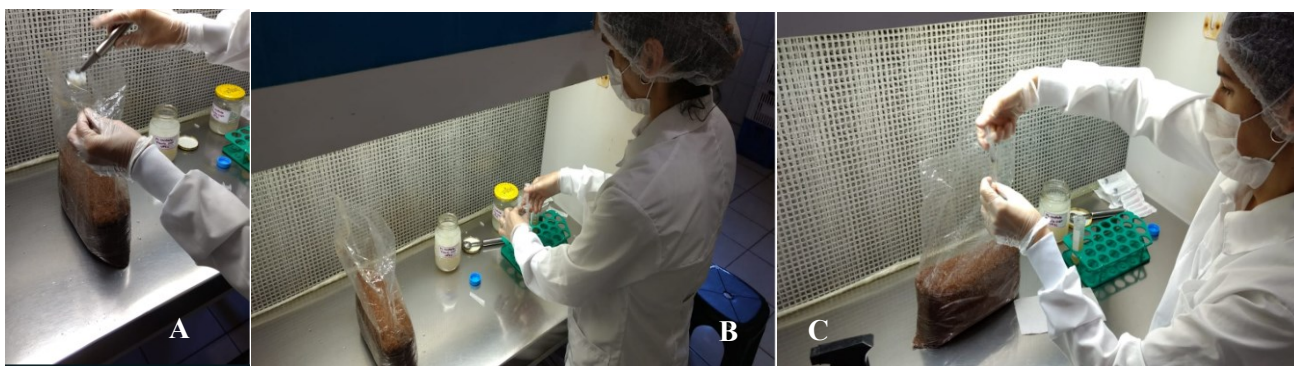
Fonte: o autor (2020)

7.2.3 Inoculação dos blocos de substrato

A concentração das bactérias encapsuladas junto com o fungo e aquelas adicionadas em suspensão foram ajustadas previamente em uma DO de 0,5 (para um equivalente de células bacterianas na ordem de 10^{-9} UFC/mL) utilizando caldo TSB. No caso das bactérias encapsuladas junto com o fungo, as cápsulas foram obtidas empregando 1 mL de bactéria por cada 100 mL de suspensão miceliana previamente fragmentada (1%). As cápsulas de todos os tratamentos foram armazenadas em frascos contendo solução salina 0,8% sob refrigeração até o momento da inoculação. As bactérias adicionadas de forma livre foram cultivadas 24 h antes da montagem do experimento. Para isso, as bactérias foram cultivadas overnight a 28 °C em meio caldo TSB e em seguida ajustadas em uma DO de 0,5 usando espectrofotômetro.

Para manter as condições utilizadas pela *Fungi Brasilis*, os sacos foram preenchidos com 1200g de substrato e esterilizados em autoclave a 121 °C durante 1 hora e 30 min, e resfriados a temperatura ambiente antes da inoculação. Os sacos foram inoculados em condições assépticas em câmara de fluxo laminar de acordo com os tratamentos definidos (Fig. 7.1).

Figura 7.2 – Procedimento de inoculação dos sacos de substrato utilizados na *Fungi Brasilis*. A: Adição do inoculante em cápsulas no substrato; B: dosagem das bactérias em suspensão: adição da suspensão de bactérias no substrato.



Fonte: o autor (2020)

Para a dosagem das cápsulas foi utilizada a quantidade equivalente a 1 colher dosadora (aproximadamente 5 gramas de cápsulas). As cápsulas foram dispostas na parte superior do substrato seguindo o padrão de inoculação da empresa (Fig. 7.1A). As bactérias que foram inoculadas de forma livre foram adicionadas com auxílio de seringas estéreis utilizando um volume

de 5 mL de suspensão por bactéria (Fig. 7.1B). As suspensões de bactéria também foram aplicadas na parte superior do substrato (Fig. 7.1C).

Os sacos inoculados doravante denominados de blocos de substrato foram fechados e levados à sala de incubação e dispostos aleatoriamente em prateleiras utilizando o método de sorteio. A temperatura da sala foi monitorada diariamente e mantida a ± 23 °C com auxílio de ar condicionado. Com a finalidade de avaliar a velocidade de colonização do fungo no substrato, os blocos foram verificados diariamente até que se visualizasse o aparecimento do micélio.

7.2.4 Colonização do substrato de produção de cogumelo

Foi realizada uma marcação nos blocos contendo o substrato a partir do primeiro sinal de colonização, e com auxílio de uma régua foi mensurado o avanço diário do micélio em cm (Fig. 7.2). Uma vez estando 100% colonizados, os blocos de substrato foram sendo retirados da sala de incubação e levados para o galpão de frutificação onde foram dispostos aleatoriamente em prateleiras utilizando o mesmo método de sorteio usado na sala de incubação

Figura 7.4 – Marcação realizada nos blocos para a avaliação da colonização diária.



Fonte: o autor (2020)

7.2.5 Indução da frutificação

Para induzir a frutificação, os blocos de substrato colonizados foram furados utilizando um furador metálico previamente desinfetado com álcool 70%, seguindo o padrão de furação da

empresa, isto é, realizando 4 furos na parte superior do bloco (Fig. 7.4). No galpão de frutificação os blocos colonizados estiveram expostos às condições ambientais próprias da estação (maio-julho 2019), sem controle de temperatura. Para manter a umidade acima de 90%, fator necessário para a frutificação de *P. ostreatus* (ESPOSITO & AZEVEDO, 2010), foi utilizado um sistema de aspersão que era acionado automaticamente de acordo com a umidade do ambiente. A temperatura e umidade foram registradas diariamente. Para verificar o início da frutificação os blocos colonizados foram revisados diariamente até o aparecimento dos primórdios.

