

UFRRJ

**INSTITUTO DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
AGRONOMIA CIÊNCIA DO SOLO**

TESE

**Influência das Características Estruturais e da Fonte
da Matéria Orgânica Humificada no Crescimento e
Desenvolvimento dos Fungos Agaricomycetes em
Condições Controladas**

Thainá Louzada dos Santos

2022



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
CIÊNCIA DO SOLO**

**INFLUÊNCIA DAS CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS E DA FONTE
DA MATÉRIA ORGÂNICA HUMIFICADA NO CRESCIMENTO E
DESENVOLVIMENTO DOS FUNGOS AGARICOMYCETES EM
CONDIÇÕES CONTROLADAS**

THAINÁ LOUZADA DOS SANTOS

Sob a Orientação do Professor

Andrés Calderín García

e Coorientação do Professor

Orlando Carlos Huertas Tavares

Tese submetida como requisito parcial
para obtenção do grau de **Doutor(a)**, no
Programa de Pós-Graduação em
Agronomia, Área de Concentração em
Biologia do Solo.

Seropédica, RJ
Agosto de 2022

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central/Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
Com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S237i	<p>Santos, Thainá Louzada dos, 1982- Influência das características estruturais e da fonte da matéria orgânica humificada no crescimento e desenvolvimento dos fungos Thainá Louzada dos Santos. – Seropédica, 2022. 76 f. : il.</p> <p>Orientador: Andrés Calderín García. Tese (Doutorado). – – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Agronomia Ciência do Solo, 2022.</p> <p>1. Substâncias húmicas. 2. <i>Pleurotus eryngii</i>. 3. <i>Panus strigellus</i> (Berk.). 4. <i>Ganoderma lucidum</i>. 5. Caracterização química. I. García, Andrés Calderín, 1981-, orient. II Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós-Graduação em Agronomia-Ciência do Solo III. Título.</p>
-------	---

É permitida a cópia parcial ou total desta Tese, desde que seja citada a fonte.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal Nível Superior-Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA (CIÊNCIAS DO SOLO)



HOMOLOGAÇÃO DE TESE DE DOUTORADO Nº 21 / 2022 - CPGACS (12.28.01.00.00.00.27)

Nº do Protocolo: 23083.073650/2022-11

Seropédica-RJ, 01 de dezembro de 2022.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO

INSTITUTO DE AGRONOMIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA ? CIÊNCIA DO SOLO

THAINÁ LOUZADA DOS SANTOS

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutora**, no Programa de Pós-Graduação em Agronomia ? Ciência do Solo, Área de Concentração em Biologia do Solo.

TESE APROVADA EM 31/08/2022.

Andrés Calderín García. Dr. UFRRJ

(Orientador)

Ricardo Luiz Louro Berbara. Dr. UFRRJ

Paulo Sergio Torres Brioso. Dr. UFRRJ

Camila Pinheiro Nobre. Dra. UEMA

Wallace Luís de Lima. Dr. IFES

(Assinado digitalmente em 01/12/2022 13:55)

ANDRES CALDERIN GARCIA
DeptS (12.28.01.00.00.00.33)
Matrícula: 1399485

(Assinado digitalmente em 01/12/2022 12:26)

PAULO SERGIO TORRES BRIOSO
PPGFBA (12.28.01.00.00.00.43)
Matrícula: 387274

(Assinado digitalmente em 02/12/2022 08:59)

RICARDO LUIZ LOURO BERBARA
DeptS (12.28.01.00.00.00.33)
Matrícula: 387406

(Assinado digitalmente em 01/12/2022 14:21)

CAMILA PINHEIRO NOBRE
CPF: 616.122.783-53

(Assinado digitalmente em 01/12/2022 12:22)

WALLACE LUÍS DE LIMA
CPF: 260.507.388-23

Visualize o documento original em <https://sipac.ufrj.br/public/documentos/index.jsp> informando seu número: **21**, ano: **2022**, tipo: **HOMOLOGAÇÃO DE TESE DE DOUTORADO**, data de emissão: **01/12/2022** e o código de verificação: **47f027d11e**

DEDICATÓRIA

Não poderia haver Outro a quem eu pudesse oferecer este trabalho senão a Deus que passa 24 horas comigo, que houve o mais tímido dos meus sussurros e fez cumprir em minha vida a seguinte palavra: “Não temas, porque sou contigo; não te assombres, porque sou o seu Deus; eu te fortaleço e te ajudo, e te sustento com a destra da minha justiça”. (Isaías 4. 1-10)

Ofereço

Ao meu avô Francisco Soares Louzada (in memorian) e meu pai José Duarte dos Santos Filho (in memorian) que sempre me mostraram que o trabalho dignifica o homem e que para ele ser completo, o homem, precisa trabalhar, estudar e lutar.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que está presente em todos os momentos da minha vida, iluminando minha jornada que por vezes se tornou árdua, mas ao meu lado Ele me deu força, esperança, saúde e coragem para enfrentar todos os obstáculos.

À minha mãe Eliane que é meu porto seguro e meu maior exemplo com sua humildade, paciência, sabedoria e palavras encorajadoras me incentivando nos momentos em que eu não acredito em mim e via a desistência como a melhor saída.

Aos meus irmãos Vinícius Eduardo e Victor Hugo, cunhada Olga Venimar e sobrinho Joel que sonham os meus sonhos se emocionando, vibrando e se orgulhando a cada conquista.

À todos os meus familiares que de alguma forma contribuíram para que este sonho se tornasse realidade.

A Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, que me ofereceu a oportunidade de realizar esse curso, e ao PPGA CS e a todos os professores que puderam contribuir para meu aprendizado. À CAPES, CNPQ, FAPERJ, FINEP PPGQ/ UFRRJ Centro Analítico Multiuso e PPGA-CS pelo apoio financeiro e institucional.

Ao Professor Dr Andrés Calderín Garcia pela orientação, incentivo, paciência, confiança e amizade, sempre solícito durante todo o trabalho.

Ao Dr Orlando Carlos Huertas Tavares pela coorientação e contribuição de seu conhecimento, paciência, confiança e ajuda em todas as dificuldades surgidas no decorrer do desenvolvimento do trabalho.

Ao meu braço direito, hijo e aluno de iniciação científica Samuel de Abreu Lopes, seu comprometimento e ajuda foram pilares para os meus experimentos e formação.

À Hellen Fernanda que ao longo dessa jornada se tornou uma irmã me fortalecendo e que muito contribuiu para minha formação profissional.

Aos amigos que do Laboratório de Química Biológica do Solo (LQBS), em especial Sael Sánchez Elías, Tadeu Augusto van Tol, Octavinho Vioratti, Débora Fernandes e Danielle França, que fizeram parte da minha jornada, pelos momentos divertidos, tristes, engraçados, estressantes que pudemos passar juntos e que nos fizeram crescer.

À amiga de longa data Lucilene Aparecida Arêdes da Conceição a qual todas as palavras não poderiam ser usadas para expressar todo o suporte psicológico e orientação pessoal e profissional que obtenho em nossas conversas.

Aos amigos que a pós-graduação me proporcionou, em especial Nirielle Rodrigues, Albiane Dias, Tamiris Aguiar e Nivaldo Sátiro com os quais compartilhei medos, anseios e aflições de nossas pesquisas e juntos alcançamos nossos objetivos.

À minha diretora Élide Lopes e aos amigos professores e funcionários do Colégio Estadual Nilo Peçanha, em especial, José Luís Guimarães, Lúcia Elena Guimarães, Maria Helena Mendes, Juliana Lucas, Ana Paula Naves, Roberto Lúcio, Taísa Canedo, Maria Tereza Carvalho, Carlos Henrique Lino, Rúbia Michaeli e Sidnéia Pereira, pela ajuda, amizade e carinho.

Ao grande amigo Gabriel Landim que me escuta, ajuda e compartilha do sacrifício e entrega para obter um título strictu sensu em concomitante trabalho na educação básica.

Aos funcionários da secretaria do PPGA CS, Marquinhos, Michele e Wagner pela atenção e gentileza.

RESUMO

SANTOS, Thainá Louzada dos. **Influência das características estruturais e da fonte da matéria orgânica humificada no crescimento e desenvolvimento dos fungos Agaricomycetes em condições controladas.** 2022. 76 f. Tese (Doutorado em Agronomia, Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2022.

Fungos agaricomycetes como: *Pleurotus eryngii*, *Panus strigellus* (Berk.) e *Ganoderma lucidum* possuem propriedades chave na natureza. Muitos são decompositores de substratos orgânicos ligno-celulósicos, outros tem propriedades medicinais e farmacológicas. Estes fungos são chave para a ciclagem de nutrientes, especialmente o carbono e nitrogênio orgânicos em diversos ecossistemas, e principalmente de clima tropical. No entanto, a relação entre a qualidade estrutural da matéria orgânica, especificamente os tipos de carbonos da matéria orgânica humificada e o crescimento de *Pleurotus eryngii*, *Panus strigellus* (Berk.) e *Ganoderma lucidum* é escassamente entendida. Esta tese teve como objetivo avaliar a relação entre o crescimento e desenvolvimento dos Agaricomycetes *P. eryngii*, *P. strigellus* (Berk.) e *G. lucidum* em duas fontes estruturalmente diferentes de matéria orgânica humificada bem caracterizadas. O crescimento e desenvolvimento (diâmetro micelial, corrida micelial, massa fresca e seca do micélio, densidade micelial e rendimento biológico) dos fungos foi avaliado em experimentos com aplicação em meio de cultura sólido de substâncias húmicas (SH) extraídas de vermicomposto (VC) e turfa. Ambas as SH foram caracterizadas mediante espectroscopia ^{13}C NMR CP/MAS aliado a quimiometria (análise de componentes principais - PCA e curva de resolução multivariada -MCR). As SH aplicadas ao fungo possuem características estruturais diferentes, onde as extraídas de VC possuem predomínio de C-alifáticos funcionalizados pertencentes a carboidratos, baixa hidrofobicidade e uma proporção de 90% de carbono celulose/hemicelulose na composição. Por outro lado, as SH extraídas de turfa possuem predomínio de C-aromáticos correspondentes a fragmentos lignínicos, maior hidrofobicidade e uma proporção de carbono lignínicos de até 80%. Os resultados mostraram que o crescimento de *Pleurotus eryngii*, *Panus strigellus* (Berk.) e *Ganoderma lucidum* é dependente do balanço C- celulósicos e C-lignínicos. As SH extraídas de turfa altamente lignínicas regulam o crescimento do fungo nos momentos iniciais e em outras ocasiões inibem o desempenho biológico. Contrariamente as SH de VC altamente celulósicas regulam o crescimento do fungo em momentos mais tardios assim como seu desempenho biológico. Nesta tese foram obtidos resultados que são importantes porque servem como base para compreender a relação existente entre os agaricomycetes e a qualidade da necromassa em ambientes tropicais. Ao mesmo tempo, esses resultados podem contribuir para melhorar a base dos substratos orgânicos na produção de cogumelos comestíveis e medicinais.

Palavras-chave: Substâncias húmicas. *Pleurotus eryngii*. *Panus strigellus* (Berk.). *Ganoderma lucidum*. Caracterização química. Substratos ligno-celulósicos.

ABSTRACT

SANTOS, Thainá Louzada dos. **Influence of structural characteristics and source of humified organic matter on the growth and development of Agaricomycetes fungi under controlled conditions.** 2022. 76 p. Thesis (Doctorate in Agronomy, Soil Science). Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, Brazil, 2022.

Agaricomycete fungi such as: *Pleurotus eryngii*, *Panus strigellus* (Berk.) and *Ganoderma lucidum* have key properties in nature. Many are decomposers of lignocellulosic organic substrates, others have medicinal and pharmacological properties. These fungi are key to the cycling of nutrients, especially carbon and organic nitrogen in different ecosystems, mainly in tropical climates. However, the relationship between the structural quality of organic matter, specifically the types of carbons in humified organic matter, and the growth of *Pleurotus eryngii*, *Panus strigellus* (Berk.) and *Ganoderma lucidum* is poorly understood. This thesis aimed to evaluate the relationship between the growth and development of the Agaricomycetes *P. eryngii*, *P. strigellus* (Berk.) and *G. lucidum* in two structurally different well-characterized sources of humified organic matter. The growth and development (mycelial diameter, mycelial run, fresh and dry mass of the mycelium, mycelial density and biological yield) of the fungi was evaluated in experiments with application in solid culture medium of humic substances (HS) extracted from vermicompost (VC) and peat. Both HS were characterized by ^{13}C NMR CP/MAS spectroscopy combined with chemometrics (principal component analysis -PCA and multivariate resolution curve -MCR). HS applied to the fungus have different structural characteristics, where those extracted from VC have a predominance of functionalized C-aliphatics belonging to carbohydrates, low hydrophobicity and a ratio of 90% carbon cellulose/hemicellulose in the composition. On the other hand, HS extracted from peat have a predominance of C-aromatics corresponding to ligninic fragments, greater hydrophobicity and a proportion of ligninic carbon of up to 80%. The results showed that the growth of *Pleurotus eryngii*, *Panus strigellus* (Berk.) and *Ganoderma lucidum* is dependent on C-cellulosic and C-lignin balance. The HS extracted from highly lignin peat regulate the growth of the fungus in the initial stages and at other times inhibit the biological performance. In contrast, the highly cellulosic VC HS regulate fungal growth at later times as well as its biological performance. In this thesis, results were obtained that are important because they serve as a basis for understanding the relationship between agaricomycetes and the quality of necromass in tropical environments. At the same time, these results can contribute to improve the base of organic substrates in the production of edible and medicinal mushrooms.

Keywords: Humic substances. *Pleurotus eryngii*. *Panus strigellus* (Berk.). *Ganoderma lucidum*. Chemical characterization. Lignocellulosic substrates.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Representação esquemática do processo de humificação e a importância da formação das substâncias húmicas e sua interação com os componentes do solo. Fonte: Aguiar et al., 2022. 4
- Figura 2.** Estrutura bidimensional proposta para os ácidos húmicos. Retirado de Filho e Silva, 2002. 5
- Figura 3.** Diferentes formas de nutrição de fungos. Fonte: Frank, 2019 (adaptado). 6
- Figura 4.** Os dez maiores países produtores de cogumelos, em toneladas/ano, no período de 2016-2017. Fonte: FAO (2019), adaptado por Martins, 2019. 17
- Figura 5.** Comparação dos valores de biomassa (a) calculados usando o teor de ergosterol (triângulos abertos), número de núcleos (triângulos sólidos), consumo diário de oxigênio (linha contínua) e produção diária de dióxido de carbono (linha tracejada) e atividade enzimática lignolítica (b) de lacases (círculos sólidos) e peroxidases não específicas (círculos abertos), conforme usado para avaliar o crescimento de *T. hirsuta* cultivado em silagem de milho por 14 dias a 28 °C (n = 5). Fonte: Steudler e Bley, 2015. 20
- Figura 6.** Cultivo de isolados de *Panus strigellus* em meios de cultura enzimático sólidos em cinco dias de crescimento micelial a 35°C. (A) crescimento micelial (cm/dia); (B) biomassa seca (g/placa). Os resultados representam a média de cinco repetições. Médias com a (s) mesma (s) letra (s) minúscula (s) não são significativamente diferentes entre os isolados e as médias com a (s) mesma (s) letra (s) maiúscula (s) não são significativamente diferentes entre meios de cultura enzimáticos (p <0,01) pelo teste de Tukey. Fonte: Vargas-Isla, 2012. 21
- Figura 7.** Estimativa da superfície resposta para biomassa. (A) pH variável e aeração em agitação constante de 160 rpm; (B) pH variável e agitação com aeração constante de 1,0 vvm; (C) aeração e agitação como variáveis e pH constante de 5,5; (D) valores de otimização para variável de resposta para biomassa. FONTE: Agudelo-Escobar et al., 2017. 22
- Figura 8.** Espectros ¹³C NMR característico de um ácido húmico extraído de um solo orgânico do estado de Rio de Janeiro, Brasil. Os picos foram assinalados de acordo com Keeler et al. (2006). Fonte: García et al., 2020. 24
- Figura 9.** Imagens dos cogumelos, A) *P. eryngii*; B) *P. strigellus*; e C) *G. lucidum*, obtidos na estufa do laboratório, sob condições de temperatura e umidade controladas e usadas para a obtenção dos isolados usados no experimento. 25
- Figura 10.** Imagens dos isolados de: A) *P. eryngii*; B) *P. strigellus*; e C) *G. lucidum* obtidos no laboratório e usados nos diferentes testes. 26
- Figura 11.** Características estruturais obtidas mediante espectroscopia de ressonâncias magnética nuclear em estado sólido (¹³C NMR CP/MAS) e quimiometria (análise de componentes principais -PCA) das substâncias húmicas aplicadas nos experimentos aos fungos *Pleurotus eryngii*, *Panus strigellus* e *Ganoderma lucidum*. A) Espectros ¹³C NMR CP/MAS das substâncias húmicas extraídas de turfa (R: são as 4 réplicas espectrais e M (cor marrom) representa o espectro médio) e a) expressa o conjunto espectral na forma de matriz de cores mostrando o contraste entre as estruturas. B) Espectros ¹³C NMR CP/MAS das substâncias húmicas extraídas de vermicomposto (R: são as 4 réplicas espectrais e M (cor marrom clara) representa o espectro médio) e b) expressa o conjunto espectral na forma de matriz de cores mostrando o contraste entre as estruturas. c) 27

Expressam os <i>loadings</i> , C e D) expressam os <i>scores</i> obtidos a partir da PCA- ¹³ C NMR dos espectros puros de turfa e vermicomposto, respectivamente.	33
Figura 12. Quantificação das estruturas e das propriedades químicas nas substâncias húmicas. A) Quantidade relativa de estruturas do carbono. B) Porcentagem de aromaticidade e alifaticidade nas substâncias húmicas e C) índice de hidrofobicidade.	34
Figura 13. Análise de curva de resolução multivariada (MCR) realizado a partir dos espectros puros de ¹³ C NMR CP/MAS. A) Componentes espectrais, linha azul: PC-1 e PC-2; linha vermelha e B) concentrações dos componentes.	35
Figura 14. Modelos estruturais para as SH extraídas de trufa (A) e de vermicomposto (C). as partes a1, a2 e c1, c2 são representações rotacionais das SH extraídas de turfa e vermicomposto respectivamente. B e b1 são aproximações ao núcleo-centro do modelo estruturas 10x e 45x a partir da apresentação padrão para as SH de turfa respectivamente. D e d1 são aproximações ao núcleo-centro do modelo estruturas 10x e 45x a partir da apresentação padrão para as SH de vermicomposto, respectivamente. Model: Random Seed: 290557; Number of building blocks: 100; Building blocks per mol.: 10; Number of Water Molecules: 200; Number of ions: 26 Na ⁺	36
Figura 15. Medição do diâmetro de crescimento micelial de <i>P. eryngii</i> com doses de substâncias húmicas de vermicomposto e turfa como fonte de carbono em meios de crescimento 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192 h após a inoculação.	38
Figura 16. Diâmetro do micélio de <i>P. eryngii</i> em função do tempo (24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192 h após a inoculação) dentro de cada nível (1, 2, 5, 7, 15, 35, 75, 125, 250, 500 mg SH L ⁻¹) de doses de substâncias húmicas de vermicomposto (VC) ou turfa (peat) + controle de BDA, como fonte de carbono em meios de cultura. Cada valor é expresso como média ± erro padrão (SE).	39
Figura 17. Área micelial de <i>P. eryngii</i> em função do tempo (48, 96, 144, 192 h após a inoculação) dentro de cada nível (1, 2, 5, 7, 15, 35, 75, 125, 250, 500 mg SH L ⁻¹) de dose de substâncias húmicas de vermicomposto (VC) ou turfa (peat) + controle de BDA, como fonte de carbono em meio de cultura. Cada valor é expresso como média ± erro padrão (SE).	40
Figura 18. Massa fresca de micélio de <i>P. eryngii</i> em função do tempo (48, 96, 144, 192 h após a inoculação) dentro de cada nível (1, 2, 5, 7, 15, 35, 75, 125, 250, 500 mg SH L ⁻¹) de doses de substâncias húmicas de vermicomposto (VC) ou turfa (peat) + controle de BDA, como fonte de carbono em meio de cultura. Comparação do teste de Dunnett com um controle (• p < 0,1, * p < 0,05). Cada valor é expresso como média ± erro padrão (SE).	41
Figura 19. Massa seca de micélio de <i>P. eryngii</i> em função do tempo (48, 96, 144, 192 h após a inoculação) dentro de cada nível (1, 2, 5, 7, 15, 35, 75, 125, 250, 500 mg SH L ⁻¹) de doses de substâncias húmicas de vermicomposto (VC) ou turfa (peat) + controle de BDA, como fonte de carbono em meio de cultura. Cada valor é expresso como média ± erro padrão (SE).	42
Figura 20. Densidade de micélio de <i>P. eryngii</i> em função do tempo (48, 96, 144, 192 h após a inoculação) dentro de cada nível (1, 2, 5, 7, 15, 35, 75, 125, 250, 500 mg SH L ⁻¹) de doses de substâncias húmicas de vermicomposto (VC) ou turfa (peat) + controle de BDA, como fonte de carbono em meios de cultura. Cada valor é expresso como média ± erro padrão (SE).	43
Figura 21. Eficiência biológica do micélio de <i>P. eryngii</i> em função do tempo (48, 96, 144, 192 h após a inoculação) dentro de cada nível (1, 2, 5, 7, 15, 35, 75, 125, 250, 500 mg SH L ⁻¹) de doses de substâncias húmicas vermicomposto (VC) ou turfa (peat) + controle de BDA, como fonte de carbono em meio de cultura. Cada valor é expresso como média ± erro padrão (SE).	44

- Figura 22.** PCA das variáveis massa fresca de micélio (FW), massa seca (DW), diâmetro (Diam), área, densidade e Eficiência biológica (YP), em *P. eryngii* 192h após a inoculação, em cada nível (1, 2, 5, 7, 15, 35, 75, 125, 250, 500 mg HS L⁻¹) de dosagem de substâncias húmicas de turfa (A) ou vermicomposto (B) + controle de BDA (PDA).45
- Figura 23.** Medição do diâmetro de crescimento micelial de *P. strigellus* (Berk.). Tratadas com doses de substâncias húmicas de vermicomposto e turfa como fonte de carbono em meios de crescimento 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216, 240 h após a inoculação.46
- Figura 24.** Diâmetro do micélio de *P. strigellus* (Berk.) em função do tempo (24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192 h após a inoculação) dentro de cada nível (1, 2, 5, 7, 15, 35, 75, 125, 250, 500 mg SH L⁻¹) de doses de substâncias húmicas de vermicomposto (VC) ou turfa (peat) + controle de BDA, como fonte de carbono em meios de cultura. Cada valor é expresso como média ± erro padrão (SE).47
- Figura 25.** Área de micélio de *P. strigellus* (Berk.). em função do tempo (48, 96, 144, 192 h após a inoculação) dentro de cada nível (1, 2, 5, 7, 15, 35, 75, 125, 250, 500 mg SH L⁻¹) de doses de substâncias húmicas de vermicomposto (VC) ou turfa (peat) + controle de BDA, como fonte de carbono em meio de cultura. Cada valor é expresso como média ± erro padrão (SE).48
- Figura 26.** Massa fresca de micélio de *Panus strigellus* (Berk.). em função do tempo (48, 96, 144, 192 h após a inoculação) dentro de cada nível (1, 2, 5, 7, 15, 35, 75, 125, 250, 500 mg SH L⁻¹) de doses de substâncias húmicas de vermicomposto (VC) ou turfa (peat) + controle de BDA, como fonte de carbono em meio de cultura. Cada valor é expresso como média ± erro padrão (SE).49
- Figura 27.** Massa seca de micélio de *Panus strigellus* (Berk.). em função do tempo (48, 96, 144, 192 h após a inoculação) dentro de cada nível (1, 2, 5, 7, 15, 35, 75, 125, 250, 500 mg SH L⁻¹) de doses de substâncias húmicas de vermicomposto (VC) ou turfa (peat) + controle de BDA, como fonte de carbono em meio de cultura. Cada valor é expresso como média ± erro padrão (SE).50
- Figura 28.** Densidade de micélio de *Panus strigellus* (Berk.). em função do tempo (48, 96, 144, 192 h após a inoculação) dentro de cada nível (1, 2, 5, 7, 15, 35, 75, 125, 250, 500 mg SH L⁻¹) de doses de substâncias húmicas de vermicomposto (VC) ou turfa (peat) + controle de BDA, como fonte de carbono em meios de cultura. Cada valor é expresso como média ± erro padrão (SE).51
- Figura 29.** Eficiência biológica do micélio de *P. strigellus* (Berk.). em função do tempo (48, 96, 144, 192 h após a inoculação) dentro de cada nível (1, 2, 5, 7, 15, 35, 75, 125, 250, 500 mg SH L⁻¹) de doses de substâncias húmicas vermicomposto (VC) ou turfa (peat) + controle de BDA, como fonte de carbono em meio de cultura. Cada valor é expresso como média ± erro padrão (SE).52
- Figura 30.** PCA das variáveis massa fresca de micélio (FW), massa seca (DW), diâmetro (Diam), área, eficiência biológica (YP), de *Panus strigellus* (Berk.) 144h após a inoculação, em cada nível (1, 2, 5, 7, 15, 35, 75, 125, 250, 500 mg SH L⁻¹) de dose de substâncias húmicas de turfa (A) ou vermicomposto (B) + controle de BDA (PDA).54
- Figura 31.** Medição do diâmetro de crescimento micelial de *G. lucidum* com doses de substâncias húmicas de vermicomposto e turfa como fonte de carbono em meios de crescimento 48, 72, 96, 120, 144 h após a inoculação.55
- Figura 32.** Diâmetro do micélio de *G. lucidum* em função do tempo (24, 48, 72, 96, 120, 144 h após a inoculação) dentro de cada nível (1, 2, 5, 7, 15, 35, 75, 125, 250, 500 mg SH L⁻¹) de doses de substâncias húmicas de vermicomposto (VC) ou turfa (peat) + controle de BDA, como fonte de carbono em meios de cultura. Cada valor é expresso como média ± erro padrão (SE).56

- Figura 33.** Área de micélio de *G. lucidum* em função do tempo (48, 96, 144, 192 h após a inoculação) dentro de cada nível (1, 2, 5, 7, 15, 35, 75, 125, 250, 500 mg SH L⁻¹) de dose de substâncias húmicas de vermicomposto (VC) ou turfa (peat) + controle de BDA, como fonte de carbono em meio de cultura. Cada valor é expresso como média ± erro padrão (SE). 57
- Figura 34.** Massa fresca de micélio de *G. lucidum* em função do tempo (48, 96, 144, 192 h após a inoculação) dentro de cada nível (1, 2, 5, 7, 15, 35, 75, 125, 250mg SH L⁻¹) de doses de substâncias húmicas de vermicomposto (VC) ou turfa (peat) + controle de BDA, como fonte de carbono em meio de cultura. Cada valor é expresso como média ± erro padrão (SE). 58
- Figura 35.** Massa seca de micélio de *G. lucidum* em função do tempo (48, 96, 144, 192 h após a inoculação) dentro de cada nível (1, 2, 5, 7, 15, 35, 75, 125, 250, 500 mg SH L⁻¹) de doses de substâncias húmicas de vermicomposto (VC) ou turfa (peat) + controle de BDA, como fonte de carbono em meio de cultura. Cada valor é expresso como média ± erro padrão (SE). 59
- Figura 36.** Densidade de micélio de *G. lucidum* em função do tempo (48, 96, 144, 192 h após a inoculação) dentro de cada nível (1, 2, 5, 7, 15, 35, 75, 125, 250, 500 mg SH L⁻¹) de doses de substâncias húmicas de vermicomposto (VC) ou turfa (peat) + controle de BDA, como fonte de carbono em meios de cultura. Cada valor é expresso como média ± erro padrão (SE). 60
- Figura 37.** Eficiência biológica do micélio de *Ganoderma lucidum* em função do tempo (48, 96, 144, 192 h após a inoculação) dentro de cada nível (1, 2, 5, 7, 15, 35, 75, 125, 250, 500 mg SH L⁻¹) de doses de substâncias húmicas de vermicomposto (VC) ou turfa (peat) + controle de BDA, como fonte de carbono em meio de cultura. Cada valor é expresso como média ± erro padrão (SE). 61
- Figura 38.** PCA das variáveis massa fresca de micélio (FW), massa seca (DW), diâmetro (Diam), área, eficiência biológica (YP), de *Ganoderma lucidum*, 144h após a inoculação, em cada nível (1, 2, 5, 7, 15, 35, 75, 125, 250 mg SH L⁻¹) de dose de substâncias húmicas de turfa (A) ou vermicomposto (B) + controle de BDA (PDA). 63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características que definem as estratégias de história de vida de espécies ruderais, combativas e tolerantes ao estresse.....	14
--	----

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Substâncias Húmicas	3
2.2 Reino Fungi.....	5
2.2.1 Importância agrícola e ambiental	6
2.2.2 Cultivo e aplicabilidade	8
2.3 Filo Basidiomycota (Agaricomycetes)	10
2.3.1 Cogumelo rei ou cogumelo do cardo – <i>Pleurotus eryngii</i>	10
2.3.2 Panus – <i>Panus strigellus</i> (Berk.).....	12
2.3.3 Cogumelo do imperador – <i>Ganoderma lucidum</i> (Fr.)	12
2.3.4 Ecologia dos Agaricomycetes	14
2.3.5 Agaricomycetes e seu papel como decompositor	15
2.4 Relação entre o Cultivo de Agaricomycetes e Drenagem de Carbono.....	16
2.5 Capacidade Produtiva dos Agaricomycetes.....	16
2.6 Biomassa Produzida por Agaricomycetes	18
2.7 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	22
3. MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1 Local e Condições Experimentais.....	25
3.1.1 Origem da matriz fúngica e multiplicação	25
3.1.2 Cepa fúngicas e produção de inóculos (<i>spawn</i>)	25
3.2 Extração e Caracterização das Substâncias Húmicas (SH) de Diferentes Origens	26
3.3 Caracterização Mediante ¹³ C NMR CP/MAS das Substâncias Húmicas Extraídas de Vermicomposto e Turfa.....	27
3.3.1 Aplicação de técnicas estatísticas aos dados espectrais por meio de análises quimiométricas.....	27
3.3.2 Modelagem química estrutural das SH a partir de dados espectrais de ¹³ C RMN em estado sólido.....	28
3.4 Preparação dos Meios de Cultura Enriquecidos com SH para os Experimentos com Fungos.....	28
3.4.1 Determinação dos parâmetros de crescimento.....	29
3.5 Desenho Experimental e Análise Estatística	30
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
4.1 Caracterização das SH de Turfa e Vermicomposto Mediante ¹³ C NMR CP/MAS.....	31
4.1.1 Análises de PCA aplicados aos dados espectrais obtidos mediante ¹³ C NMR CP/MAS	32
4.1.2 Quantidade relativa de estruturas de carbono presentes nas SH de turfa e vermicomposto.....	33
4.2 Curva de Resolução Multivariada (MCR) e Modelagem Química-Estrutural das SH..	34
4.3 Avaliação do crescimento e desenvolvimento dos fungos em contacto com SH de turfa e de Vermicomposto	37

4.3.1 Efeito das substâncias húmicas sobre o crescimento e desenvolvimento de <i>Pleurotus eryngii</i>	37
4.3.2 Efeito das substâncias húmicas sobre o diâmetro do micélio de <i>P. eryngii</i>	38
4.3.3 Efeito das SH sobre a área do micélio	40
4.3.4 Efeito das SH sobre a massa fresca e seca micelial	41
4.3.5 Efeito das SH sobre a densidade micelial	42
4.3.6 Efeito das SH sobre a eficiência biológica.....	43
4.3.7 Análise de componentes principais (PCA) em relação a diferentes variáveis	44
4.4 Análises de <i>Panus strigellus</i> (Berk.).....	46
4.4.1 Efeito das substâncias húmicas sobre o crescimento e desenvolvimento do fungo	46
4.4.2 Efeito das SH sobre o diâmetro do micélio.....	46
4.4.3 Efeito das SH sobre a área do micélio	48
4.4.4 Efeito das SH sobre a massa fresca e seca micelial	49
4.4.5 Efeito das SH sobre a densidade micelial	51
4.4.6 Efeito das SH sobre a eficiência biológica.....	52
4.4.7 Análise de componentes principais (PCA) para as variáveis mensuradas em <i>Panus strigellus</i>	53
4.5 Análises de <i>Ganoderma lucidum</i>	53
4.5.1 Efeito das substâncias húmicas sobre o crescimento e desenvolvimento do fungo	53
4.5.2 Efeito das SH sobre o diâmetro do micélio.....	55
4.5.3 Efeito das SH sobre a área do micélio	57
4.5.4 Efeito das SH sobre a massa fresca e seca micelial	58
4.5.5 Efeito das SH sobre a densidade micelial	59
4.5.6 Efeito das SH sobre a eficiência biológica.....	60
4.5.7 Análise de componentes principais (PCA) para as variáveis mensuradas em <i>Ganoderma lucidum</i>	61
5. CONCLUSÕES	64
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65

1. INTRODUÇÃO

Os fungos desempenham papéis benéficos no cotidiano como por exemplo a síntese do álcool e dióxido de carbono no processo de fermentação que são imprescindíveis na produção de bebidas, como o vinho e a cerveja, alimentos, como os pães e massas em geral, e proporcionam sabor e aroma distintos em diferentes tipos de queijos. Na medicina, a partir do desenvolvimento de alguns antibióticos, os fungos receberam atenção especial e atualmente estes microrganismos estão em evidência devido ao crescente mercado de fungos comestíveis.

Em ecossistemas naturais, fungos saprotróficos, principalmente agaricomycetes, também conhecidos como fungos da podridão branca e marrom (RILEY et al., 2014), atuam como decompositores primários, secundários e terciários de biomassa lignocelulósica, onde se alimentam e reciclam grandes quantidades de carbono sendo também chamados fungos decompositores de lixo (LDFs) (DIÁCONO et al., 2006; LYNCH e THORN, 2006).

A mera presença de macro fungos nos ecossistemas tropicais é um indicativo da qualidade do equilíbrio ecológico e da necromassa nesse ambiente. Várias espécies de agaricomycetes são indicadores biológicos da qualidade da matéria orgânica morta e do funcionamento do ciclo de nutrientes como nitrogênio e carbono (CENCI e SENA, 2011). Tem sido relatado que a qualidade estrutural do substrato orgânico depositado é chave para a regulação da decomposição do material vegetal no solo independentemente do tipo de ambiente (BEIDLER et al., 2020) e os fungos são mediadores na transformação e dinâmica dos compostos orgânicos (MAILLARD et al., 2020).

Os fungos participam do processo de ciclagem de nutrientes e promovem melhorias nas propriedades físicas, químicas e biológicas do solo, pois a matéria orgânica é decomposta com consequente liberação de nutrientes. Embora as bactérias sejam mais abundantes na natureza e participem do *turnover* de substâncias húmicas, em ecossistemas florestais, sua capacidade de degradar macromoléculas estáveis como ácidos húmicos, e lignina é limitada (DEHORTER et al., 1992; GRAMSS et al., 1999; MACHNIKOWSKA et al., 2002; FILIP e TESAROVA, 2004). As bactérias provavelmente conseguem utilizar compostos de baixo peso molecular, como metabólitos de ácidos fúlvicos (AF) e ácidos húmicos (AH). Os fungos, por outro lado, são os mais eficientes degradadores de substâncias húmicas (SH), usando processos secundários ou cometabólicos (Qi et al., 2004).

Os mecanismos de degradação lignocelulósica envolvem uma série de processos no qual participam diversas enzimas hidrolíticas (cellobiohydrolases, endoglucanases, β -glucuronases) e enzimas oxidativas (lacases, lignin peroxidases, manganese peroxidases (aryl-alcohol oxidases, aryl-alcohol dehydrogenases, quinona reductases). As enzimas hidrolíticas são responsáveis pela degradação da celulose e da hemicelulose, e as enzimas oxidativas participam na despolimerização da lignina (RITOTA e MANZI, 2019).

Os agaricomycetes são capazes de interagir e assimilar diretamente o carbono na forma de SH, por exemplo, *Collybia dryophila* K209, agaricomyceto amplamente distribuído em ambiente de floresta, tem mostrado capacidade para transformar até 75% dos AH formados a partir de serrapilheira em AF de elevada polaridade e baixa massa molecular (Steffen et al., 2002). Fungos como o *Trametes máxima* utiliza as SH como fonte de carbono para o desenvolvimento de biomassa no crescimento micelial, induzindo a incorporação de fragmentos húmicos nos tecidos e ocasionando modificações nas células dos fungos, especificamente na espessura das hifas e da parede celular (KLEIN et al., 2014). A taxa de mineralização da matéria orgânica pelos agaricomycetes depende das espécies e da fonte do carbono. Os fungos *Hypholoma fascicular* e *Gymnopus erythropus* mostraram que a quantidade de lignina e carbono húmico que ambos os fungos são capazes de decompor varia

entre 12% e 31% dependendo das características e natureza lignocelulosicas do carbono orgânico (ŠNAJDR et al., 2010).