Para realizar a colheita, os cogumelos foram colhidos no estágio de desenvolvimento considerado comercialmente viável para a empresa, isto é, basidiomas ainda fechados (antes que as bordas virem para cima), que a empresa denomina como *shimeji* (Fig. 7.3). Cabe esclarecer que algumas referências na literatura atribuem o nome *shimeji* a um grupo de cogumelos comestíveis nativos da Ásia: *Hypsizygus tessulatus* (Hon-*shimeji* ou Bruna-*shimeji* no Japão) ou *Hypsizygus ulmarius*, que por sua similaridade macroscópica com *P. ostreatus* começou a ser comercializado no Brasil como *shimeji*. Porém, alguns autores consideram o gênero *Hypsizygus* como sinônimo de *Pleurotus*. Sendo assim, e de acordo com as exigências do mercado, em termos gerais, *P. ostreatus* é reconhecido como *shimeji* quando colhido em pencas no estágio jovem, com coloração escura (basidiomas entre 1 e 2 cm), e *hiratake* quando os basidiomas são maduros com tamanho maior que 5 cm de diâmetro (EIRA, 2010).

Figura 7.7 – Estágio de desenvolvimento de *Pleurotus ostreatus* considerado como *shimeji*.



Para garantir uma maior uniformidade no tamanho dos basidiomas colhidos, as colheitas foram realizadas até 3 vezes por dia, especialmente nos dias com temperaturas mais elevadas, já que o aumento da temperatura provoca um crescimento mais acelerado dos basidiomas. Os basidiomas colhidos foram pesados imediatamente após a colheita utilizando uma única balança durante todo o experimento. Os dados do peso fresco foram registrados junto com a data de colheita para permitir um maior controle da frutificação por tratamento. De acordo com este registro, quando não se observaram mais frutificações contínuas por 5 dias, os blocos foram induzidos novamente realizando uma nova furação no lado contrário do bloco, realizando novamente 4 furos (Fig. 7.4). Depois de alguns dias após a segunda indução, a colheita foi realizada nas mesmas condições que a primeira. O procedimento de indução foi repetido uma terceira vez, furando os blocos na parte lateral, realizando desta vez 2 furos em vez de 4. A colheita foi realizada da mesma forma que as duas colheitas anteriores.

Figura 7.8 – Sistema de furação utilizado pela empresa *Fungi Brasilis* para induzir a frutificação nos blocos colonizados.



Fonte: o autor (2020)

Na análise de dados, por se tratar de um experimento de peso acumulativo, os pesos diários obtidos por cada replicata foram somados e somente a somatória dos pesos acumulados por replicata foi usada para se obter a média de peso por tratamento. Os dados foram analisados usando o programa estatístico SigmaPlot.

As variáveis avaliadas em relação ao peso fresco dos cogumelos foram rendimento e eficiência biológica, definidas nas equações (1) e (2) do [capítulo II](#).

7.2.6. Colonização *in vitro* de *Pleurotus ostreatus*

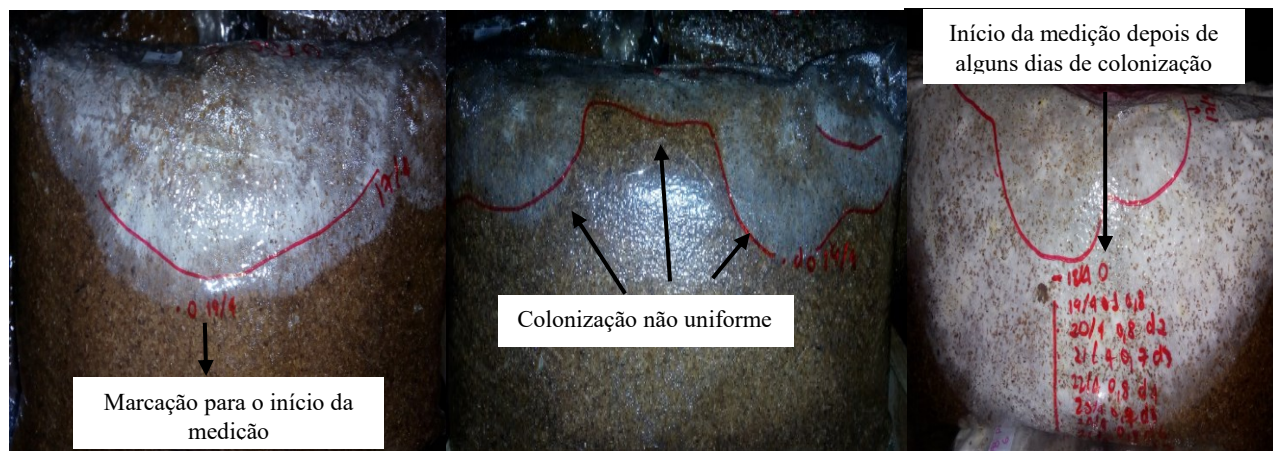
Para verificar se a umidade foi um fator limitante na colonização do substrato pelo fungo, foi realizado um teste *in vitro* de colonização do substrato. Para isso, foram utilizados tubos de ensaio furados de 20 cm de largo e 2,5 cm de diâmetro. Os tubos foram preenchidos com o mesmo substrato utilizado nos experimentos de frutificação e esterilizados por 121 °C durante 20 min. Depois do esfriamento a temperatura ambiente, os tubos foram inoculados com 10 cápsulas por tratamento.

7.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.3.1 Colonização

Durante a colonização foram observadas algumas diferenças na velocidade de crescimento micelial, assim como algumas características morfológicas do micélio. A colonização não correu de forma uniforme, o que dificultou a mensuração da velocidade de colonização. Em alguns casos, o início da medição só foi possível depois de alguns dias do início da colonização (Fig. 7.5).

Figura 7.9 – Crescimento micelial de *Pleurotus ostreatus* em substrato comercial inoculado com inoculante em cápsulas de alginato de sódio.