Diante deste cenário, as pesquisas sobre a relação das características estruturais e composicionais da matéria orgânica humificada e a capacidade para promover a transformação e decomposição por parte dos agaricomycetes ainda são insuficientes e dispersos. Para investigar essa relação, o presente estudo tem como hipóteses que o crescimento e desenvolvimento dos agaricomycetes está relacionado com as características composicionais das distintas fontes da matéria orgânica humificada (substâncias húmicas). Para comprovar a hipóteses apresentada, esta tese teve o seguinte objetivo geral:

Avaliar a relação estrutura-propriedade-função de duas substâncias húmicas obtidas de fontes diferentes, vermicomposto e turfa, caracterizadas mediante técnicas espectroscópicas (^{13}C NMR CP/MAS), com o crescimento e desenvolvimento de *Pleurotus eryngii*, *Panus strigellus* (Berk.) e *Ganoderma lucidum*. Para o alcance do objetivo geral, foram traçados os seguintes objetivos específicos:

- a) Extrair e purificar substâncias húmicas (SH) de duas fontes de origens diferentes: vermicomposto e de turfa.
- b) Caracterizar as SH obtidas mediante espectroscopia de ressonância magnética nuclear em estado sólido (^{13}C NMR CP/MAS).
- c) Determinar mediante experimentos de dose vs. respostas, as doses de SH que regulam o crescimento e desenvolvimento de *Pleurotus eryngii*, *Panus strigellus* (Berk.) e *Ganoderma lucidum*.
- d) Quantificar os parâmetros de crescimento e desenvolvimento dos fungos: corrida micelial, massa fresca e seca dos micélios, densidade micelial e eficiência biológica.
- e) Conhecer os padrões estruturais das SH que tem relação com os efeitos na nutrição, crescimento e desenvolvimento desses agaricomycetes.

O estudo foi realizado em duas etapas no Laboratório de Química Biológica (LQBS) do Departamento de Solos, Instituto de Agronomia, da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Primeiramente foi realizada a extração e caracterização das substâncias húmicas de diferentes origens que consiste em extrair e caracterizar as substâncias húmicas provenientes de vermicomposto e turfa com o objetivo de conhecer os principais tipos de estruturas dos fragmentos carbonados nas SH através da técnica de RMN em estado sólido. Para isto, foi utilizada a técnica consistente em polarização cruzada (CP) e rotação no ângulo mágico (MAS).

Em um segundo momento foram analisados parâmetros de crescimento e desenvolvimento desses fungos frente aos efeitos das diferentes concentrações de substâncias húmicas. Foram elaborados meios de cultura enriquecidos com substâncias húmicas de variadas concentrações onde foram inoculados tampões de micélio que serviram de base para a observação e compreensão do comportamento dos fungos mediante ao uso das substâncias húmicas como fonte de carbono.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Substâncias Húmicas

As substâncias húmicas (SH) são polímeros heterogêneos provenientes da transformação de biomoléculas através da decomposição de resíduos vegetais e animais presentes no meio ambiente (PINHEIRO et al., 2010; BOTERO, 2010; JÚNIOR et al., 2001). Sua composição varia de acordo com a localização geográfica, origem e história, além de sofrer influência de diversos fatores como solo, clima e vegetação (FONTANA, 2009; ATIYEH et al., 2002; GARCÍA et al., 2002).

As SH são reconhecidas como um grupo de compostos formados no solo a partir de um processo denominado como humificação. O processo de humificação pode ser entendido como um conjunto de transformações químicas, físicas e biológicas que lhe ocorrem aos detritos orgânicos que são depositados no solo, sejam de origem vegetal ou animal, que originam um produto denominado como humus, ou SH. O processo de humificação é específico para cada tipo de solo e depende em primeira instância das características estruturais dos compostos orgânicos depositados no solo, da biota do solo capaz de processar metabolicamente tais compostos e das condições físicas, químicas e biológicas do solo (AGUIAR et al., 2022).

As SH apresentam um padrão estrutural semelhante, independentemente da sua origem e ambiente de formação, porém, elas possuem quantidades relativas diferentes de fragmentos químicos. Estas diferenças em quantidades de frações orgânicas são as responsáveis por gerar propriedades diferentes. Nesse sentido, as SH possuem semelhanças nas suas funções, mas com intensidades dessas funções distintas. Essa interpretação se origina no fato de não haver um tipo específico de processo de humificação e sim uma humificação para cada fonte de origem, ocorrendo de maneira específica em função das características do ambiente local. Desta forma, os padrões estruturais das SH justificam a existência de compostos húmicos capazes de funcionar como indicadores dos mecanismos que ocorrem no meio ambiente (AGUIAR et al., 2022; ZECH et al., 1997) (Figura 1).

A estrutura das SH tem sido amplamente estudada e vários modelos propostos, mas o entendimento passa pela interpretação de uma organização macromolecular até a organização pseudomicelar em solução. No entanto, o grupo de pesquisa de Piccolo e colaboradores mostraram que as SH podem ser interpretadas a partir de um modelo supraestrutural. A supraestrutura húmica é originada no solo a partir da estabilização dos fragmentos húmicos e compostos mais simples mediante forças dispersivas fracas ao invés de ligações covalentes. Os fragmentos são unidos mediante interações hidrofóbicas (van der Waals, π - π , CH- π), e ligações de hidrogênio garantem o aumento do tamanho molecular da supraestrutura e contribui para explicar suas funções o solo (PICCOLO, 2001, 2002).

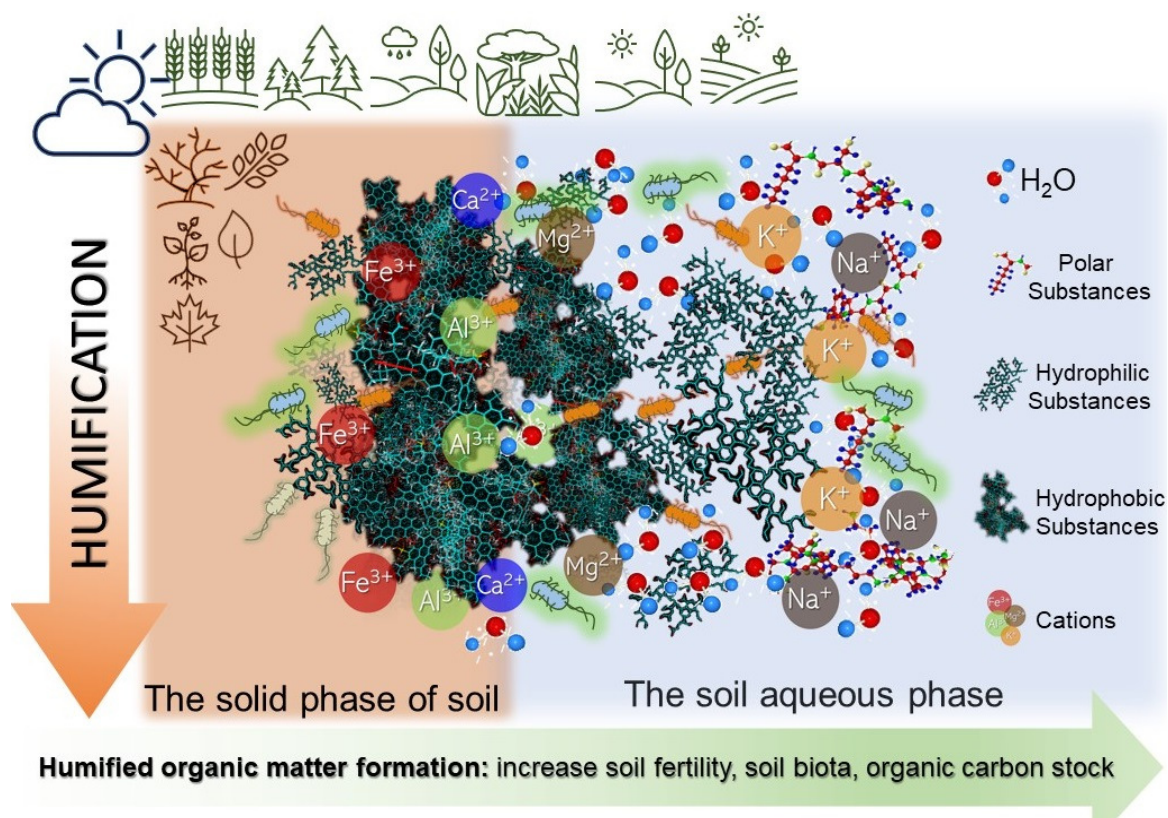


Figura 1. Representação esquemática do processo de humificação e a importância da formação das substâncias húmicas e sua interação com os componentes do solo. Fonte: Aguiar et al., 2022.

Modelos estruturais capazes de descrever o comportamento das SH no seu meio natural são importantes porque permitem entender seus efeitos no solo e em plantas, e possibilita prever suas funções. Uma supraestrutura húmica para as SH atende todos os pressupostos porque em nível supramolecular as propriedades químicas e físicas não se derivam apenas da presença ou não de um tipo de composto e a quantidade presente, senão da sua organização espacial, seu comportamento no sistema solo como mobilidade, flexibilidade, capacidade de difusão (CASTRO et al., 2021, GARCÍA-MINA et al., 2021).

De fato, as SH possuem na fase aquosa no solo uma arquitetura descrita por uma disposição supraestrutural onde um domínio formado por fragmentos de substâncias polares e de propriedades hidrofílicas está disposta para a superfície, como um escudo que protege o domínio interno formado por fragmentos apolares, aromáticos e de propriedades hidrofóbicas (FIZHER et al., 2017).

Em termos operacionais, as frações de SH possuem diferenças estruturais, fundamentalmente quando obtidas a partir de diferentes origens (BOTERO, 2010). Desta forma, a classificação de suas diferentes frações serve como indicador de qualidade da matéria orgânica humificada e podem ser obtidas a partir das diferenças em solubilidade, sendo usualmente subdivididos em ácidos fúlvicos, humina e ácidos húmicos (FILHO e SILVA, 2002). Tal classificação permite entender as frações húmicas como sendo os ácidos fúlvicos as frações que são solúveis a qualquer valor de pH, portanto mais ácidos e com maior aporte de CTC, já os ácidos húmicos constituem a fração insolúvel a valores de pH inferiores a 2, e por fim as huminas, que são as frações insolúveis a qualquer valor de pH (JÚNIOR et al., 2001; BARRIQUELO, 2005).

As diferentes características que as substâncias húmicas possuem permitem que elas desempenhem um importante papel no meio ambiente (SANTOS, 2016). Devido à alta

capacidade de retenção de água em até 20 vezes a sua massa, as substâncias húmicas conservam o solo contra erosões, propiciam o aumento da retenção de calor pelo solo ajudando a germinação de sementes devido a sua coloração tipicamente escura, ao se combinarem com argilas minerais cimentam partículas do solo em agregados permitindo a troca de gases e consequentemente a permeabilidade; e íons como NH_4^+ , NO_3^- , PO_4^{3-} e SO_4^{2-} são produzidos quando a matéria orgânica é decomposta sendo que estes elementos são considerados nutrientes importantes para o crescimento das plantas (LEAL, 2013; SANTOS, 2005).

Segundo Arend (2010) outra importante propriedade das substâncias húmicas é a habilidade de interagir com íons metálicos formando complexos de diferentes estabilidades devido a sua característica estrutural que apresenta alto teor de grupos funcionais contendo oxigênio tais como carboxilas, hidroxilas fenólicas e carbonilas (Figura 2).

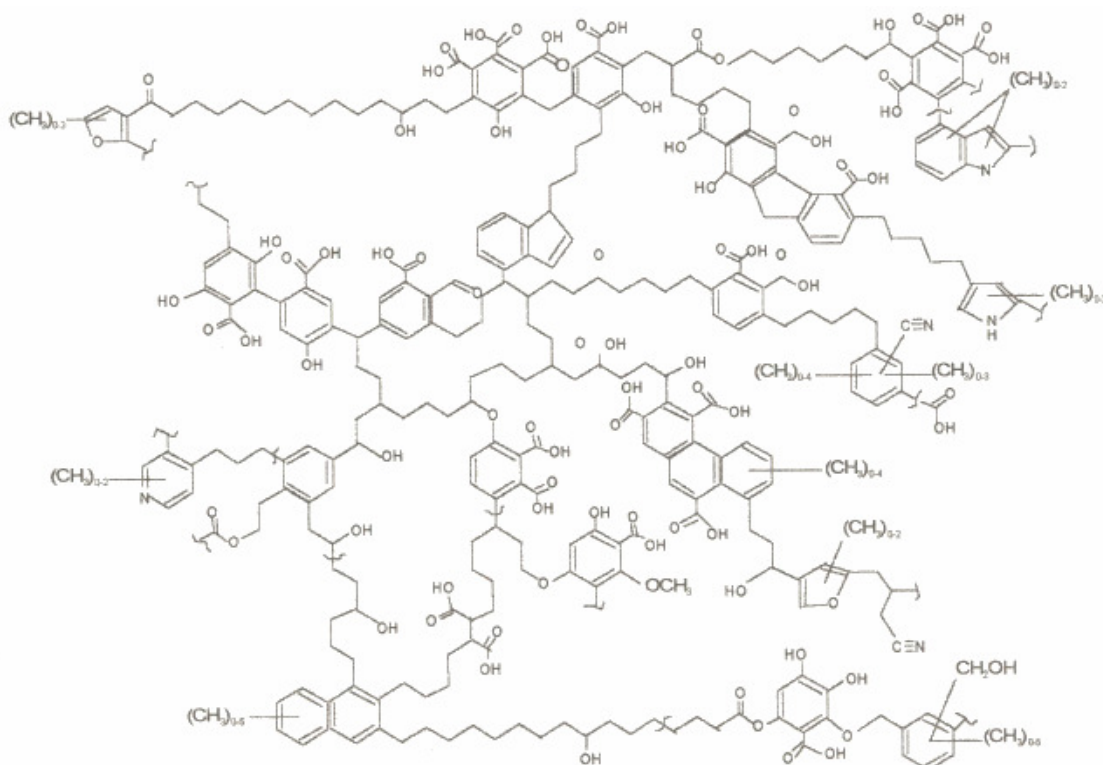


Figura 2. Estrutura bidimensional proposta para os ácidos húmicos. Retirado de Filho e Silva, 2002.

2.2 Reino Fungi

O reino Fungi é composto por organismos que podem ser encontrados nos ambientes mais inóspitos, com elevado grau de versatilidade metabólica sendo capazes de colonizar diferentes substratos orgânicos para o seu crescimento incluindo compostos químicos como nitrato, amônia, acetato ou etanol (SILVA e MALTA, 2016; MARZALUF, 1981). Os representantes deste reino são seres vivos eucariontes, heterotróficos sendo classificados como unicelulares ou pluricelulares, além disto, apresentam um conjunto de hifas, septadas ou não, protegidas por uma parede celular (SILVA e COELHO, 2006).

Os fungos possuem vasta distribuição global com diversidade de formas, modo e ciclo de vida; não apresentam aparatos que os permitem aproveitar a energia solar diretamente para geração de energia e nutrientes, desta forma, sua nutrição pode ser obtida de diferentes maneiras (Figura 3). Uma das formas é através da decomposição da matéria orgânica na

natureza, sendo chamados de fungos sapróbios, permitindo que eles atuem diretamente na ciclagem de nutrientes, visto que estes organismos assimilam os elementos transformando-os em substâncias mais simples. As substâncias degradadas são componentes da madeira, celulose, hemicelulose e lignina, através das quais obtêm energia para seu crescimento e reprodução (SANTOS, 2014; SILVA e MALTA, 2016).

Já os fungos simbióticos são contrários aos sapróbios e ao estabelecerem relação benéfica com outros organismos recebem nutrientes orgânicos enquanto oferecem nutrientes minerais, água e proteção contra agentes nocivos. Existem também os fungos classificados como parasitas que utilizam a matéria orgânica de outros organismos como substrato causando prejuízos à saúde e a economia (FRANK, 2019).

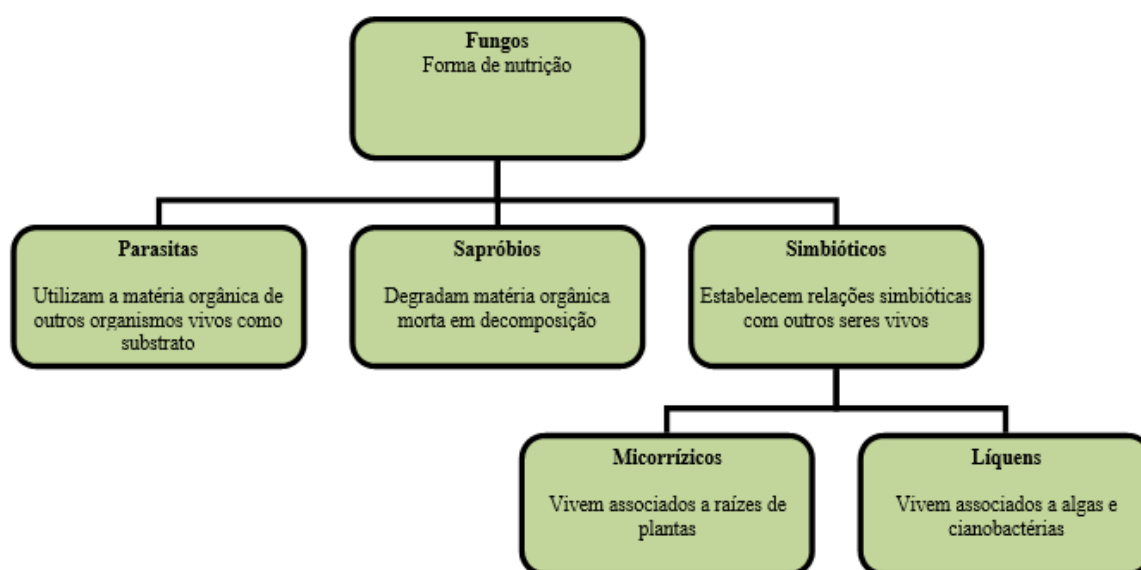


Figura 3. Diferentes formas de nutrição de fungos. Fonte: Frank, 2019 (adaptado).

Inicialmente os fungos eram considerados pelos taxonomistas como membros do reino Plantae devido a semelhanças nos seus modos de vida, a partir da descrição realizada por Whittaker, em 1969, os fungos foram reconhecidos como um reino com base na observação e caracterização morfológica das estruturas vegetativas e reprodutivas que são produzidas no decorrer dos variados estágios de maturação com seguinte utilização de chaves dicotômicas (BALDAUF e PALMER, 1993). Atualmente, com a aplicação de ferramentas provenientes da biologia molecular, como análises de sequenciamento de DNA, RNA, proteínas e análise filogenética, o estudo da diversidade do reino foi complementada significativamente, favorecendo a diversidade genética dos variados grupos taxonômicos (HIBBETT et al., 2007).

2.2.1 Importância agrícola e ambiental

A agricultura é o conjunto de práticas onde o solo é trabalhado com o objetivo de cultivar alimentos, criação de animais e produção de matéria prima (SOUZA, 2017). No período da revolução verde a agricultura sofreu grandes transformações com o intuito de aumentar a produtividade por meio do uso de insumos produzido em escala industrial, uso massivo de máquinas agrícolas para o preparo do solo, uso de agrotóxicos e fertilização do solo. Estas práticas trouxeram grandes avanços no setor industrial agrícola e na produção de alimentos, contudo promoveu concomitantemente o aumento dos problemas ambientais (SERRA et al., 2016). Dentre os impactos ambientais que o modelo agrícola focado somente na produtividade destaca-se a degradação do solo em forma de erosão, desmatamento,

poluição e salinização influenciando na qualidade, fertilidade e sustentabilidade do solo (BITTENCOURT, 2010) além de desequilíbrios ecológicos em todo o mundo. Diante desse cenário, Duan et al., (2011) relata um crescente interesse na utilização de microrganismos e macrorganismos na agricultura, devido a busca por alternativas para o uso de insumos agrícolas e o aumento da conscientização sobre a preservação do meio ambiente.

Um dos principais problemas mundiais é o escoamento dos resíduos agroindustriais e pecuários (GARG et al., 2012). De acordo com Ritota e Manzi (2019), em um estudo global sobre nutrição, agricultura sustentável e desperdício de alimentos, a população mundial desperdiça em média 37 kg de comida por pessoa. Sendo 1,3 bilhões de toneladas de alimentos perdidos no planeta a cada ano, 30% do total produzido. No Brasil, segundo dados divulgados em 2013, houve desperdício de 26,3 milhões de toneladas de alimentos. Isso representa quase 10% dos alimentos disponíveis, sendo 126 milhões de toneladas no presente ano (FAO). Para o gerenciamento destes resíduos, diferentes estratégias vêm sendo adotadas mundialmente, por exemplo, a produção de biogás, digestão aeróbia e anaeróbia, co-digestão de resíduos alimentares que são considerados uma fonte de energia renovável com baixas emissões de carbono (MORALES-POLO et al., 2018; ROTOTA e MANZI, 2019). Essas ações, contudo, não são suficientes. Por tal razão, a produção de cogumelos a partir de resíduos agroindustriais pode ser uma alternativa viável a ser adotada nos diferentes países.

A presença de diversas fontes de carbono (celulose, hemicelulose e lignina), minerais e umidade presentes nos resíduos agroindustriais favorece o desenvolvimento de microrganismos (MUSSATO et al., 2012; HASSAN et al., 2018) que são a força motriz por trás da transformação, degradação e mineralização do carbono. Nesse sentido, podem ser utilizados em processos de fermentação em estado sólido (NIKAEEN et al., 2015) e usados como substrato pelos cogumelos por possuírem um sistema de “bateria” complexa capaz de degradar materiais lignocelulósicos (ALTAF et al., 2010), abrindo a porta de múltiplas aplicações dos processos de fermentação da matéria orgânica em estado sólido. A fermentação em estado sólido (SSF) é definida como um processo mediado por microrganismos cultivados em partículas sólidas na ausência (ou quase ausência) de água livre (STAJIC´ et al., 2013). O substrato resultante do SFF é um material sólido que atua como suporte físico e fonte de energia e nutrientes, com a umidade suficiente para permitir o desenvolvimento e o metabolismo de microorganismos, como fungos, leveduras e bactérias (STAJIC´ et al., 2013; AKPINAR & UREK, 2014).

Embora as bactérias sejam mais abundantes na natureza e participem do *turnover* de substâncias húmicas, em ecossistemas florestais, sua capacidade de degradar macromoléculas estáveis como AH, e lignina é limitada (DEHORTER et al., 1992; GRAMSS et al., 1999; MACHNIKOWSKA et al., 2002; FILIP e TESAROVA, 2004). As bactérias provavelmente conseguem utilizar compostos de baixo peso molecular, como metabólitos de AF e AH. Os fungos, por outro lado, são os mais eficientes degradadores de SH, usando processos secundários ou cometabólicos (QI et al., 2004). Em ecossistemas naturais, fungos saprotróficos, principalmente agaricomycetes, também conhecidos como fungos da podridão branca e marrom (RILEY et al., 2014), atuam como decompositores primários, secundários e terciários de biomassa lignocelulósica, onde se alimentam e reciclam grandes quantidades de carbono (DIÁCONO et al., 2006; LYNCH e THORN, 2006).

Os mecanismos de degradação lignocelulósica envolvem uma série de processos no qual participam diversas enzimas hidrolíticas (cellobiohydrosilases, endoglucanases, b-gluconases) e enzimas oxidativas (lacases, lignin peroxidases, manganese peroxidases (aryl-alcohol oxidases, aryl-alcohol dehydrogenases, quinone reductases). As enzimas hidrolíticas são responsáveis pela degradação da celulose e da hemicelulose, e as enzimas oxidativas participam na despolimerização da lignina (RITOTA e MANZI, 2019).

O fungo *P. eryngii* pertencente à classe agaricomycetes possui um potente sistema ligninolítico extracelular que consiste em álcool arílico oxidase (AAO), manganês peroxidase (MnP) e lacase (Lac), (ALTAF et al., 2010). Devido a essa habilidade única das enzimas oxidativas não específicas para reagir com uma variedade de compostos aromáticos, os fungos da podridão branca têm sido apontados como o grupo mais eficiente de microrganismos degradadores de substâncias húmicas (HOFRICHER e FRITSCH, 1996; GRAMSS et al., 1999). Provavelmente, o primeiro estudo demonstrando a participação de fungos da podridão branca em processos de degradação de AH provenientes de solos podzólicos foi publicado por Burges e Latter (1960). Posteriormente Stevenson (1994) também relacionou os processos de atividade de degradação fúngica de agaricomycetes com o branqueamento de AH. Autores como Cohen e Gabriele (1982) mostraram que os fungos *Trametes versicolor* e *Poria monticola* (fungos de podridão marrom) eram capazes de degradar e solubilizar o carvão lignito, e por meio de análise infravermelha revelaram as diferenças entre o lignito original e o produtos solúveis.

2.2.2 Cultivo e aplicabilidade

O Brasil destaca-se por possuir uma das maiores biodiversidades do planeta, isso representa um grande potencial biotecnológico a ser estudado e explorado (BEKAI, 2010). Os progressos na exploração geral de fungos em Florestas Tropicais são limitados (HAWKSWORTH, 2004), bem como nos estudos da diversidade de agaricomycetes presente nos ecossistemas brasileiros (HAWKSWORTH e LÜCKING, 2017). O conhecimento sobre os cogumelos comestíveis e seus usos no Brasil acompanham a cadência das pesquisas, tendo ainda muito a ser descoberto pelo potencial oferecido pelos biomas, especialmente considerando dois *hotspots* de biodiversidade importantes, o Cerrado e a Mata Atlântica, que ocorrem na região tropical do país (MAIA et al., 2015; HAWKSWORTH e LÜCKING, 2017).

Nos últimos anos têm surgido redes de grupos de pesquisas, e aos poucos têm se ampliado, e isso se reflete na descrição de novas espécies de cogumelos (MAIA et al., 2015). Atualmente no Brasil, há um incremento do interesse na exploração e cultivo de espécies nativas ou comerciais que podem ser potencialmente produzidas fora do meio natural (ISHIKAWA et al., 2017; SILVA-NETO et al., 2019; ISA, 2019). Os fungos apresentam grande potencial econômico, visto que, são utilizados na preparação e produção de alimentos, produtos naturais com atividades microbianas, drogas anticancerígenas, vitaminas e antibióticos, influenciando no bem estar e qualidade de vida de diferentes organismos (Finchan, 1989).

A cultivo dos fungos possui longa tradição no Sudoeste Asiático, e a partir do século XVII expandiu-se para a Europa, Estados Unidos e Canadá (SÁNCHEZ e ROYSE, 2001). Segundo Rollan (2003) era frequente no século passado a colheita de cogumelos encontrados em troncos de árvores caídas, que eram naturalmente inoculadas através dos esporos que eram libertados pelas espécies de cogumelos existentes no meio, bem como colhidos no próprio solo. Atualmente os sistemas de cultivo se dão em ambientes controlados, permitindo que se obtenha cogumelos ao longo de todo ano, com ciclos de produção mais curtos. O que resulta em maior produtividade e melhor qualidade do produto, sem necessidade de instalações muito específicas e dispendiosas. Além disso, permite reciclar diferentes resíduos agrícolas, agroindustriais e hortícolas os quais servirão de substrato para o desenvolvimento dos fungos (RAMOS et al., 2004; MODA et al., 2005; MOURA, 2008).

Os cogumelos comestíveis são apreciados por seu valor nutricional, medicinal e gastronômico há muitos anos. Estima-se que “as pedras de cogumelos” da Guatemala são as

primeiras reproduções de fungos realizada pelos homens, datando de 3000 a.C, onde estes organismos eram usados em rituais místicos e medicinais (MOLITORIS, 1994).

Na antiguidade os cogumelos eram servidos aos faraós como iguarias, já para os gregos e os romanos estes organismos eram considerados alimento principal em suas famosas orgias (FRANK, 2019). O consumo de cogumelo é uma velha tradição nos países asiáticos, nos séculos passados os cogumelos eram cultivados pelos japoneses sobre troncos em decomposição. Os chineses utilizavam madeira e palhas decompostas. Na Europa os cogumelos eram cultivados em bosques ao ar livre ou em cavernas. Todavia, todos esses processos são considerados lentos, resultando na demanda de mais tempo para que a parte comestível ou o basidioma frutífero se desenvolvesse (URBEN, 2004).

Os cogumelos comestíveis mais cultivados no mundo são: *Agaricus bisporus* (champignon ou portobello), seguido do *Lentinula edodes* (shiitake), *Pleurotus ostreatus* (cogumelo ostra), *Auricularia auricula* (cogumelo orelha de judeu) e *Volvariella volvacea* (cogumelo palha) (REIS, 2019). Já o cogumelo considerado mais difundido pelos exportadores é o nativo *Agaricus brasiliensis* conhecido como cogumelo do sol. Este cogumelo ganhou notoriedade na mídia japonesa após análises laboratoriais comprovarem que sua composição apresenta moléculas capazes de aumentar a imunidade de pacientes com câncer além de conter efeitos anticarcinogênicos (EIRA, 2003; ORSINE et al., 2012).

No Brasil, a produção de cogumelos iniciou-se em 1950 com a chegada de imigrantes asiáticos e europeus. Os imigrantes japoneses e chineses são os pioneiros no país ao utilizarem o cultivo com a técnica *Jun-Cao* produzindo cogumelos em palha, madeira ou serragem. Já os europeus se diferenciaram no cultivo quanto ao uso de substrato (compostagem) e a espécie cultivada (BONONI, 1999). De acordo com Pergher (2016) tanto os imigrantes asiáticos quanto os europeus trouxeram para o Brasil não só técnicas do processo produtivo, mas também, as linhagens e um material genético modificado; somadas a estes fatores encontram-se as dificuldades iniciais com as matérias primas locais, clima e adaptação das linhagens.

A comercialização de fungos encontra-se em expansão e tem movimentado um mercado promissor devido aos seus benefícios relacionados aos nutrientes oferecidos, bem como propriedades medicinais, com isso, faz-se necessária a busca por uma produção eficiente e sustentável (ANPC, 2019). Para o sucesso de sua produção, é necessário o alinhamento de conhecimentos científicos como de experiência prática, na produção de meios de cultivo alternativos, o controle ambiental adequado especialmente com relação à temperatura e troca de gases, em sistemas adaptados para climas tropicais. Outro fator limitante é o uso de substratos adequados, assim como a relação C/N, que atenda às exigências nutricionais de cada espécie e que permitam seu cultivo. Os substratos devem ser, de preferência, oriundos das cadeias produtivas agrícolas locais, agroindustriais e pecuárias, onde possam ser reutilizados todos esses resíduos orgânicos disponíveis nas propriedades dos agricultores, como capins, restos de culturas, compostagens ou extratos de origem orgânica. Uma maneira de atender esse mercado é o enriquecimento dos substratos com resíduos agrícolas lignocelulósicos com a finalidade de favorecer e estimular o desenvolvimento do fungo obtendo melhor eficiência biológica, rendimento além de dar destino a um material que antes seria descartado gerando poluição e impactos ambientais (FASIDI e KADIRI, 1993; OWAID et al., 2015).

Atualmente a produtividade nacional ainda se encontra longe do desejado, quando comparado a China que é a maior produtora mundial (FRANK, 2019). A América do Norte e a Europa também apresentam uma cultura de consumo de cogumelos muito superior ao Brasil. Todavia, um dos maiores obstáculos encontrados no Brasil é decorrente do clima, que na maior parte do ano e na porção do país é excessivamente quente, visto que a maioria das espécies e linhagens cultivadas no país é de origem europeia e asiática (REIS, 2019).

2.3 Filo Basidiomycota (Agaricomycetes)

Popularmente conhecidos como cogumelos, orelhas de pau, bolores, bufa de bolo, trufas, mofos entre outros, os agaricomycetes representam uma das maiores classes de fungos (LIPRELI, 2012; SARTORI, 2011). Este filo é caracterizado por ser capaz de produzir esporos (basidiósporos) sexuadamente em uma estrutura denominada basídio e a fase vegetativa é denominada micélio que é composto por muitos filamentos septados denominados hifas (MOREIRA NETO, 2006). Estima-se que aproximadamente 30.000 espécies compõem o filo basidiomycota o que corresponde a 37% do número de fungos verdadeiros descritos, e no Brasil, estima-se um número em torno de 8.897 espécies (SARTORI, 2011). A intensa mudança na classificação ocorrida nos últimos anos impede a exatidão no número de espécies dos principais grupos (CAPELLANI et al., 1998; SARTORI, 2011).

Os agaricomycetes desempenham papel biológico fundamental no meio ambiente, pois são responsáveis pela ciclagem de nutrientes participando principalmente do ciclo do carbono bem como contribuindo para a manutenção do ciclo do nitrogênio, fósforo e potássio (MOREIRA NETO, 2006). Desta forma, eles são de grande importância agrícola e ecológica, mantendo o equilíbrio do ambiente, pois, decompõem restos vegetais, degradam substâncias tóxicas, auxiliam as plantas a crescerem e se desenvolverem contra microrganismos patogênicos (SILVA e MALTA, 2016).

Dentre os resíduos ricos em matéria orgânica que os agaricomycetes são capazes de degradar destacam-se os denominados lignocelulósicos que apresentam composição que pode variar de acordo com o material proveniente, possuindo de 10 a 20% de lignina, 20 a 30% de hemicelulose e 50% ou mais de celulose. Estes fungos são os únicos capazes de metabolizar a molécula de lignina convertendo-a em gás carbônico e água sendo os maiores responsáveis pela degradação dos tecidos vegetais (PEDROSO, 2003; SIMÕES, 2015).

2.3.1 Cogumelo rei ou cogumelo do cardo – *Pleurotus eryngii*

Pleurotus eryngii é um cogumelo saprófito, comestível muito consumido no Mediterrâneo, Europa Central, Ásia, África do Norte e Turquia apresentando excelentes características organolépticas, propriedades medicinais, além de potencial para diferentes aplicações biotecnológicas e ambientais (ANDRINO et al., 2011; LEWINSOHN, 2002; KNOP et al., 2015). Conhecido popularmente como cogumelo do cardo ou cogumelo rei, *P. eryngii* pertence ao gênero *Pleurotus* que são eficientes na modificação e degradação da lignina devido a produção de enzimas extracelulares como lacases (fenol oxidases), lignina peroxidase e manganês peroxidase, permitindo que esses organismos sejam chamados habitualmente de fungos de podridão branca (MARTÍNEZ et al., 2005).

Devido às características supracitadas, os fungos deste gênero vêm sendo utilizados na degradação da matéria orgânica de origem agrícola e consequentemente direcionando o cultivo para uma solução sustentável e de melhor utilização desses recursos, além disto, o restante do material orgânico deixado pelos fungos apresenta melhor digestibilidade na alimentação bovina quando comparado ao material não colonizado (LABARÈRE e BOIS, 2002). Azevedo (2000) produziu *P. eryngii*, *L. sajor-saju* e *L. edodes* em condições controladas com resíduos lignocelulósicos em seis diferentes composições para avaliar a produção, a eficiência biológica e a digestibilidade “*in situ*” do composto para que o mesmo fosse utilizado como alimentação para o gado. Concluiu-se que alguns resíduos influenciaram benéficamente a eficiência biológica dos fungos e que no quesito digestibilidade o *P. eryngii* apresentou melhor relevância.

De acordo com Ranzani & Sturion (1999) todos os cogumelos pertencentes ao gênero *Pleurotus* possuem todos os aminoácidos considerados essenciais, com teor proteico na faixa de 42 a 66%, seu consumo é indicado para pacientes hipertensos, visto que um estudo realizado por Manzi et al. (1999) determinou que nestes organismos são encontradas abundantes concentrações de potássio, enquanto o sódio está presente em baixas concentrações. Gaitán-Hernandez (2005) avaliou três cepas *in vitro* do *P. eryngii* em diferentes meios de cultura para que fosse determinada sua adaptação a diferentes suplementos, foram realizados testes de frutificação em plantas piloto para observar as características morfológicas e mensuração da produtividade. O estudo concluiu que os processos de preparação, suplementação e tratamento térmico do substrato são fatores determinantes para o processo produtivo desta espécie dando, desta forma, início a uma série de pesquisas que buscou encontrar as melhores condições para a produção comercial no México.