Fonte: o autor (2020)

Apesar de todos os tratamentos terem sido inoculados no mesmo dia, os blocos de substrato atingiram 100% de colonização em semanas diferentes (Fig. 7.6). Por conta disso, uma parcela dos blocos de substrato permaneceu mais tempo que outros na sala de incubação até atingir 100% de colonização, condição necessária para a indução da frutificação. Foi observado que as replicatas que estavam localizadas nas prateleiras mais próximas do ar condicionado (utilizado para manter

Figura 7.11 – Diferenças na colonização dos blocos de substrato inoculados com *Pleurotus ostreatus*.



estável a temperatura da sala de incubação) demoraram mais tempo para colonizar a totalidade do substrato.

Fonte: o autor (2020)

As esferas utilizadas no experimento para encapsular o fungo são compostas por gel de alginato à base de água. Portanto, é normal se desidratarem ao longo do tempo. Porém, a proximidade com o fluxo gerado pelo ar condicionado pôde ter acelerado o processo de desidratação, dificultando, portanto, a ocupação do substrato pelo fungo. Esta desidratação foi constatada pelo aparecimento de gotículas de condensação ao redor do local de inoculação dentro dos blocos de substrato, que por sua vez dificultou a mensuração do crescimento miceliano (Fig 7.7). Apesar da impossibilidade de mensurar a totalidade dos blocos, os dados obtidos não mostraram diferenças significativas entre os tratamentos (dados não apresentados).

Na parte superior do substrato, onde as capsulas foram inoculadas, é possível observar que houve desidratação do substrato, o que foi constatado por uma aparência mais seca (Fig. 7.7). Isso pode ter acentuado a dificuldade do fungo em colonizar o substrato. A falta de água pode limitar a velocidade de crescimento do micélio e o excesso pode desencadear doenças causadas por outros

microrganismos. A Lei do mínimo de Leibig, geralmente usada na agricultura, estabelece que o desenvolvimento de um sistema pode falhar quando um dos fatores críticos escasseia, mesmo que os outros elementos estejam presentes. Por isso, o balanço no teor de umidade no substrato é considerado um fator crítico no cultivo de fungos comestíveis (LIEBIG, 1840; MOORE *et al.*, 2011; ALBERTÓ, 2008).

Figura 7.12 – Condensação de vapor de água observado nos blocos de substrato.



Fonte: o autor (2020)

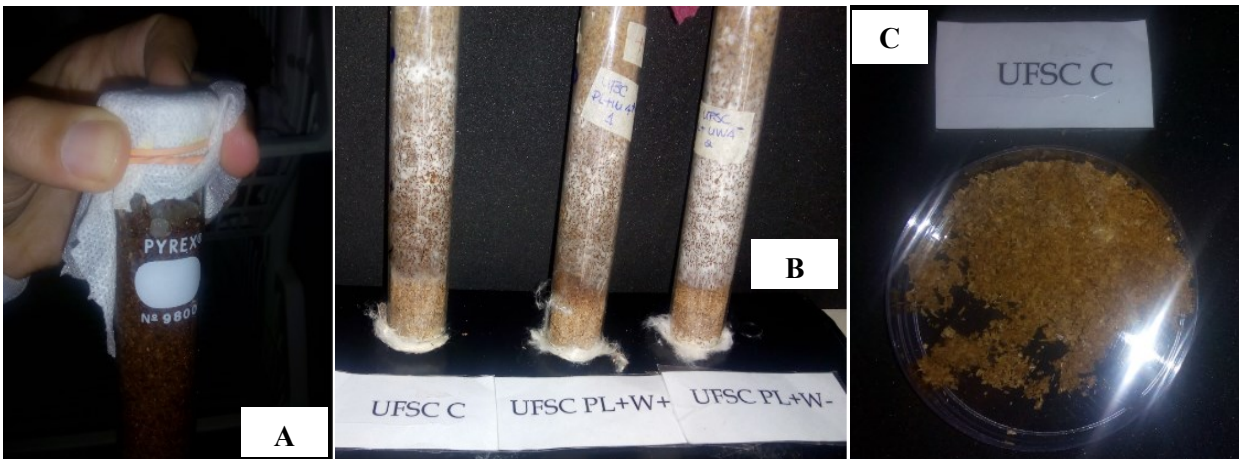
7.3.2. Colonização *in vitro* de *Pleurotus ostreatus*

Na avaliação do crescimento miceliano de *P. ostreatus* em tubos de ensaio, foi constatado que apesar do fungo conseguir colonizar superficialmente o substrato, a colonização não foi efetiva no interior do substrato (Fig. 7.8).

Em alguns casos, o atraso na colonização promoveu o aparecimento de contaminações fúngicas de coloração verde no substrato (Fig. 7.9). Os blocos que apresentavam contaminação foram descartados imediatamente e retirados da sala de incubação para evitar a contaminação cruzada dos blocos remanescentes. No total, 6 blocos de um total de 70 blocos se contaminaram, representando 8% de contaminação, percentual que está dentro do limite admitido pela empresa para a produção de *P. ostreatus*. Os principais fungos contaminantes em cultivos de *P. ostreatus* e que são uma grande ameaça para sua produção comercial são *Trichoderma pleorotum* e *Trichoderma pleuroticola*, que causam manchas verdes no composto (MOORE *et al.*, 2011). *Penicillium digitatum* é outro contaminante que acomete produções de *P. ostreatus* e é encontrado crescendo

no substrato em regiões não colonizadas pelo fungo, especialmente onde falta água (ESPOSITO & AZEVEDO, 2010).

Figura 7.13 – Teste in vitro de colonização de *Pleurotus ostreatus*. A. Cápsulas de *Pleurotus ostreatus* inoculadas em substrato comercial em tubos de ensaio; B. Crescimento miceliano de cápsulas de *Pleurotus ostreatus* em tubos de ensaio; C. Amostra de substrato extraída dos tubos de ensaio.



Fonte: o autor (2020)

Figura 7.15 – Contaminação dos blocos de substrato de produção de *Pleurotus ostreatus*.