Com o objetivo de determinar a produtividade de três espécies diferentes de *Pleurotus*, Ramos et al. (2011) cultivaram *P. ostreatus*, *P. sajor-caju* e *P. eryngii* em palha de trigo e avaliaram o comportamento das mesmas frente a diferentes atmosferas. Concluiu-se que a *P. ostreatus* é a mais produtiva, porém, *P. eryngii* produziu cogumelos de maiores dimensões, menos frágeis e mais resistentes pós-colheita; observou-se também que os cogumelos ao serem embalados tiveram melhor estabilidade e conservação com reduzida atividade fermentativa e fenômenos de senescência. Em contrapartida, ainda existe um longo caminho para que o cultivo de *P. eryngii* atinja o nível de produtividade considerado ótimo, visto que, associada a essa cultura existe uma série de patologias causadas por vírus e bactérias que podem influenciar a produtividade resultando em sua redução (RO et al., 2007; GONZALEZ et al., 2009).

Ao biodegradar resíduos da produção agrícola, alguns fungos acumulam vestígios de metais em concentrações muito superiores a outras culturas agrícolas (LEPSOVA e MEJISTRIK, 1988). Segundo Vural (1993) os metais pesados apresentam toxicidade mesmo em baixas concentrações sendo de suma importância estudos que avaliem os possíveis danos causados à saúde pela ingestão de cogumelos que acumularam estes elementos. Analisando o conteúdo de metais pesados presentes em *P. eryngii* cultivados em diferentes resíduos agrícolas Akyüz e Kirbağ (2010) ressaltaram que os resultados variam de acordo com o meio de cultura e que os elementos Cr, Cd, Co, Ni e Pb, não foram encontrados em níveis considerados significativos.

A aplicação medicinal do gênero *Pleurotus* spp. está em crescimento devido a diversas propriedades terapêuticas. Pois, os polissacarídeos que são extraídos dos agaricomycetes frescos são úteis no desenvolvimento de novas drogas antitumorais (MIZUNO e ZHUANG, 1995). Em seus estudos Kim et al. (2006) constataram que o metabolismo ósseo, em ratos com osteoporose foi amplificado com o uso de extrato retirado do basidioma de *P. eryngii*, resultando na formação de osteoblastos. Entretanto, relatam que se faz necessários novos estudos para que sejam descritos os componentes que estariam atuando neste processo.

A atividade antitumoral e imunomoduladoras do polissacarídeo PEPw extraído do *P. eryngii* foi testado em camundongos portadores de câncer renal por Yang et al. (2013). Nesse estudo foi observado que houve redução significativa dos volumes dos tumores nos camundongos tratados com PEPw de maneira dependente da dose, além disto, este polissacarídeo influencia na ativação do efeito cascata de respostas imunes celulares e tumorais, desta forma, os resultados são úteis para que sejam desenvolvidos novos medicamentos e alimentos funcionais. Entretanto, o mecanismo pelo qual a PEPw induz esses efeitos, bem como a utilidade clínica em terapias com câncer ainda não são bem conhecidos necessitando de estudos mais aprofundados.

2.3.2 Panus – *Panus strigellus* (Berk.)

Panus strigellus é um cogumelo comestível de origem amazônica produtor de variados metabólitos secundários biologicamente ativos e decompositor de madeiras podres ou enterradas, onde normalmente é encontrado sob vegetação densa e em áreas abertas (ISHIKAWA et al., 2009). Antigamente o *P. strigellus* foi considerado como sinônimo de *P. lecomtei*, porém, as duas espécies são consideradas distintas baseando-se em características micromorfológicas (PEGLER, 1983). O fungo em questão possui a sinonímia de *Lentinus strigellus* Berk. mas, o epíteto “*strigellus*” é considerado mais antigo e a combinação *P. strigellus* é válida (VARGAS-ISLA, 2012).

Uma amostra coletada por Prince (1973) no estado de Roraima, localizado no Brasil, é considerado um inusitado registro sobre a comestibilidade de *P. strigellus* e está depositado no Herbário do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) (VARGAS-ISLA, 2012). Porém, comparado com outros cogumelos comestíveis, o *P. strigellus* é considerado como membro do grupo dos cogumelos medicinais (LIN et al., 2004). Autores como Mendes et al. (2014) desenvolveram um trabalho onde avaliaram a influência de diferentes comprimentos de onda na produção de biomassa e na produção de compostos antimicrobianos de *P. strigellus*, visto que, a luz afeta o desenvolvimento dos fungos em diferentes aspectos. Suas conclusões foram de que não ocorreu influência da luminosidade na formação de biomassa do fungo, somente na formação dos primórdios de frutificação influenciado pelo comprimento de onda referente a cor azul; quanto a atividade antimicrobiana, percebeu-se maior atividade nos tratamentos com a luz vermelha e na ausência de luz em detrimento da luz azul que apresentou menor atividade microbiana.

A temperatura é outro fator de forte influência no crescimento e desenvolvimento dos fungos (VARGAS-ISLA e ISHIKAWA, 2008). Com base nessas informações, Chaves et al. (2011) avaliaram o efeito da temperatura de incubação no crescimento micelial e na atividade microbiana de *P. cf. strigellus*, incubados a 25 e 35 °C. Foi observado que a 35 °C a biomassa micelial do fungo é maior, porém, a produção de metabólitos antimicrobianos ocorre apenas no desenvolvimento do fungo em temperatura de 25 °C. Autores como Silva et al. (2012) avaliaram o quanto a produção de biomassa micelial e a atividade microbiana de *P. strigellus* são influenciados por diferentes meios de cultura onde foi confirmada a influência desses dois fatores de estudo analisados bem como o direcionamento para o uso de meios de cultura alternativos com resultados positivos e promissores.

2.3.3 Cogumelo do imperador – *Ganoderma lucidum* (Fr.)

Ganoderma lucidum é um basidiomiceto utilizado há mais de 2000 anos na medicina chinesa tradicional, tendo relatos da sua existência em antigos manuscritos (SEO e KIRK, 2000). São produzidos e consumidos tradicionalmente nos países asiáticos, sobretudo no Japão, China e Coreia, entretanto, em diferentes países da América e Europa a produção e o consumo encontram-se em ascensão (URBEN et al., 2004). No Japão o *G. lucidum* é conhecido como “Reishi” ou “Mannentake” sendo tratado como “ervas da boa fortuna e da longevidade”, na China é chamado de “Lingzhi” ou “Cogumelo da Imortalidade”. Já no Brasil, esse cogumelo é denominado “Cogumelo do Imperador”, “Cogumelo Rei” ou “Cogumelo Brilhante” (ROLIM, 2006).

O fungo *G. lucidum* é conhecido milenarmente como agente promotor da saúde devido ao seu potencial em exercer importantes atividades farmacológicas, especialmente como agente imunomodulador, antitumoral, hipocolesterolêmico e antioxidantes, possibilitando o desenvolvimento e aplicação em novos fármacos e produtos nutracêuticos (WACHEL-GALOR et al., 2004). Estas aplicações se dão devido a uma série de substâncias químicas

como polissacarídeos, conferindo ao fungo as atividades biológicas e o uso terapêutico supracitados (ROLIM, 2006). O alto poder farmacológico do *G. lucidum* é devido a compostos incluindo proteínas, esteroides, triterpenóides, alcaloides, enzimas, lactonas, sais minerais, ácidos orgânicos e ácidos graxos, já o seu poder nutracêutico se deve ao fato deste fungo conter baixas calorias e ser rico em vitaminas, quitina, proteínas e sais minerais (URBEN et al., 2004).

Devido ao crescente mercado de consumo de *G. lucidum* se faz necessário o cultivo para atender a demanda, visto que, o encontrado na natureza não é o suficiente. Com o intuito de se produzir em escala que atenda o mercado, diversos estudos vêm sendo desenvolvidos buscando novos e mais eficientes métodos de cultivos, resultando no crescimento da produção e de estímulo para a síntese dos compostos terapêuticos (BAO et al., 2002; TANG e ZHON, 2003; HSIESH et al.; 2005). De acordo com CHIU et al. (2000) a variedade de compostos com diferentes atividades biológicas que são extraídos do micélio, corpos de frutificação ou esporos estão relacionados a efeitos antitumorais.

Os autores Muruyama et al. (1989) foram responsáveis por um dos primeiros relatórios publicados analisando os efeitos antitumorais do *G. lucidum*. Nesse estudo observou-se que o extrato aquoso do fungo foi capaz de inibir o crescimento do sarcoma murino 180 no tecido subcutâneo de forma substancialmente eficaz; este resultado foi justificado devido a uma fração rica de carboidratos que foi obtida através da técnica de cromatografia de troca iônica que produziu efeitos significativos quando os animais foram inoculados intraperitonealmente. Já Rubel (2006) desenvolveu o cultivo submerso de *G. lucidum* testando diferentes variáveis físico-químicas buscando obter a produção máxima de polissacarídeos, a proposta do estudo foi pesquisar a atividade imunomoduladora, antitumoral e hipolipidêmica em camundongos que consomem a ração suplementada com o fungo. Foi concluído que o *G. lucidum* é considerado uma importante fonte de princípios ativos, quanto ao seu potencial terapêutico nesse caso, contudo são necessários estudos mais aprofundados.

Buscando compreender a influência de uma dieta enriquecida com um complexo contendo *G. lucidum* em pacientes com diferentes tipos de câncer em tratamento com quimioterapia e/ou radioterapia, os autores Zhung et al. (2009) concluíram que houve diminuição da leucopenia e neutropenia além do retardo na diminuição da contagem de linfócitos CD4 e células NK sendo este fato atribuído pela atividade dos polissacarídeos presentes no fungo. Entretanto, o complexo utilizado na dieta foi preparado com outros fitoterápicos impedindo concluir que efeito final foi devido ao *G. lucidum*.

Em seu estudo para analisar e comparar a eficiência biológica e o rendimento de sete linhagens de *G. lucidum* cultivadas em substrato à base de serragem de eucalipto, Viana (2014) concluiu que entre as diferentes linhagens não houve diferencial estatístico entre a eficiência biológica e o rendimento. Em outro momento foi quantificado as concentrações de β -glucanas, fenólicos totais e proteínas nos basidiomas das linhagens cultivadas com um composto de 80% de serragem e 20% de farelos de trigo e soja onde observou que a concentração das substâncias analisadas sofreu interferência das linhagens bem como não é constante a relação direta das substâncias em questão.

Baseando-se nos conhecimentos prévios de que a β -glucana extraída do *G. lucidum* causa mudanças benéficas na microbiota de camundongos, Castro (2020) desenvolveu um estudo com o objetivo de determinar a importância da modulação da microbiota bacteriana pelo fungo *G. lucidum* em modelos murinos experimentais de colite e doença de Parkinson induzidas. A dieta dos animais foi suplementada com a substância extraída do fungo demonstrando resultados promissores relacionados a redução de diferentes patologias intestinais, já em relação ao Parkinson, outros estudos e modelos se fazem necessários para uma melhor compreensão.

2.3.4 Ecologia dos Agaricomycetes

Os fungos decompositores, por sua própria natureza, esgotam continuamente os recursos orgânicos em que crescem e se alimentam. Portanto, eles dependem de uma disseminação contínua e bem-sucedida para novos recursos (BODDY e HISCOX, 2016). Nos ecossistemas terrestres, os recursos são distribuídos de forma heterogênea no espaço e no tempo (BODDY, 1984; 1999). Ainda segundo Boddy e Hiscox (2016), os processos de chegada e disseminação são, portanto, cruciais para o sucesso dos fungos saprotróficos. Após a chegada a um recurso, sua habilidade competitiva determina se eles são bem-sucedidos na colonização e por quanto tempo eles retêm aquele território. Em vista do grande número de fungos decompositores e da variedade de material orgânico que está disponível para eles se alimentarem estes organismos desenvolveram uma série de estratégias de história de vida diferentes para lidar com o ambiente em que habitam; os três fatores principais são estresse (selecionado por S), perturbação (selecionado por R ou ruderal), incidência de competidores (selecionado por C) ou uma combinação destes (COOKE e RAYNER, 1984; BODDY e HEILMANN-CLAUSEN, 2008) (Tabela 1).

Tabela 1. Características que definem as estratégias de história de vida de espécies ruderais, combativas e tolerantes ao estresse.

Características	Ruderal - R	Combativo - C	Tolerante ao estresse – s
Atributos	Crescimento rápido; captura de recursos primários	Tolerância a estresses específicos (temperaturas extremas, baixa disponibilidade de água, pH extremamente baixo ou alto, produtos químicos alelopáticos)	Habilidade antagônica contra concorrentes
Taxa de crescimento	Germinação e crescimento rápido de esporos	Algumas vezes lento	Particularmente não é lento
Capacidade enzimática	Habilidade relativamente estreita	Ampla habilidade	Ampla habilidade
Substrato utilizado	Facilmente assimilável	Mais recalcitrante	Mais recalcitrante

Continua...

Continuação da Tabela 1.

Características	Ruderal - R	Combativo - C	Tolerante ao estresse – s
Tempo de reprodução	No início do ciclo de vida	Mais tarde no ciclo de vida, algumas vezes esporádico	Mais tarde no ciclo de vida, algumas vezes esporádico
Relação: Biomassa x Reprodução	Rápido e substancial	Relativamente baixo	Relativamente baixo
Persistência dentro do recurso	Baixo; facilmente substituído	Persistente enquanto o estresse específico permanece	A persistência depende da capacidade de capturar e defender o território

Fonte: Boddy e Hiscox (2016), adaptada.

A variabilidade temporal entre os tempos de chegada das espécies também mostrou influenciar as taxas de decomposição da madeira (FUKAMI et al., 2010). A variabilidade no tempo ou quantidade de propágulos que se dispersam para um determinado local parece ser um mecanismo importante para gerar variabilidade nas interações bióticas (FUKAMI et al., 2007; CHASE, 2010). A variação espacial e temporal na abundância de corpos de frutificação de cogumelos está bem estabelecida a partir de pesquisas de campo. No entanto, devido ao esforço e especialização taxonômica exigidos, tais levantamentos são frequentemente limitados a visitas raras a áreas relativamente restritas (EGLI et al., 2006; GANGE et al., 2007; ROBERTSON e BRANDYS, 2011; PEAY e BRUNS, 2014).

2.3.5 Agaricomycetes e seu papel como decompositor

Os agaricomycetes são encontrados em diferentes ambientes como solo, água, plantas, animais, ser humano e em detritos orgânicos. São popularmente conhecidos como bolores, mofos, orelhas-de-pau e cogumelos, os fungos se alimentam de substâncias orgânicas de origens variadas, como folhas caídas, restos de animais mortos e outros resíduos orgânicos, de forma que atuam como decompositores, reciclando os constituintes da matéria orgânica que compõe os seres vivos (SANTIAGO et al., 2010). Sabe-se de longa data que em ecossistemas florestais os fungos são os principais decompositores de celulose e lignina, os componentes primários da madeira. A produção de biomassa em um ecossistema florestal é, em grande parte, encontrada por fungos degradadores de madeira que são responsáveis por determinar as taxas de nutrientes liberados e seu retorno ao ecossistema após a morte das árvores (AGUIAR et al., 1969).

Os fungos da decomposição da madeira são fundamentais para a degradação da lignocelulose recalcitrante e, portanto, para o ciclo global do carbono (HISCOX et al., 2018). Com aproximadamente 80 Tg de carbono sequestrado na biomassa lenhosa anualmente (LUYSSAERT et al., 2010, BELLASSEN e LUYSSAERT, 2014), compreender os mecanismos subjacentes à dinâmica da comunidade desses fungos é crucial para compreender totalmente os processos de decomposição e para modelar a função do ecossistema e a resiliência às mudanças ambientais (BARDGETT et al., 2008, CHAPIN et al., 2009, MCGUIRE e TRESEDER, 2010).

A competição parece ser o tipo mais comum de interação entre os agaricomycetes em decomposição da madeira impulsionando o desenvolvimento da comunidade em recursos lenhosos em decomposição. Seus micélios colonizam recursos orgânicos sólidos e utilizam seus nutrientes, de modo que a competição por território e nutrientes não pode ser

individualizada. As interações podem ocorrer à distância, após o contato no nível das hifas (micoparasitismo) ou após o contato no nível do micélio (BODDY e HISCOX, 2017; BODDY, 2000).

2.4 Relação entre o Cultivo de Agaricomycetes e Drenagem de Carbono

Uma das formas mais viáveis de cultivar cogumelos com eficácia é a utilização de material lignocelulento de origem local, que muitas vezes é um resíduo da agricultura e da exploração madeireira (PAULLI, 1996; BUSWELL e CHANG, 1994; CHANG e WASSER, 2017). Segundo Pavlík et al. (2020), as condições de cultivo, como composição do substrato, luz, temperatura e composição química, física e biológica do ar têm impacto significativo na qualidade dos corpos frutíferos. Entretanto, as informações sobre a produção de CO₂ por cogumelos cultivados em condições naturais ou de laboratório são bastante escassas. Ainda de acordo com o autor, a quantificação objetiva do efluxo de CO₂ durante o processo de cultivo é fundamental, considerando a necessidade de cultivo em grandes quantidades de corpos frutíferos, o que indubitavelmente terá um impacto significativo no meio ambiente. Artigos científicos que tratam da respiração micelial de espécies individuais de fungos estão focados principalmente na produção de CO₂ por fungos de madeira morta (HERRMANN e BAUHUS, 2012; KAHL et al., 2015).

As informações sobre a respiração micelial são importantes não apenas devido a quantificação do carbono emitido na atmosfera devido aos processos de decomposição da madeira, mas também como informações necessárias aos agricultores que cultivam e utilizam para a demanda de alimentos e medicamentos. Sabe-se que o micélio necessita de alta concentração de CO₂ no momento do supercrescimento do substrato. Porém, durante a fase primordial de crescimento, é necessário reduzir a concentração de CO₂ no ambiente por meio de ventilação intensa (STAMETS, 2000; GOLIAN et al., 2015).

Segundo Pavlík et al. (2020) a respiração é um reflexo da atividade metabólica do micélio durante seu desenvolvimento e as abordagens metodológicas para a determinação da taxa de respiração do micélio ainda não foram claramente estabelecidas. Portanto, uma pesquisa focada em fatores ambientais, dinâmica temporal e abordagens metodológicas para quantificação da respiração micelial se faz necessária para uma estimativa mais precisa da contribuição dos fungos para o ciclo global do carbono, bem como orientação para o planejamento da agricultura de alta tecnologia.

2.5 Capacidade Produtiva dos Agaricomycetes

Os fungos comestíveis silvestres são um importante recurso socioeconômico em muitas regiões do mundo. Mais de 2.000 fungos são conhecidos por produzir esporocarpos comestíveis (BOA, 2004). Em virtude disso, na última década, o valor de mercado, a demanda do consumidor e o interesse no manejo de florestas para produtos não madeireiros aumentaram (DÍAZ-BALTEIRO et al. 2003; PILZ, et al. 1999). De acordo com Royse et al. (2017), o consumo global de cogumelos, de 1993 a 2013, aumentou de 1 para 4,7 kg (peso fresco) por pessoa ao ano. O mercado de cogumelos foi avaliado em cerca de 63 bilhões de dólares em 2013, dos quais apenas 8% foram representados por cogumelos selvagens. A produção global de cogumelos comestíveis cultivados aumentou cerca de 30 vezes desde 1978, para cerca de 34 milhões de toneladas anuais. A China é de longe o maior produtor de cogumelos do mundo, respondendo por cerca de 87% da produção global em 2013.

De acordo com a Associação Nacional dos Produtores de Cogumelos, no Brasil, o consumo per capita de cogumelos é de aproximadamente 160 g por ano, muito abaixo de países Asiáticos, como a China, onde o consumo per capita é de 8 kg por ano (ANPC, 2018).

O Censo Paulista de produção de cogumelos comestíveis e medicinais, realizado por Gomes et al. (2016), aponta que a maior parte dos produtores nacionais está localizada no estado de São Paulo, com uma estimativa de pouco mais de 500 produtores neste estado, empregando ao menos 5000 indivíduos, com uma produção anual de 1.062.008 toneladas, gerando uma receita de R\$ 21.240.017,00 por ano. Os autores ressaltam que os dados nacionais são difíceis de serem reunidos, em virtude da fragmentação da cultura e por esta ser relativamente recente.

Este fato é evidenciado pelo Brasil não aparecer entre os maiores países produtores segundo a FAO (Figura 4), sendo que de acordo com o censo previamente citado, a produção nacional anual colocaria o país logo abaixo da China. Portanto, trata-se de um produto de grande importância econômica e social, sendo uma alternativa de complementação de renda ou até mesmo a principal atividade de diversos produtores pelo mundo, empregando milhares de indivíduos (MARTINS, 2019).

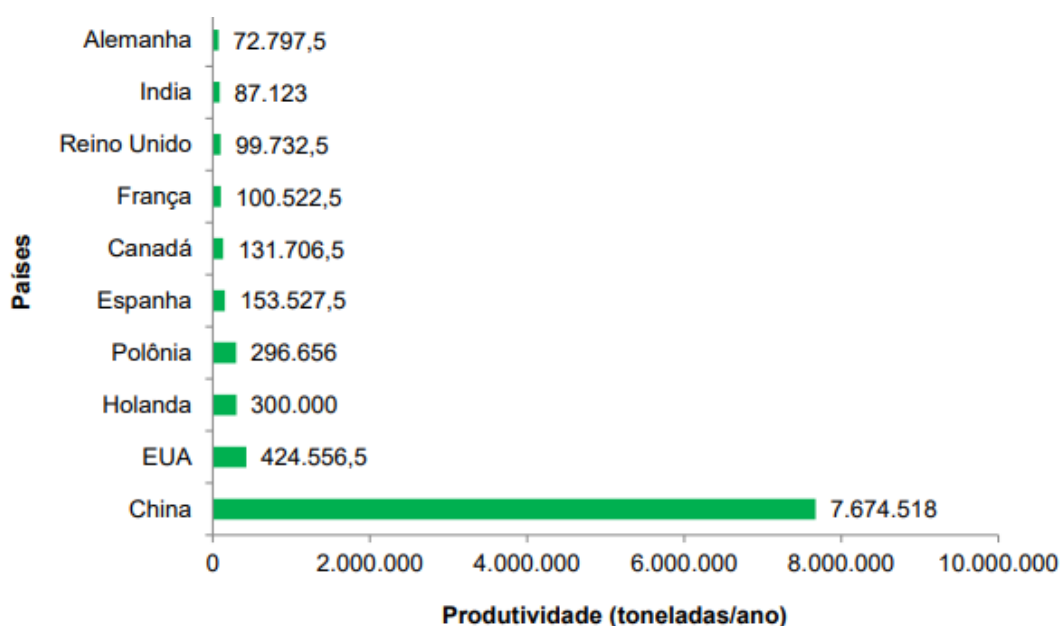


Figura 4. Os dez maiores países produtores de cogumelos, em toneladas/ano, no período de 2016-2017. Fonte: FAO (2019), adaptado por Martins, 2019.

Este recurso não é apenas uma fonte de alimento, mas também pode ser um importante gerador de renda em áreas florestais rurais, se usado corretamente (BARROETAVEÑA et al., 2008; BOA, 2004). Inclusive, os cogumelos comestíveis também representam a base de múltiplos produtos feitos pelos fabricantes, assim como os medicamentos, e são a fonte de uma nova onda de turismo resultante de programas recreativos ligados à natureza (MARTÍNEZ-PEÑA et al., 2011). Praticamente todas as espécies cultivadas de cogumelos têm um estilo de vida saprotrófico, o que significa que são decompositores de matéria orgânica. O cogumelo cultivado líder mundial é o *Lentinula edodes*, seguido pelos *Pleurotus* spp., que são as espécies de cogumelos mais populares nos países ocidentais (RAHMANN et al., 2017).

Em média, cerca de 5 kg de substrato de cogumelo gasto são produzidos por kg de cogumelos (FINNEY et al., 2009). Portanto, uma vez que 34 milhões de toneladas de cogumelos são produzidos globalmente por ano, a quantidade de substrato gasto pode ser de aproximadamente 170 milhões de toneladas (ROYSE et al., 2017). No entanto, Stamets (1993) fala de uma proporção de 2:1 de substrato gasto para cogumelos (*Pleurotus* spp.), sem especificar se isso é com base no peso seco ou no peso fresco (FINNEY et al., 2009). A falta de clareza sobre esse assunto na literatura sobre cogumelos é totalmente surpreendente

(GRIMM e WÖSTEN, 2018). A quantidade e qualidade do substrato de cogumelo gasto como composto depende dos ingredientes do substrato, espécie de cogumelo cultivado e método de cultivo. O cultivo de uma única espécie de cogumelo não resultará na decomposição completa dos materiais. O cultivo de várias espécies de cogumelos em sucessão no mesmo substrato ou posterior compostagem do substrato de cogumelos usado resultará, entretanto, na produção de solo fértil (STAMETS, 1993).

2.6 Biomassa Produzida por Agaricomycetes

Os fungos são onipresentes na natureza e possuem vias bioquímicas exclusivas para assimilar uma vasta gama de substratos disponíveis (PAPASPYRIDIS et al., 2010). Os basidiomicetos apresentam respostas fisiológicas ao meio ambiente, geralmente específicas da cepa. Há uma alta variabilidade para a produção de biomassa micelial, exopolissacarídeos e antioxidantes entre diferentes espécies e até mesmo entre cepas da mesma espécie, tornando-se essencial avaliar as espécies e cepas separadamente para identificar fungos com potencial biotecnológico (UMEO et al., 2015; 2020).

A produção de biomassa micelial é considerada mais segura do que os basidiocarpos, pois eles podem acumular pesticidas e metais pesados de substratos agroindustriais (VIEIRA et al., 2013, YOKOTA et al., 2016). A bioacumulação de metais nutricionais na biomassa micelial de cogumelos comestíveis e medicinais é uma alternativa de fonte mineral não animal associada às atividades funcionais e medicinais dos agaricomycetes (UMEO et al., 2020). Além disso, a bioacumulação de íons é maior na biomassa micelial do que os basidiocarpos (YOKOTA et al., 2016). O cultivo de biomassa micelial pode produzir compostos bioativos em um período mais curto e controlado do que o cultivo de cogumelos (ALMEIDA et al., 2015). Assim, a biomassa micelial é uma alternativa para a bioacumulação de metais nutricionais e farmacêuticos, como zinco (MARCANTE et al., 2014), lítio (FARIA et al., 2018, 2019) e ferro (ALMEIDA et al., 2015).

Para os cogumelos, o aumento da concentração de metal no meio de cultura aumenta a capacidade de bioacumulação. Além disso, alguns metais podem afetar o rendimento de alguns compostos, como cobre que induz a atividade de lacase, lítio que reduz a produção de biomassa micelial e ferro que reduz a produção de cogumelos e a atividade antioxidante (UMEO et al., 2020, BELLETTINI et al., 2019, VALLE et al., 2015, FARIA et al., 2018, 2019, YOKOTA et al., 2016). Inclusive Jung et al. (2003) investigaram o efeito de frutas desbastadas, maçã, pêra e pêssego no crescimento micelial do *Pleurotus* spp., encontrando rendimentos de biomassa superiores aos encontrados no meio controle. Autores como Matute et al. (2011) relataram que a biomassa micelial de *Ganoderma lucidum* também acumulou zinco de maneira dependente da dose e que a concentração de zinco foi fortemente inibidora para o crescimento da biomassa micelial.

A maior capacidade do basidiomiceto de bioacumular ferro em comparação ao zinco pode estar relacionada à alta demanda de ferro nos processos metabólicos. Embora o ferro seja essencial para o metabolismo dos fungos, em altas concentrações ele pode liberar radicais livres que causam inibição enzimática, deslocamento ou substituição de íons e ruptura da membrana que afetam o metabolismo e a reprodução dos fungos (GADD, 2007). Além disso, pode ocorrer uma orientação energética do metabolismo para produzir compostos protetores ao ferro e, portanto, reduzir a energia utilizada para o crescimento dos fungos (HAAS, 2003), o que explicaria a redução do crescimento da biomassa micelial no meio de cultivo com adição de ferro ou zinco.

Raramente é possível separar totalmente a biomassa do fungo do substrato, devido ao crescimento interno do fungo no substrato. A massa do substrato também muda com o tempo, devido à decomposição e consumo do substrato pelo fungo. Consequentemente, a biomassa

fúngica não pode ser determinada diretamente, mas deve ser estimada com métodos indiretos (STEUDLER e BLEY, 2015). A biomassa pode ser determinada indiretamente usando métodos físicos e bioquímicos (KRISHNA, 2005; BHARGAV et al., 2008). Estas técnicas são normalmente baseadas na quantificação de componentes específicos de células encontrados em fungos, ergosterol (KLAMER e BAATH, 2004), glucosamina (SCOTTI et al., 2001; DESGRANGES et al., 1991), quitina (MATCHAM et al., 1985), ácidos nucleicos e proteínas (OOIJKAAS et al., 2000), ácidos graxos fosfolipídicos específicos de fungos (PLFA) (KLAMER e BAATH, 2004) e esporos e conídios (DESGRANGES et al., 1991; STAHL et al., 1999). Alternativamente, podem ser usadas estimativas do conteúdo total de carbono ou do conteúdo de água intracelular da biomassa fúngica (LARROCHE e GROS, 1992, OOIKAAS et al., 2000). Outra abordagem é baseada em medições de atividade biológica, como taxa de respiração, atividade enzimática, atividade imunológica (ANAND e RATI, 2006), taxas de produção de metabólitos, consumo de nutrientes e ATP (LARROCHE e GROS, 1992, DESGRANGES et al., 1991, KRISHNA, 2005; MATCHAM et al., 1985; REESLEV et al., 2003, KRISHNA, 2005; SHANKARANAND e LONSANE, 1994, DESGRANGES et al., 1991).

Nesta linha de raciocínio, além dos indicadores anteriores, a biomassa tem sido também estimada e por vezes com sucesso limitado, medindo as propriedades físicas como mudanças na temperatura, condutividade, composição do gás, comprimento e diâmetro das hifas ou por inspeção visual usando várias técnicas baseadas em microscopia de estereomicroscópio, microscopia eletrônica de varredura e microscopia de epifluorescência (STAHL et al., 1999, KRISHNA, 2005, DAVEY et al., 1991, KRISHNA, 2005, STAHL et al., 1999, COURI et al., 2006, NOPHARATANA et al., 2003). Autores como Steudler e Bley (2015) obtiveram estimativas de biomassa de *Trametes hirsuta*, com base no conteúdo de glucosamina, significativamente menores do que os valores de biomassa determinados gravimetricamente e permaneceram em um nível relativamente constante de aproximadamente 15 mg ao longo do experimento, exceto para o micélio de três dias, para o qual a biomassa calculada foi muito maior (46,4 mg) do que a biomassa medida (7 mg). A influência pronunciada da idade do micélio nos resultados da medição de biomassa pela quantificação de glucosamina observada nesse estudo também foi descrita por Matcham et al. (1985).

Outros estudos têm mostrado resultados diferentes, Scotti et al. (2001) e Desgranges et al. (1991) não detectaram impacto significativo da idade do micélio na estimativa de biomassa com base no conteúdo de glucosamina. Uma possível razão para esses resultados conflitantes é o uso de diferentes microrganismos. Assim como no estudo de Matcham et al. (1985), com cultivo de cogumelos (*T. hirsuta* e *Agaricus bisporus*), Scotti et al. (2001) usaram um zigomiceto (*Cunninghamella elegans*) e Desgranges et al. (1991) usou um ascomiceto (*Beauveria bassiana*). Ao contrário dos basidiomycetes, os ascomycetes e os zigomycetes esporulam sem formar corpos frutíferos (STEUDLER e BLEY, 2015). Ainda de acordo com esses autores, os basidiomas são geralmente excluídos das determinações de biomassa de agaricomycetes, portanto, as amostras de biomassa normalmente não incluem quaisquer esporos. Consequentemente, a produção e concentração dos componentes da parede celular serão diferentes entre os três táxons. Enquanto o uso de agaricomycetes reduz o impacto da esporulação na análise de biomassa, o uso de outros táxons pode ter outros benefícios.

As estimativas de biomassa com base no número de núcleos de fungos foram mais semelhantes aos valores determinados gravimetricamente para amostras de micélio de sete dias de idade. Para micélios mais antigos, os valores estimados foram consistentemente menores do que os valores determinados gravimetricamente. Tal como acontece com as estimativas baseadas no conteúdo de ácido nucleico, e por razões semelhantes, esses valores diminuíram com o aumento da idade do micélio. No entanto, essa tendência pode ser

corrigida por meio de uma etapa de calibração adicional, conforme descrito por Steudler et al. (2014).

Outros estudos também descobriram que os valores de biomassa, obtidos por todos os métodos aplicados (Figura 5), tem interferência do meio ou substrato através de seus teores de nutrientes, degradabilidade e impurezas, influenciando assim, diretamente no crescimento do fungo, ou seja, a biomassa total, os níveis de componentes celulares e as atividades metabólicas são todos afetados pelo substrato (OOJIKAS et al., 1998; DESGRANGES et al., 1991; KLAMER e BAATH, 2004). Portanto, as estimativas de biomassa com base no conteúdo de ácido nucleico são influenciadas pelas atividades metabólicas relacionadas ao substrato das células fúngicas, além da biomassa. Ademais, o substrato afeta não apenas a formação da biomassa fúngica e, portanto, a abundância de componentes celulares, mas também a quantificação desses componentes (por meio dos chamados efeitos de matriz). Existem dois tipos de efeitos de matriz: interferência de componentes no substrato diferentes dos compostos-alvo e interferência resultante da presença de compostos-alvo no substrato (STEUDLER e BLEY, 2015).

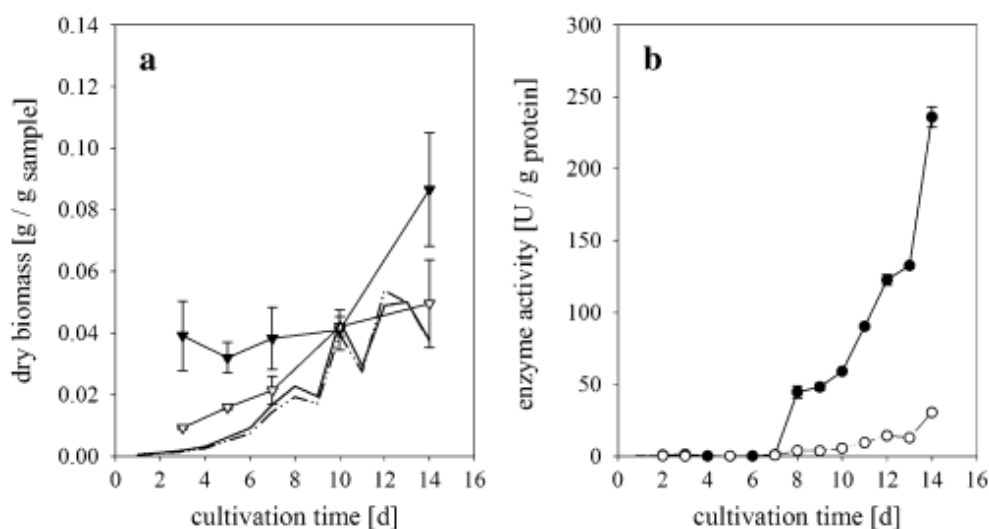


Figura 5. Comparação dos valores de biomassa (a) calculados usando o teor de ergosterol (triângulos abertos), número de núcleos (triângulos sólidos), consumo diário de oxigênio (linha contínua) e produção diária de dióxido de carbono (linha tracejada) e atividade enzimática lignolítica (b) de lacases (círculos sólidos) e peroxidases não específicas (círculos abertos), conforme usado para avaliar o crescimento de *T. hirsuta* cultivado em silagem de milho por 14 dias a 28 °C (n = 5). Fonte: Steudler e Bley, 2015.

Outros estudos estimaram a produção de biomassa indiretamente por meio da determinação do teor de glucosamina (PAPADAKI et al., 2019). O conteúdo de glucosamina das cepas do *Pleurotus* spp. variaram de 18,5 a 20,3 mg. g⁻¹ de biomassa seca, o que foi significativamente maior do que estudos anteriores (3,6 mg. g⁻¹) para *P. ostreatus* cultivado em cascas de amendoim (MISHRA e KUMAR, 2007). Este método tem sido amplamente aplicado para determinar a produção de biomassa durante a fermentação de vários cogumelos, incluindo *Lentinula edodes*, *Pleurotus* spp., *Ganoderma* spp. e *Morchella* spp. (ECONOMOU et al., 2017; PAPADAKI et al., 2019; PHILIPPOUSSIS et al., 2011).