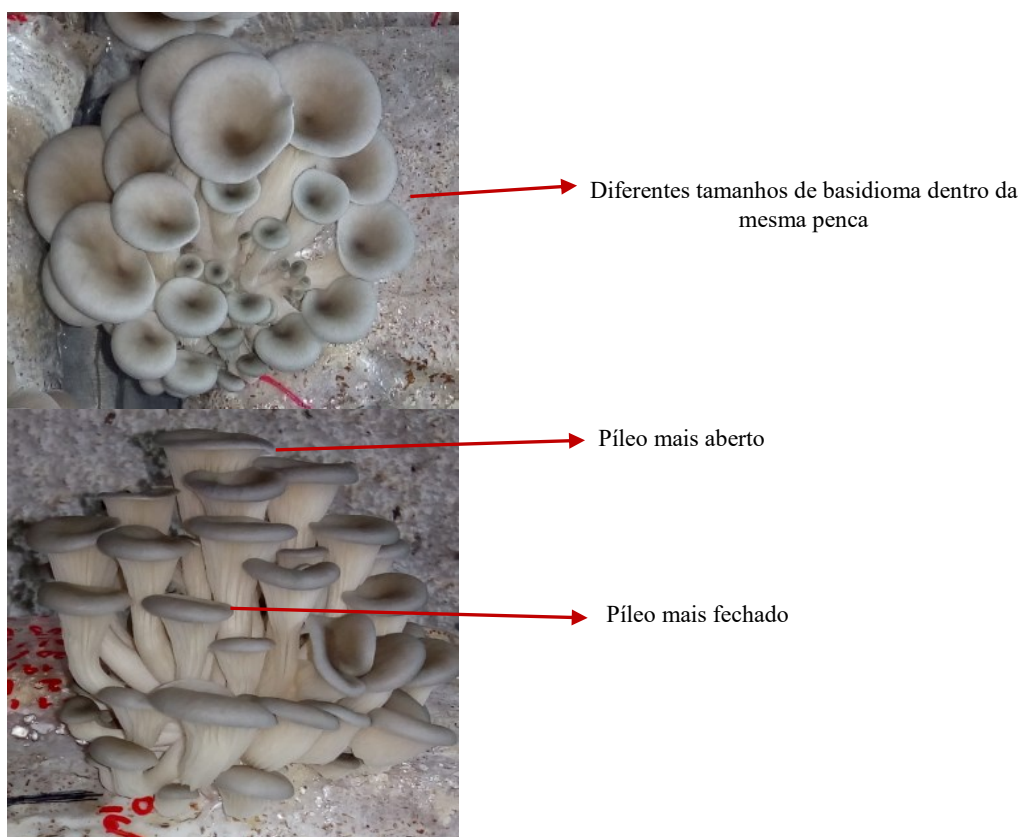
Fonte: o autor (2020)

7.3.3 Frutificação

O peso úmido do substrato de produção foi determinado com o intuito de se obter o rendimento de *P. ostreatus* por bloco. Para as colheitas, foi usado como critério o estágio *shimeji* descrito na metodologia. Porém, nem sempre todos os basidiomas da penca de cogumelo apresentaram o mesmo estágio de desenvolvimento (Fig. 7.10) e, às vezes, foram observados basidiomas de tamanhos diversos e ainda imaturos para colher. Assim, foi decidido realizar a colheita quando mais de 50% dos basidiomas cumprisse com os critérios definidos.

Tipicamente, uma produção comercial de *P. ostreatus* apresenta vários ciclos de produção, descritos na literatura como fluxos (ESPOSITO & AZEVEDO, 2010).

Figura 7.16 – Diferentes estágios de basidiomas de *Pleurotus ostreatus*.



Fonte: o autor (2020)

Os basidiomas obtidos nos primeiros ciclos são de tamanho grande, com consistência firme e com maior vida de prateleira. Já os basidiomas dos últimos fluxos têm menor tamanho e, por conseguinte, menor peso, com consistência menos firme. Por isso, o pico máximo de produção é

alcançado normalmente depois das primeiras induções, produzindo aproximadamente de 60% a 80% da produção total.

Entre as induções, os blocos apresentam um período de tempo chamado de “descanso” ou “recuperação” que varia entre 8 a 10 dias, caracterizado pela ausência de primórdios onde o micélio se nutre novamente para dar lugar a novas frutificações. Por isso, muitos produtores consideram a produção de cogumelo obtida nas primeiras induções como a mais importante em termos econômicos. Alguns produtores chegam até a descartar os blocos colonizados após a terceira indução para abrir espaço para blocos mais jovens (ALBERTÓ, 2008).

Porém, distinto do observado em condições de laboratório, não foi possível observar diferenças entre os tratamentos quando foram analisados os dados resultantes da primeira e segunda indução. Este fato deve-se, provavelmente, ao comportamento atípico observado na etapa de colonização e frutificação evidenciado pela alta variabilidade nos dados: as replicatas dos tratamentos mostraram tempos diferentes de indução da frutificação devido ao atraso na colonização. Como consequência, as colheitas foram realizadas (em alguns casos) em semanas diferentes, provocando o deslocamento do início da frutificação para cada replicata. Durante a fase de frutificação, os blocos produziram basidiomas fora dos intervalos de tempo estabelecidos como ciclos de produção, às vezes com atraso no surgimento dos primórdios ou desenvolvimento de basidiomas nos tempos considerados de descanso.

Tal deslocamento levou à extensão do tempo de colheita, que foi além do considerado viável economicamente pela empresa (6-8 semanas). Porém, esta manobra foi necessária desde um ponto de vista biológico para coletar os basidiomas dos tratamentos que sofreram atraso na frutificação. Assim, o tempo total de todos os ciclos de colheita se estendeu por até 14 semanas para alguns tratamentos.