Geralmente, o conteúdo de glucosamina na massa micelial depende do meio, espécies de fungos e das condições de cultura (PHILIPPOUSSIS et al., 2011). Assim a produção da enzima foi afetada pelo modo de fermentação no processo de bioconversão do bagaço de uva por *Pleurotus* spp. O rendimento satisfatório de cogumelos e eficiência biológica foram

observados no caso de *P. pulmonarius*, comprovando que o bagaço de uva pode ser um substrato alternativo para o cultivo de cogumelos (PAPADAKI et al., 2019). Qualquer pesquisa futura poderia se concentrar na otimização dos pré-tratamentos de aquecimento do bagaço de uva, visando a atividades enzimáticas e rendimentos de cogumelos mais elevados (KARPE et al., 2014). Outra questão relevante são os dias necessários para o crescimento total do micélio. De acordo com Diamantopoulou et al. (2019), *P. ostreatus* demonstrou maior taxa de crescimento ($K_r \cong 1,5$ mm/dia) e produção de biomassa sobre as cepas de *P. eryngii*. As cepas de *P. ostreatus* 144, 140 e *P. eryngii* 166, 173-176 foram os colonizadores mais rápidos e, na maioria dos casos, os produtores da quantidade máxima de glucosamina (valores médios 250-290 mg.g⁻¹ d.w.). Excepcionalmente, *P. ostreatus* 137 produziu 450 mg.g⁻¹ d.w. em serragem de choupo.

Já o estudo de Vargas-Isla (2012) demonstra que houve diferenças significativas entre os isolados de *Panus strigellus* no meio de cultura de amido e *tween* avaliados durante cinco dias de cultivo. A maior biomassa seca foi obtida em meio de cultura de amido (Figura 6), devido a decomposição de alguns biopolímeros, celulose, amido e hemicelulose que fornecem carbono e energia para o crescimento (BALDARIAN, 2008). As hifas secretam enzimas que quebram materiais insolúveis, como celulose e lignina na madeira e os convertem em açúcares simples que se difundem de volta para as hifas fúngicas, onde são absorvidos (PRZYBYLOWICZ e DONOGHUE, 1990).

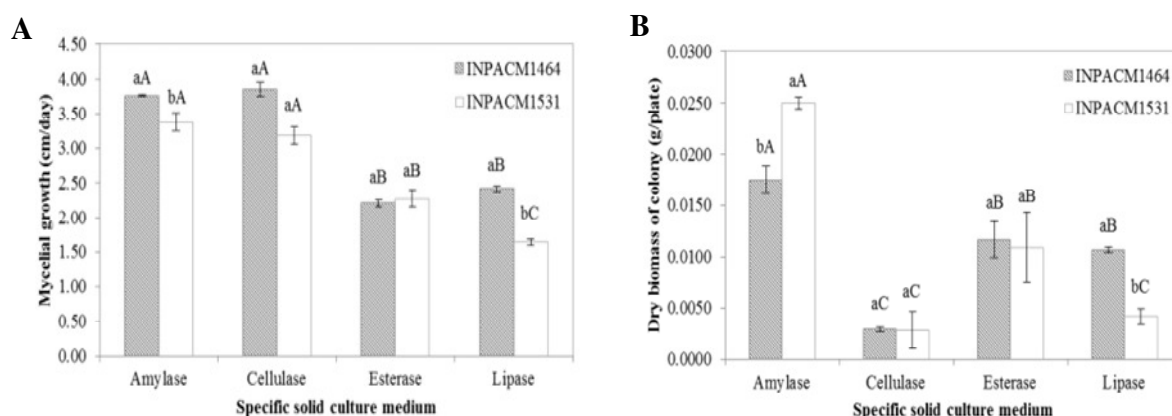


Figura 6. Cultivo de isolados de *Panus strigellus* em meios de cultura enzimático sólidos em cinco dias de crescimento micelial a 35°C. (A) crescimento micelial (cm/dia); (B) biomassa seca (g/placa). Os resultados representam a média de cinco repetições. Médias com a (s) mesma (s) letra (s) minúscula (s) não são significativamente diferentes entre os isolados e as médias com a (s) mesma (s) letra (s) maiúscula (s) não são significativamente diferentes entre meios de cultura enzimáticos ($p < 0,01$) pelo teste de Tukey. Fonte: Vargas-Isla, 2012.

Todavia, nem sempre foi detectada uma correlação entre a produção de biomassa e os diversos substratos. Outros estudos relataram que a taxa de crescimento e a produção de biomassa foram negativamente relacionados (PHILIPPOUSSIS et al., 2011, PHILIPPOUSSIS e DIAMANTOPOULOU, 2012). Para palha de trigo e cevada e aveia, houve uma relação linear entre a quantidade de glucosamina e a taxa de crescimento de micélio, enquanto o resíduo de algodão com uma das menores taxas de colonização (K_r médio = 1,01 mm. d⁻¹) apresentou uma das maiores produções de biomassa (Gluc média = 280,25 mg .g⁻¹ dw) (DIAMANTOPOULOU et al., 2019).

Os resultados de um estudo realizado com *Ganoderma lucidum* mostram que os fatores pH, agitação e aeração interferem na variável resposta biomassa e, portanto, valores de

otimização podem ser levados em consideração (Figura 7) (AGUDELO-ESCOBAR et al., 2017).

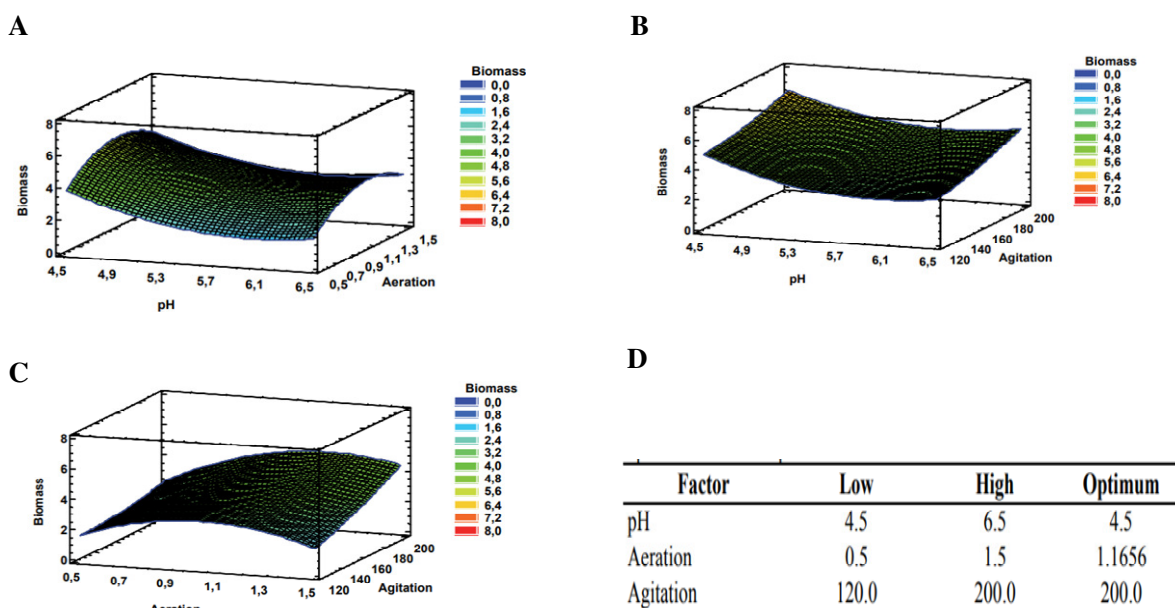


Figura 7. Estimativa da superfície resposta para biomassa. (A) pH variável e aeração em agitação constante de 160 rpm; (B) pH variável e agitação com aeração constante de 1,0 vvm; (C) aeração e agitação como variáveis e pH constante de 5,5; (D) valores de otimização para variável de resposta para biomassa. FONTE: Agudelo-Escobar et al., 2017.

Foi relatado pelos autores Agudelo-Escobar et al. (2017) que o aumento da produção de biomassa de *G. lucidum* foi obtido pelo uso de combinações de valores médios para aeração e valores mais baixos para pH dentro da faixa avaliada. Esses resultados confirmam que altos valores de agitação combinados com valores médios de aeração ou mesmo altos valores de aeração favorecem a produção de biomassa. A Figura 8D demonstra a combinação dos níveis dos fatores aeração, agitação e pH dentro das faixas avaliadas, com as quais o máximo da produção de biomassa seria alcançada. Para obter um valor de biomassa de 6,73 g. L⁻¹ em cultura submersa, deve-se estabelecer um pH de 4,5, aeração de 1,17 e agitação de 200 rpm.

Muitos fatores afetam o cultivo de biomassa, incluindo pH, velocidade de agitação, taxa de transferência de oxigênio, concentração de glicose e temperatura (AHMAD et al., 2013; ESPINOSA-ORTIZ et al., 2016; WU et al., 2016). Portanto, para melhorar o cultivo de biomassa, onde os parâmetros-chave interagem entre si de maneira complexa, a metodologia de superfície de resposta representa a solução mais eficaz (CHANGTSAI e HOUNG, 2006; YUANCHI e ZHANG, 2012; AHMAD et al., 2013; SUPRAMANI et al., 2019).

2.7 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A matéria orgânica encontrada no solo é considerada um dos maiores reservatórios de carbono orgânico do planeta sendo de suma importância a compreensão química dos processos e complexos existentes neste local possibilitando a avaliação precisa de diferentes interações ecológicas (PICOLLO et al., 2008). O estudo espectroscópico da matéria orgânica do solo (MOS) bem como de amostras biológicas fornece importantes informações sobre a caracterização do carbono orgânico existente em suas estruturas moleculares. Dentre os métodos conhecidos destaca-se a espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)

que consiste em uma forma de espectroscopia de absorção como acontece no infravermelho ou no ultravioleta (FONTANA, 2006).

O RMN baseia-se na capacidade de uma amostra absorver radiação eletromagnética a uma determinada frequência de acordo com a natureza dos núcleos presentes e as características estruturais da molécula (SILVERSTEIN et al., 1994). Esta técnica vem sendo utilizada em estudos referentes aos núcleos de ^1H , ^{13}C , ^{31}P , ^{15}N e ^{27}Al (MARTIN NETO et al.; 2007) tanto em amostras sólidas quanto líquidas além de apresentar vantagens como não ser destrutiva para amostras sólidas preservando-as para outras análises além de poder ser realizado em amostras com pouco ou nenhum tratamento prévio (SIMPSON et al., 2011, SILVA, 2001). Segundo NOVOTNY et al. (1999) o desenvolvimento e expansão da técnica de RMN ^{13}C vem acompanhando os avanços obtidos no campo da instrumentação permitindo maior utilização e confiabilidade para a ciência do solo desempenhando um papel significativo e central no futuro da pesquisa ambiental.

A utilização de técnicas de ^{13}C RMN em estado sólido permite conhecer as características estruturais das substâncias orgânicas. No caso das SH, é possível identificar na região do espectro entre 0-45 ppm, a presença de carbono alifático não funcionalização e na região entre 45 - 60 ppm, a presença de metoxilas e polipeptídeo ($\text{C}_{\text{Alquil-O,N}}$). A região entre 60-110 ppm é típica de carboidratos. A região entre 60-90 ppm representa as estruturas tipo - $^*\text{C-OH}$ de fragmentos tipo celulose e hemicelulose e lignina ($\text{C}_{\text{Alquil-O}}$). Picos na região de 90 - 110 ppm pertencem a C-anomérico de carboidratos ($\text{C}_{\text{Alquil-di-O}}$) e C2 em estruturas de guaiacil e siringil. Os picos de 110 - 140 ppm são atribuídos a carbonos aromáticos não funcionalizados ($\text{C}_{\text{Aromaticos-H,R}}$) pertencentes a C1 de fragmentos de lignina siringil e guaiacil. Na região entre 140-160 ppm, são observados picos atribuídos a carbonos aromáticos funcionalizados ($\text{C}_{\text{Aromaticos-O,N}}$). A região entre 160-185 ppm tem picos intensos pertencentes aos carbonos carboxílicos ($-\text{C}_{\text{COOH}}$), e a região entre 185-230 ppm é atribuída aos carbonos carbonílicos ($\text{C}_{\text{C=O}}$) de aldeídos e cetonas (GARCÍA et al., 2020; SIMPSON et al., 2002; KEELER et al., 2006; SONG et al., 2008) (Figura 8).

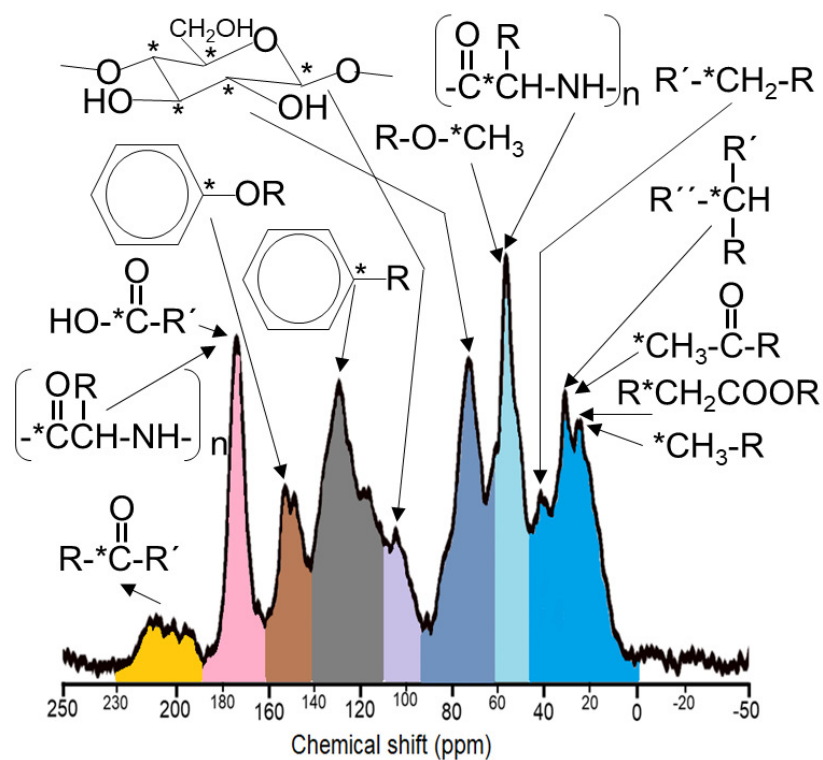


Figura 8. Espectros ^{13}C NMR característico de um ácido húmico extraído de um solo orgânico do estado de Rio de Janeiro, Brasil. Os picos foram assinalados de acordo com Keeler et al. (2006). Fonte: García et al., 2020.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local e Condições Experimentais

O trabalho experimental foi realizado no Laboratório de Química Biológica do Solo (LQBS), do Departamento de Solos, Instituto de Agronomia, da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. A caracterização das SH foi realizada na central analítica, no Instituto de Química, da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

3.1.1 Origem da matriz fúngica e multiplicação

Os isolados dos fungos *Pleurotus eryngii*, *Panus strigellus* (Berk.) e *Ganoderma lucidum* (Figura 9A, 9B, 9C) utilizados neste estudo foram obtidos a partir de cogumelos correspondentes de cada espécie (Figura 9). Todas as espécies foram cultivadas nas salas microbiologia e estufas de produção do Laboratório de Química Biológica do Departamento de Solos, Instituto de Agronomia, da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, sob condições controladas de temperatura 24 °C e umidade relativa de 90-95%. Os fungos aqui estudados foram depositados na micoteca do laboratório onde as culturas puras são mantidas rotineiramente em câmara fria, em meio batata dextrose agar (BDA) sob refrigeração de 2-4 °C. Todas as espécies objeto de estudo utilizadas nesta tese, assim como o projeto estão registradas no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (Conselho de Gestão do Patrimônio Genético) com número de cadastro: AD8FEFF.

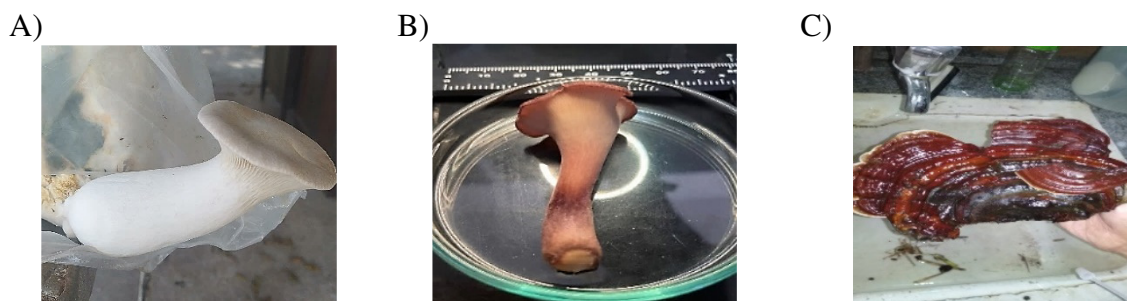


Figura 9. Imagens dos cogumelos, A) *P. eryngii*; B) *P. strigellus*; e C) *G. lucidum*, obtidos na estufa do laboratório, sob condições de temperatura e umidade controladas e usadas para a obtenção dos isolados usados no experimento.

3.1.2 Cepa fúngicas e produção de inóculos (*spawn*)

Os procedimentos usados foram conduzidos de acordo com os métodos descritos por Hsu et al. (2018). A matriz inicial dos fungos utilizados foi obtida de um isolado de um cogumelo correspondente de cada espécie comercial procedente da cidade de São Paulo, Brasil, e selecionada pelo vigor e velocidade de crescimento dentre outros isolados cultivados em meio BDA. Posteriormente, fragmentos do micélio isolado e puro foram usados para a obtenção do inóculo (*spawn*) transferidos para potes de vidro com tampas furadas e filtro *micropore* para permitir a troca de gases, que continham o substrato próprio de *spawn*.

Os substratos do *spawn* foram elaborados com sementes de trigo orgânico certificado, procedentes do Sul do Brasil, cozidas durante 30 minutos mais 1% de CaCO₃ e autoclavadas a 121°C e pressão de 15 psi durante 60 minutos. Os potes foram inoculados com o micélio

inicial na escuridão de 26-28 °C durante 10 dias até a colonização total do substrato pelo fungo. Posteriormente, 10% do *spawn* foi transferido para o substrato feito com serragem de madeira não tratada (70% da formulação) finamente moída e com mistura de farelo de trigo e farelo de casca de arroz (28% da formulação), 2% de CaCO₃, e autoclavados a 121°C e pressão de 15 psi durante dois ciclos de 60 minutos.

Depois de inoculadas as bolsas com o substrato, esses foram incubados na escuridão durante 35 dias a 26-28 °C até a total colonização do substrato pelo fungo e colocados na sala de cultivo própria para a obtenção dos cogumelos de onde foi obtida a colônia pura do isolado denominados como ERI2107 (*P. eryngii*); PST1011 (*Panus striguellus*); GL351 (*G. lucidum*).