Outro aspecto importante que contribuiu à variabilidade dos dados foram as condições ambientais próprias do galpão de frutificação, já que por ser um espaço sem temperatura controlada, esteve sujeito a variações de temperatura sazonais, correntes de ar e concentrações variáveis de CO₂, fatores considerados importante na frutificação de cogumelos. Estas variações foram evidentes na análise estatística dos dados, onde foi verificado que as variâncias entre os tratamentos não foram homogêneas.

Para contornar a alta variabilidade dos dados, os resultados foram processados usando a função box plot do software ACTION para detectar possíveis *outliers*. Da mesma forma, os dados

foram analisados usando vários modelos estatísticos para conseguir um melhor ajuste dos dados. Apesar dos dados apresentarem uma distribuição normal (teste Shapiro-Wilk), as variâncias entre os tratamentos foram heterogêneas, sendo, portanto, necessário usar testes não paramétricos, usados quando o pressuposto da homocedasticidade entre as variâncias não se cumpre. O teste utilizado foi o de Kruskal-Wallis com o auxílio do software SigmaPlot, adotando um nível de significância de 5%. Este teste é uma alternativa ao teste paramétrico de análise de variância (ANOVA) de fator único, e possui a mesma eficácia em relação ao teste F, sendo adequado quando se deseja comparar três ou mais populações (LEVINE *et al.*, 2012).

Assim como na ANOVA, o Kruskal-Wallis também permite realizar uma comparação múltipla entre os diferentes grupos para determinar exatamente quais tratamentos são diferentes. Neste caso, foi utilizado o pós-teste de Dunn, que permite realizar uma comparação entre todos os pares de tratamento. Considerando que o Kruskal-Wallis utiliza as medianas para realizar as comparações, a tabela 7.2 apresenta, além das medianas, as médias “verdadeiras” do rendimento de cogumelo, assim como os valores ranqueados correspondentes.

Tabela 7.2 –Rendimento e eficiência biológica de *Pleurotus ostreatus* cultivado em condições comerciais.

Tratamento	RENDIMENTO TOTAL g/kg				EFICIÊNCIA BIOLÓGICA%			
	* ¹ Média verdadeira	Mediana	* ² IQ Mediana		* ¹ Média verdadeira	Mediana	* ² IQ Mediana	
			25%	75%			25%	75%
UW4+	225,42±25,54	228,33	210,42	246,67	60,92±6,90	61,71	56,87	66,67
MAB3	222,41±22,28	216,67	205,00	236,67	60,11±6,02	58,56	55,40	63,96
PL+UW4+	214,52±7,12	211,67	208,33	223,33	57,98±1,92	57,21	56,31	60,36
PL3	211,88±11,21	209,17	202,92	220,42	57,26±3,03	56,53	54,84	59,57
Controle	180,19±30,68	181,67	154,12	206,67	48,70±8,29	49,01	41,67	55,86

*Valores apresentados em ordem decrescente. ¹média verdadeira ±desvio padrão; ²Intervalo Interquartil pelo teste Kruskal-Wallis (H= 12,36 com 4 graus de liberdade, valor $p= 0,015$)

Fonte: o autor (2020)

O valor p (0,015) resultado do teste indica que existe diferença estatística entre os tratamentos. A tabela 7.3 apresenta o resultado da comparação múltipla realizada pelo teste de Dunn após o teste de Kruskal-Wallis para determinar as diferenças entre os tratamentos.

Como mostra a tabela 7.3, os tratamentos que se mostraram estatisticamente diferentes do controle foram o tratamento UW4+ e MAB3. Os demais tratamentos não mostraram diferenças com o controle nem entre eles. Uma característica em comum entre os tratamentos UW4+ e MAB3

é a presença do gene *acdS* nas duas bactérias (*P. putida* e *P. palleroriana*, respectivamente). A bactéria *P. putida* se mostrou efetiva em melhorar o rendimento do fungo nos experimentos realizados em nível de laboratório (capítulo II).

Tabela 7.3 – Comparação estatística das médias ranqueadas dos rendimentos e eficiência biológica de *Pleurotus ostreatus* pelo teste não paramétrico de Dunn.

Comparação entre os tratamentos	¹ Diferença de rankings	Estatística Q	P<0,05
UW4+ vs controle	18,236	3,133	Sim
UW4+ vs PL3	8,750	1,461	Não
UW4+ vs PL+UW4+	5,339	0,861	Não
UW4+ vs MAB3	2,292	0,394	Não
MAB3 vs controle	15,944	2,824	Sim
MAB3 vs PL3	6,458	1,110	Não
MAB3 vs PL+UW4+	3,048	0,505	Não
PL+UW4+ vs controle	12,897	2,136	Não
PL+UW4+ vs PL3	3,411	0,550	Não
PL3 vs controle	9,486	1,630	Não

¹Pares de valores com “sim” diferem entre si pelo teste de comparação múltipla de Dunn

Fonte: o autor (2020)

Diferente dos experimentos em laboratório, sob condições comerciais, além da bactéria ser encapsulada juntamente com o fungo (tratamento PL+UW4+), também foi inoculada de forma livre ao substrato, ou seja, em suspensão (tratamento UW4+). De acordo com as análises estatísticas, o tratamento PL+UW4+ não foi diferente do tratamento UW4+ nem do controle, o que sugere que em relação ao controle, a forma de veiculação das bactérias (de forma livre em suspensão ou encapsulada previamente junto com o fungo) teve uma influência significativa no efeito da bactéria sobre a frutificação do fungo, sendo melhor co-inocular o fungo com a bactéria em forma de suspensão. Embora as duas formas de veiculação não tenham mostrado diferença significativa entre elas, o melhor resultado do tratamento UW4+ sugere que sob as condições ambientais do experimento, a bactéria interagiu melhor com o fungo quando esta foi adicionada em suspensão.

Esta hipótese é reforçada pelo fato que as cápsulas sofreram uma desidratação considerável durante a incubação do substrato, o que pode ter prejudicado em certo grau o efeito benéfico da bactéria. Desde o ponto de vista comercial, adicionar a bactéria em forma livre implicaria uma fase

adicional no processo, diferente de empregar um inoculante com efeito simbiótico em que a bactéria e o fungo são veiculados na mesma cápsula, o que facilitaria a inoculação em escala comercial. Considerando que os tratamentos UW4+ e PL+UW4+ contém a mesma bactéria, uma alternativa que permitiria usar o inoculante obtendo melhores resultados seria utilizar mais quantidade de inoculante por substrato para compensar a desidratação das cápsulas durante a incubação. No caso do tratamento MAB3 que também diferiu do controle, a bactéria também foi adicionada de forma livre, o que biologicamente, e sob as condições avaliadas, parece ser mais vantajoso.

A bactéria *P. palleroriana* MAB3 também possui no seu genoma o gene *acdS*, sendo identificada como uma bactéria promotora do crescimento em plantas e cogumelos em testes de laboratório (URÓN *et al.*, 2018) reforçando o papel da enzima ACC deaminase na frutificação de *P. ostreatus*. Pelo contrário, quanto ao tratamento PL3, não foram observadas diferenças significativas em relação ao controle ou a os outros tratamentos. Este tratamento, diferentemente dos outros, contém uma bactéria sem atividade ACCD.

Assumindo que os efeitos observados nos tratamentos que diferiram estatisticamente do controle são devidos ao gene *acdS*, a ausência de diferenças no tratamento PL3 em relação ao controle poderia ser devido à ausência do gene.

O aumento observado no rendimento de *P. ostreatus* com as bactérias *P. putida* UW4 (tratamento UW4+) e *P. palleroriana* MAB3 (tratamento MAB3) comparado ao tratamento controle (Tabela 7.2), representa um aumento na produção de 25% e 23%, respectivamente. Esse percentual se traduziria em 250 g e 230 g de cogumelo a mais por cada kg de substrato, respectivamente. Em termos comerciais, para a produção atual da *Fungi Brasilis*, em que são produzidos 1200 blocos de substrato (semanalmente) de 1200 g cada (1440 kilos de substrato), os aumentos no rendimento de cogumelo obtidos no experimento significariam 360 kg de cogumelo a mais por semana para o tratamento UW4+, e 331 kg de cogumelo a mais por semana para o tratamento MAB3.

Usando o cálculo da eficiência biológica (Tabela 7.2) é possível deduzir que a capacidade de conversão do substrato em biomassa por parte de *P. ostreatus* aumentou em mais de 20% quando foi co-cultivado com as bactérias com atividade ACCD, mostrando que este tipo de bactéria auxilia o fungo a aproveitar de forma mais eficiente os nutrientes disponíveis.

Os resultados deste trabalho trazem uma contribuição importante para o setor produtivo de cogumelos já que a maioria dos estudos sobre a influência de bactérias no desenvolvimento de fungos têm sido conduzidos *in vitro*, usando o micélio dos fungos. Young e colaboradores (2013) afirmam que nem sempre resultados positivos no crescimento vegetativo significam uma melhor frutificação na fase produtiva.

Embora menos estudada em relação a *A. bisporus*, a interação de *P. ostreatus* com bactérias do gênero *Pseudomonas* e outros gêneros como *Bacillus* e *Bradyrhizobium* também tem sido relatada (CHO *et al.*, 2003; CARRASCO & PRESTON, 2020). Porém, não existem trabalhos até hoje sobre o efeito de bactérias com atividade ACCD na frutificação de cogumelos em nível comercial. Neste trabalho tem sido possível demonstrar não só o efeito das bactérias sob condições sazonais, mas conseguiu-se quantificar a produção de cogumelos, o que é fundamental para o setor produtivo.

7.4 CONCLUSÕES

Os resultados deste trabalho mostram, de forma inédita, que bactérias com atividade ACCD como *P. putida* UW4 *acdS*⁺ e *P. palleroriana* MAB3, têm efeitos positivos na frutificação de *P. ostreatus* cultivado comercialmente, mostrando o potencial deste tipo de bactérias para melhorar o rendimento do cultivo de cogumelos.

A inoculação de *P. ostreatus* com bactérias com atividade ACCD aumentou a produção de cogumelos de forma significativa mostrando que o uso de bactérias poderia trazer benefícios econômicos para um cultivo comercial.

O inoculante em gel de alginato é uma alternativa ao inoculante tradicional que facilita encapsular consórcios de microrganismos benéficos. Esta opção mostrou resultados positivos nos experimentos de laboratório, porém, para cultivo comercial, é necessário empregar maior quantidade de inoculante por kg de substrato para evitar o ressecamento das cápsulas.

A inoculação líquida de bactérias no substrato de crescimento de *P. ostreatus* se mostrou biologicamente efetiva para a promoção da frutificação do fungo. Porém, comercialmente, a adição das bactérias implicaria um passo adicional à rotina de inoculação.

REFERÊNCIAS

- AHLAWAT, Op *et al.* Effect of 'Azotobacter' and 'Phosphotika' biofertilizers on the spawn-run, pinning and yield of the white button mushroom (*Agaricus bisporus*). **Mushroom Research**, [s. l.], v. 6, n. 2, p. 69-74, 1997. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/343500043_Effect_of_'Azotobacter'_and_'Phosphotika'_biofertilizers_on_the_spawn-run_pinning_and_yield_of_the_white_button_mushroom_Agaricus_bisporus. Acesso em: 15 jan. 2021.
- ALBERTÓ, Edgardo. **Cultivo intenseivo de los hongos comestibles**. Buenos Aires: Editorial Hemisferio Sur S.A., 2008. 265 p.
- CARLILE, Michael *et al.* **The Fungi**. 2. ed. Grã Bretanha: Academic Press, 2001. 608 p.
- CARRASCO, Jaime *et al.* Growing edible mushrooms: a conversation between bacteria and fungi. **Environmental Microbiology**, [S.L.], v. 22, n. 3, p. 858-872, 9 set. 2019. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/1462-2920.14765>.
- CHEN, Shichang *et al.* Effect of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase producing bacteria on the hyphal growth and primordium initiation of *Agaricus bisporus*. **Fungal Ecology**, [S.L.], v. 6, n. 1, p. 110-118, fev. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.funeco.2012.08.003>.
- CHO, Yong-Sup *et al.* Growth promotion of the edible fungus *Pleurotus ostreatus* by fluorescent *pseudomonads*. **Fems Microbiology Letters**, [S.L.], v. 218, n. 2, p. 271-276, jan. 2003. Oxford University Press (OUP). [http://dx.doi.org/10.1016/s0378-1097\(02\)01144-8](http://dx.doi.org/10.1016/s0378-1097(02)01144-8).
- CHO, Young Sub *et al.* Effect of Casing Layer on Growth Promotion of the Edible Mushroom *Pleurotus ostreatus*. **Mycobiology**, [S.L.], v. 36, n. 1, p. 40-44, 2008. Mycobiology (KAMJE). <http://dx.doi.org/10.4489/myco.2008.36.1.040>.
- CURTO, S.. Stimulative Effect of Certain Micro-Organisms (Bacteria, Yeasts, Microalgae) upon Fruit-Body Formation of *Agaricus bisporus* (Lange) Sing. **The International Society For Mushroom Science**, Estados Unidos, v. 8, n. 8, p. 327-345, 1972.
- DELUCCA, Anthony J. *et al.* The use of bacterial alginates to prepare biocontrol formulations. **Journal of Industrial Microbiology**, [S.L.], v. 6, n. 2, p. 129-134, out. 1990. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/bf01576432>.
- EGER, G.. Experiments and Comments on the Action of Bacteria on Sporophore Initiation in *Agaricus bisporus*. **The International Society for Mushroom Science**, Estados Unidos, v. 8, n. 71, p. 327-345, 1972.
- EIRA, Augusto Ferreira da *et al.* FUNGOS COMESTÍVEIS. In: ESPOSITO, Elisa; AZEVEDO, João Lúcio de. **Fungos uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. 2. ed. Caxias do Sul: Editora da Universidade de Caxias do Sul, 2010. Cap. 12. p. 379-448.

ESPOSITO, Elisa; AZEVEDO, João Lúcio de (org.). **Fungos uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. 2. ed. Caxias do Sul: Editora da Universidade de Caxias do Sul, 2010. 638 p.

EYINI, M. *et al.* Effect of '*Azotobacter*' Bioinoculant on the Growth and Substrate Utilization Potential of *Pleurotus* Seed Spawn. **Mycobiology**, [S.L.], v. 33, n. 1, p. 19-22, 2005. Mycobiology (KAMJE). <http://dx.doi.org/10.4489/myco.2005.33.1.019>.

GREWAL, S. I. S. *et al.* Phenotypic variation of *Pseudomonas putida* and *P. tolaasii* affects the chemotactic response to *Agaricus bisporus* mycelial exudate. **Journal of General Microbiology**, [S.L.], v. 137, n. 12, p. 2761-2768, 1 dez. 1991. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/00221287-137-12-2761>.

HAYES, W. A. *et al.* The nature of the microbial stimulus affecting sporophore formation in *Agaricus bisporus* (Lange) Sing. **Annals of Applied Biology**, [S.L.], v. 64, n. 1, p. 177-187, ago. 1969. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1744-7348.1969.tb02867.x>.

KERTESZ, Michael A. *et al.* Compost bacteria and fungi that influence growth and development of *Agaricus bisporus* and other commercial mushrooms. **Applied Microbiology And Biotechnology**, [S.L.], v. 102, n. 4, p. 1639-1650, 23 jan. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-018-8777-z>.

KIM, Min Keun *et al.* Effect of *Pseudomonas* sp. P7014 on the growth of edible mushroom *Pleurotus eryngii* in bottle culture for commercial production. **Bioresource Technology**, [S.L.], v. 99, n. 8, p. 3306-3308, maio 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2007.06.039>.

INDEX, Fungorum. **Indexfungorum**. 2021. Disponível em: <http://www.indexfungorum.org/Names/Names.asp?pg=2>. Acesso em: 12 jan. 2021.

LEVINE, David. **Estatística: Teoria e Aplicações**. 6. ed. Rio de Janeiro: Ltc Livros Técnicos e Científicos Editora, 2012. 811 p.

LIEBIG, Justus *et al.* Die organische Chemie in ihrer Anwendung auf Agricultur und Physiologie / von Justus Liebig ... **Agricultural Chemistry**, [S.L.], p. 1803-1873, 1841. F. Vieweg,. <http://dx.doi.org/10.5962/bhl.title.42117>.

LOCKHARD, John David. **An Investigation of the Metabolic Gases Produced by the Cultivated Mushroom "*Agaricus Bisporus*" (Lange) Sing**. Estados Unidos: John David Lockhard, 1962. 156 p.

MILLER, N. *et al.* The involvement of microbiological components of peat based casing materials in fructification of *Agaricus bisporus*. **The International Society of Mushroom Science**, Estados Unidos, v. 14, n. 38, p. 327-345, 1995.

MOORE, David. **Twentieth Century Guidebook to Fungi**. Reino Unido: Cambridge University Press, 2011. 627 p

NOBLE, Ralph *et al.* Volatile C8 compounds and *pseudomonads* influence primordium formation of *Agaricus bisporus*. **Mycologia**, [S.L.], v. 101, n. 5, p. 583-591, set. 2009. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.3852/07-194>.

PARK, J. Y. *et al.* Bacterial Metabolites trigger Sporophore Formation in *Agaricus bisporus*. **Nature**, [S.L.], v. 222, n. 5197, p. 984-984, jun. 1969. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/222984a0>.

RAINEY, P.B. *et al.* A model system for examining involvement of bacteria in basidiome initiation of *Agaricus bisporus*. **Mycological Research**, [S.L.], v. 94, n. 2, p. 191-195, mar. 1990. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0953-7562\(09\)80612-6](http://dx.doi.org/10.1016/s0953-7562(09)80612-6).

RAINEY, P.B. *et al.* Effect of *Pseudomonas putida* on hyphal growth of *Agaricus bisporus*. **Mycological Research**, [S.L.], v. 95, n. 6, p. 699-704, jun. 1991. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0953-7562\(09\)80817-4](http://dx.doi.org/10.1016/s0953-7562(09)80817-4).

RUSSO, A. *et al.* Improved delivery of biocontrol *Pseudomonas* and their antifungal metabolites using alginate polymers. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [S.L.], v. 44, n. 6, p. 740-745, fev. 1996. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/bf00178612.745>.

SAHARAN, Bs *et al.* Plant Growth Promoting Rhizobacteria: A Critical Review. **Life Sciences and Medicine Research**, [s. l], v. 2011, p. 1-30, 2011.

URÓN, Paola *et al.* Near-Complete Genome Sequence of *Pseudomonas palleroniana* MAB3, a Beneficial 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate Deaminase-Producing Bacterium Able To Promote the Growth of Mushrooms and Plants. **Genome Announcements**, [S.L.], v. 6, n. 16, p. 16-18, 19 abr. 2018. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/genomea.00242-18>.

VIEIRA, F.R. *et al.* Exploring oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) substrate preparation by varying phase I composting time: changes in bacterial communities and physicochemical composition of biomass impacting mushroom yields. **Journal of Applied Microbiology**, [S.L.], v. 126, n. 3, p. 931-944, 27 dez. 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/jam.14168>.

WARD, T. *et al.* Evidence for the Production of Ethylene by the Mycelium of *Agaricus bisporus* and its Relationship to Sporocarp Development. **Journal of General Microbiology**, [S.L.], v. 104, n. 1, p. 23-30, 1 jan. 1978. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/00221287-104-1-23>.

YOUNG, Li-Sen *et al.* Cultivable mushroom growth-promoting bacteria and their impact on *Agaricus blazei* productivity. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, [S.L.], v. 48, n. 6, p. 636-644, jun. 2013. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-204x2013000600009>.

ZARENEJAD, F. *et al.* Evaluation of indigenous potent mushroom growth promoting bacteria (MGPB) on *Agaricus bisporus* production. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, [S.L.], v. 28, n. 1, p. 99-104, 10 jun. 2011. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11274-011-0796-1>.

ZHANG, Chaohui *et al.* Downregulation of Ethylene Production Increases Mycelial Growth and Primordia Formation in the Button Culinary-Medicinal Mushroom, *Agaricus bisporus*

(Agaricomycetes). **International Journal of Medicinal Mushrooms**, [S.L.], v. 18, n. 12, p. 1131-1140, 2016. Begell House. <http://dx.doi.org/10.1615/intjmedmushrooms.v18.i12.80>.

ZHANG, Chaohui *et al.* *Pseudomonas* sp. UW4 *acdS* gene promotes primordium initiation and fruiting body development of *Agaricus bisporus*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, [S.L.], v. 35, n. 11, p. 21-35, 21 out. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11274-019-2741-7>.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Este trabalho relata, de forma inédita, o efeito de bactérias com atividade ACC deaminase (ACCD) na frutificação de *Pleurotus ostreatus*. O efeito positivo de bactérias contendo o gene *acdS* sugere que o mecanismo de promoção da frutificação do fungo, está relacionado diretamente com a atividade ACCD. Da mesma forma, a redução dos níveis de etileno observados quando o fungo foi co-inoculado com *Pseudomonas putida* UW4 *acdS*⁺ junto com a maior produção de etileno do fungo quando foi inoculado com (ACC), indica que provavelmente a via de produção de etileno utilizada pelo fungo é dependente de ACC. Esses resultados são um ponto de partida importante para elucidar a via de biossíntese de etileno em *P. ostreatus*, porém, são necessários experimentos adicionais e análises moleculares que corroborem, nesse fungo, a presença de enzimas envolvidas na síntese de ACC.

Neste sentido, recomenda-se a condução de estudos complementares que mensurem o etileno produzido por cogumelos de *P. ostreatus* co-cultivado com bactérias com ACCD. Desta forma, poderia se esclarecer se alguns efeitos inibitórios para a frutificação de *P. ostreatus* estão associados à produção de etileno e se a promoção da frutificação é devida exclusivamente à presença do gene *acdS*.

Os resultados oriundos deste trabalho são promissores para serem empregados na produção comercial de cogumelos visando aumentar a produtividade do cultivo de diversas espécies com potencial biotecnológico. O resultado positivo da bactéria *Pseudomonas palleroriana* MAB3 demonstra que bactérias isoladas dos cogumelos podem apresentar efeitos benéficos para o crescimento dos mesmos. Portanto, o potencial de outras espécies de bactérias com atividade ACCD poderiam ser avaliadas em co-cultivo com *P. ostreatus* e outros fungos comestíveis de interesse comercial.

Finalmente, é importante destacar que este trabalho abriu a possibilidade de estudar as associações benéficas entre fungos e bactérias dentro de um âmbito real como é o cultivo comercial de cogumelos o que permitiu ter dados de rendimento e produtividade que são úteis para o setor produtivo. Neste sentido, a tecnologia de encapsulamento de microrganismos empregando alginato de sódio representa uma alternativa biotecnológica de baixo custo que poderia ser implementada em nível comercial. No entanto, por se tratar de um material à base de água que pode sofrer de desidratação ao longo do tempo, fatores como a quantidade de cápsulas por substrato e condições ambientais durante a incubação dos blocos de produção devem ser analisados.