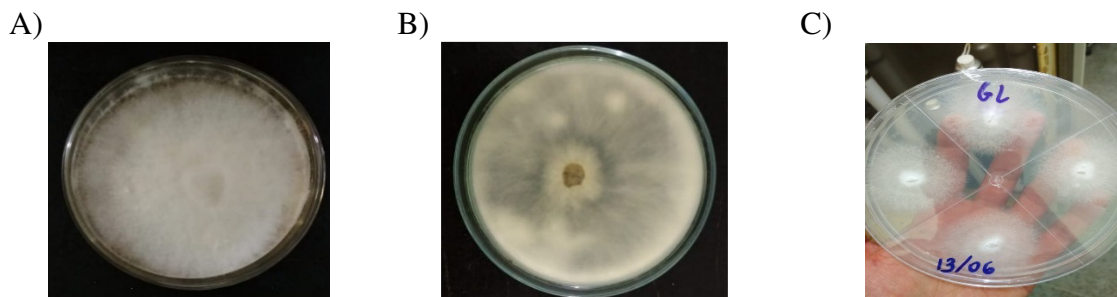


Figura 10. Imagens dos isolados de: A) *P. eryngii*; B) *P. striguellus*; e C) *G. lucidum* obtidos no laboratório e usados nos diferentes testes.

3.2 Extração e Caracterização das Substâncias Húmicas (SH) de Diferentes Origens

Os estudos de crescimento e desenvolvimento dos fungos *Pleurotus eryngii*, *Panus strigellus* (Berk.) e *Ganoderma lucidum* foram conduzidos em delineamento experimentais utilizando duas fontes de SH. As SH extraídas de turfa foram obtidas a partir de amostras obtidas de turfeiras (depósito de material vegetal decomposto) localizadas em na região sul do país. As SH extraídas de vermicomposto foram obtidas a partir de um vermicomposto produzido na fazendinha Agroecológica, Seropédica, UFRRJ.

As SH foram isoladas e purificadas de acordo com a metodologia proposta pela Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas (IHSS: siglas em inglês) e de acordo com o protocolo metodológico descrito por Swift (1996). Resumidamente, para a obtenção das SH a partir diferentes materiais, um pré-tratamento inicial foi realizado com HCl (10^{-3} mol L⁻¹) para a eliminação dos sais solúveis. Posteriormente, uma lavagem com KOH (0,01 mol L⁻¹) é realizada para diminuição do pH próximo à neutralidade. Após estes procedimentos, a extração das SH é realizada mediante adição de uma dissolução de NaOH (0,1 mol L⁻¹) à uma massa dos materiais em proporções de 10:1 (v:m) sob atmosfera de N₂ e a mistura mantida em agitação mecânica durante 24 h.

Após este tempo, a mistura foi mantida em repouso por ao menos três horas e em sequência, sifonada para retirada e separação do sobrenadante (SH dissolvidas) e da fração sólida (resíduos não humificados). Em seguida o humus líquido foi centrifugado a 10.000 g durante 30 minutos e recolhido o sobrenadante que contém as frações de substâncias húmicas dissolvidas correspondentes aos AH e aos AF. Para a eliminação dos metais, a solução de SH foi passada por uma coluna de troca iônica (forma de hidrogênio Amberlite IR120, Fluka analítico Cod.06428). Posteriormente, as SH foram dialisadas utilizando água deionizada usando membrana SPECTRA/POR® 7 dialysis tubing, 1 kD, até a condutividade eléctrica da água deionizada não apresentar valores superiores a 1 µS. e até teste negativo para íons Cl⁻ com AgNO₃. Após este processo, os AH foram congelados em freezer a -80 °C e posteriormente liofilizados.

3.3 Caracterização Mediante ^{13}C NMR CP/MAS das Substâncias Húmicas Extraídas de Vermicomposto e Turfa

Com o objetivo de conhecer os principais tipos de estruturas dos fragmentos estruturais do carbono nas SH, foi utilizada a técnicas de RMN em estado sólido. Para isto, foi utilizada a técnica consistente em polarização cruzada (CP) e rotação no ângulo mágico (MAS). A análises de CP MAS ^{13}C -NMR foi realizada em um aparelho Bruker AVANCE II RMN a 400 MHz, equipado com probe de 4 mm Narrow MAS e operando em sequência de ressonância de ^{13}C a 100.163 MHz. Para a obtenção dos espectros, massas iguais das amostras das SH foram colocadas em um rotor (porta-amostra) de Dióxido de zircônio (ZrO_2) com tampas de Kel-F sendo a frequência de giro de 8 ± 1 kHz. Os espectros foram obtidos pela coleta de 3000 data points para o mesmo número de scans a um tempo de aquisição de 34 ms e com recycle delay de 5s. O tempo de contato para a sequência em rampa de ^1H ramp foi de 2 ms. A coleta e elaboração espectral foram realizadas utilizando o Software Bruker Topspin 2.1. Os decaimentos livres de indução (DLI) foram transformados aplicando um zero filling igual a 4 k e posteriormente um ajuste por função exponencial (line broadening) de 70 Hz.

O trabalho espectral foi realizado utilizando o Software ACD/Labs 2020.1.1 (Advanced Chemistry Development, Inc, Toronto, Ontario, Canadá). Os espectros foram inicialmente submetidos a correção da linha base, tomando como referência o zero e início (0 ppm) e final (230 ppm) utilizando a ferramenta “set point”. O algoritmo “smoothing” foi utilizado em todos os espectros com o objetivo de reduzir o ruído e aumentar a relação sinal ruído. As regiões então foram integradas para a obtenção da quantidade relativa de estruturas em função da área total do espectro utilizando a ferramenta “integration manual”. As regiões integradas foram as seguintes: Carbonos alquílicos não funcionalizados ($\text{C}_{\text{Alquil-H,R}}$): 0–45 ppm; C-metoxilas e N–alquil-C ($\text{C}_{\text{Alquil-O,N}}$): 45–60 ppm; O–alquil C ($\text{C}_{\text{Alquil-O}}$): 60–90 ppm; di-O–alquil C (carbono anoméricos) ($\text{C}_{\text{Alquil-di-O}}$): 90–110 ppm; carbono aromático ($\text{C}_{\text{Aromático-H,R}}$): 110–140 ppm; O,N–aromático C ($\text{C}_{\text{Aromático-O,N}}$): 140–160 ppm; carboxila C ($\text{C}_{\text{COO-H,R}}$): 160–185 ppm e carbonilas C ($\text{C}_{\text{C=O}}$): 185–230 ppm. O índice de aromaticidade foi calculado segundo a fórmula: $(\text{C}_{\text{Aromático-H,R}} + \text{C}_{\text{Aromático-O,N}}) * 100 / \text{área total}$ e o índice de alifaticidade foi calculado como: $100 - \text{aromaticidade (\%)}$. O índice de hidrofobicidade (HB/HI) foi calculado como segue: $(0 \text{ ppm}-46 \text{ ppm}) + (110 \text{ ppm}-156 \text{ ppm}) / (46 \text{ ppm}-110 \text{ ppm}) + (156 \text{ ppm}-186 \text{ ppm})$ (KEELER et al., 2006; SIMPSON e SIMPSON 2017; SONG et al., 2008).

3.3.1 Aplicação de técnicas estatísticas aos dados espectrais por meio de análises quimiométricas

As análises quimiométricas foram realizadas utilizando o pacote de software *Unscrambler* (version 10.4) (Camo Software AS, Nedre Vollgate 8, Oslo, Norway). Para isto, os espectros puros foram carregados mediante a importação do arquivo na extensão *.jcamp. Quando carregados os espectros ^{13}C -NMR CP MAS, a matriz gerada apresentou uma estrutura com uma relação *samples: variable* (12 x 4095). A matriz ^{13}C -NMR CP MAS foi analisada mediante construção tipo linha e posterior a matriz foi transformada mediante “normalization”, “smoothing” e correção da linha base (baseline correction-baseline offset-linear baseline correction).

As análises de componentes principais (PCA) foram realizadas a partir da matriz normalizada. O modelo adotado para a PCA utilizou um total de sete componentes, identificação automática de outliers e data centralizada na média. Foi utilizado um algoritmo NIPALS (Non-linear Iterative Partial Least Squares algorithm) e uma validação de “cross

validation”. Os *scores* e *loadings* foram apresentados em gráficos diferentes e estes últimos plotados na forma de linha para a visualização dos pesos na forma de padrão espectral.

As análises de curva de resolução multivariada (MCR) foram realizadas para decompor a matriz complexa dos espectros ^{13}C -NMR CP MAS, uma vez que o modelo de PCA já foi estabelecido. As restrições das análises foram estabelecidas para espectros não negativos (non-negative spectra) e concentrações não negativas (non-negative concentrations). Duas novas matrizes são obtidas mediante estas análises, uma matriz correspondente à concentração de cada componente e a outra aos espectros puros separados de acordo com o peso de cada componente. Neste estudo, o peso dos componentes apresentados corresponde com o padrão espectral dos dois primeiros componentes. A obtenção dos espectros médios foi realizada mediante a utilização da ferramenta para estatística descritiva “descriptive analyses” e então a matriz “results” acessada para plotagem na forma de linha da média obtida na análise.

A análise estatística de comparação de médias foi realizada utilizando a ferramenta “statistical test” inicialmente foi realizado um teste de normalidade para cada tipo de carbono mediante o método de Kolmogorov-Smirnov *normality test* a 5% de nível de confiança. Após confirmação da normalidade dos dados foi verificada a equivalência da variância (equality of variance) mediante o teste de “Bartlett's test”. Em seguida as médias foram comparadas mediante *Student's t test* para variâncias iguais.

3.3.2 Modelagem química estrutural das SH a partir de dados espectrais de ^{13}C RMN em estado sólido

A modelagem das SH extraídas de trufa e de vermicomposto foi realizada utilizando a fase I do modelo VSOMM (Vienna Soil-Organic-Matter Modeler) (Institute of Molecular Modeling and Simulation - University of Natural Resources and Life Sciences, Vienna) (SÜNDERMANN et al., 2015). O modelo foi gerado a partir da entrada dos dados a seguir:

Número de blocos: o número total de blocos para a construção do sistema molecular.

Número de blocos por molécula: número de blocos para a construção de uma molécula.

Número de moléculas de água: a quantidade total de moléculas de água que devem ser adicionadas ao sistema.

Valor de pH: o pH do sistema.

Contra íons: Tipo de cátions que devem ser adicionados ao sistema para torná-lo totalmente neutro.

Fração de carbono: Quantidade de carbono da SH

Fração de nitrogênio: Quantidade de nitrogênio da SH

Quantidade de estruturas do C obtidas mediante ^{13}C RMN em estado sólido: $\text{C}_{\text{Alquil-H,R}}$; $\text{C}_{\text{Alquil-O,N}}$; $\text{C}_{\text{Alquil-O}}$; $\text{C}_{\text{Alquil-di-O}}$; $\text{C}_{\text{Aromático-H,R}}$; $\text{C}_{\text{Aromático-O,N}}$; $\text{C}_{\text{COO-H,R}}$; $\text{C}_{\text{C=O}}$

3.4 Preparação dos Meios de Cultura Enriquecidos com SH para os Experimentos com Fungos

O meio de cultura modificado foi composto por caldo de batata, ágar, estreptomicina e as SH. Os tratamentos consistiram de aplicações de SH em doses crescentes de 1, 2, 5, 7, 15, 35, 75, 125, 250 e 500 mg SH L^{-1} de turfa ou vermicomposto e um tratamento controle contendo apenas ágar batata dextrose (BDA) como fonte de carbono em meio sólido de crescimento em pH 6,0. O controle foi realizado incubando os fungos no meio de cultura preparado com BDA, composto de batata, dextrose, ágar e estreptomicina. O meio de cultura

BDA preparado e modificado com SH foi autoclavado a 121 °C e pressão de 15 psi por 30 min e vertido 50 ml em placas de *Petri* de 90 mm de diâmetro. As placas de *petri* e todas as ferramentas utilizadas foram autoclavadas a 121 °C e 15 psi por 30 min, antes da inoculação do fungo.

3.4.1 Determinação dos parâmetros de crescimento

a) Determinação da área do micélio nos fungos

Cada meio de tratamento foi inoculado com um fragmento de micélio (7 mm) de cada fungo *Pleurotus eryngii*, *Panus strigellus* (Berk.) e *Ganoderma lucidum* sob condições assépticas (NGUYEN, 2019). As placas de *Petri* (90 mm) foram incubadas no escuro a 25 °C em câmaras BOD. O diâmetro (mm) da colônia fúngica (diâmetro de crescimento micelial) foi determinado a cada 24 horas após a inoculação, com o auxílio do aplicativo móvel *On 2D – Camera Measure*® instalado em um *smartphone* LG K10, cobrindo todo o diâmetro da placa de *Petri* que corresponde a 90 mm. O valor do diâmetro foi obtido a partir da média de 4 medições, que foi medido em diferentes ângulos de 0°, 45°, 90° e 135°, tomando o centro do inóculo como intersecção (MARTÍNEZ et al., 2015). A fórmula para a área de micélio foi como se segue na Equação 1:

$$\text{Área de micélio (mm}^2\text{)} = \pi \times r^2 \quad (1)$$

Onde: r é o raio (diâmetro / 2), e π é o valor de π , ou, quando o diâmetro (D) é conhecido, área de micélio = $(\pi / 4) \times D^2$.

b) Determinação da massa fresca, seca e densidade dos micélios dos fungos

Para a mensuração da massa fresca de micélio, a cada 48 horas (48, 96, 144, 192 h) do período de incubação das cepas, três placas de *Petri* foram retiradas das câmaras de BOD, e o ágar foi removido por imersão em água fervente e o micélio foi então enxaguado com água quente. Depois de lavado, seco em papel toalha, foi pesado em uma balança de precisão e colocado em tubos *falcon* de 15 ml. Em seguida, foi seco em estufa a 45 °C por 48 h e sua biomassa seca registrada (ARANA-GABRIEL et al., 2014).

A densidade micelial foi avaliada mediante modificação ao método tradicionalmente empregado. A densidade tem sido geralmente realizada visualmente e categorizada por F (fino), PF (um pouco fino), C (compacto) e PC (um pouco compacto), conforme relatado na literatura (HOA e WANG, 2015; WIN e OHGA, 2018; NGUYEN et al., 2019). Para evitar subjetividade, utilizamos o cálculo na Equação 2 a seguir:

$$\delta_{(\text{micélio})} = \text{Massa seca}_{(\text{micélio})} / \text{Área}_{(\text{micélio})} \quad (2)$$

c) Determinação da Eficiência Biológica (EB)

Em cada período de colheita, os dados foram usados para calcular a eficiência biológica (IDOWU e AKINYEMI, 2012; WIN e OGHA, 2018; PARDO-GIMÉNEZ et al., 2020). Este parâmetro foi calculado usando a fórmula da Equação 3 a seguir:

$$\text{EB (\%)} = [\text{Massa seca}_{(\text{micélio})} \text{ por placa} / \text{Quantidade de meio por placa}_{(\text{micélio})}] \times 100 \quad (3)$$

3.5 Desenho Experimental e Análise Estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com um tratamento adicional, considerando um modelo fixo. Os resultados apresentados são o valor médio e as barras de erro padrão da média ($\pm EP$). As análises de dados foram realizadas por meio do pacote “multcomp” (HOTHORN et al., 2008, 2016), e plotadas usando o pacote “ggplot2” (WICKAM, 2016) no software R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2019). A ordenação dos dados foi realizada por meio da análise de componentes principais (PCA), em que a análise foi realizada com os dados padronizados (média = 0 e variância = 1).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização das SH de Turfa e Vermicomposto Mediante ^{13}C NMR CP/MAS

As SH aplicadas aos fungos apresentam características estruturais diferentes, portanto, propriedades diferentes e em consequência deve-se esperar uma funcionalidade diferente entre elas (Figura 11). A Figura 11A e 11B mostram os espectros com a presença das principais estruturas predominantes nas SH de turfa e vermicomposto respectivamente. Em ambas as SH houve presença de C-alifáticos ($\text{C}_{\text{Alkyl-H,R}}$) não funcionalizados ($^*\text{CH}_3\text{-R}$, $\text{R}^*\text{CH}_2\text{-R}'$ e $\text{R-CH-R}'$) para a turfa e o vermicomposto em 27.92 e 29.29 ppm, respectivamente. O gráfico de matriz espectral na Figura 11A mostra que na turfa estas estruturas alifáticas são mais abundantes do que no vermicomposto e, portanto, carbonos alifáticos de fragmentos de lipídeos, cadeias laterais de aminoácidos e proteínas, assim como de lignina, cutina, suberinas e taninos, são mais presentes e marcantes nas SH extraídas de turfa (GARCÍA et al., 2019; SIMPSON e SIMPSON, 2016; KEELER et al., 2006; SONG et al., 2008).

Os picos entre 45-60 ppm (50.74, 57.17 para turfa e 52.69 para vermicomposto) indicam a presença de carbonos alifáticos funcionalizados do tipo $\text{C}_{\text{Alkyl-O,N}}$, pertencentes a fragmentos metoxílicos ($\text{RO-}^*\text{CH}_3$) e $\text{C}\alpha$ de peptídeos ($\text{-CO-}^*\text{CHR-NH}$). A elevada intensidade e predomínio deste pico nos gráficos de matriz espectral da Figura 11B, indicam que nas SH extraídas de vermicomposto os fragmentos de aminoácidos, celulose/hemicelulose e restos metoxílicos de origem lignínicos são mais abundantes quando comparados com as SH extraídas de turfa (GARCÍA et al., 2019; SIMPSON e SIMPSON, 2016; KEELER et al., 2006; SONG et al., 2008).

Os picos entre 60-90 ppm e especialmente os picos intensos em 67.50 ppm e 68.87 ppm para ambas as SH mostram a presença de carbonos alifáticos do tipo $\text{C}_{\text{Alkyl-O}}$. A presença destes carbonos reafirma o predomínio de estruturas onde há ligação C-O ($^*\text{C-OH}$) de carboidratos e éteres. Por outro lado, os picos entre 90-110 ppm mostram a presença de carbono tipo $\text{C}_{\text{Alkyl-di-O}}$ em ambas as SH. Especialmente os picos intensos em 100.00 ppm e 101.51 ppm confirmam a presença de estruturas pertencentes a C-anoméricos e C_2 de fragmentos de Siringil e Guayacyl. Os gráficos de matriz espectral mostram uma intensidade semelhante destes picos tanto nas SH de turfa quanto nas de vermicomposto (Figura 2A e 2B) (GARCÍA et al., 2019; SIMPSON e SIMPSON, 2016; KEELER et al., 2006; SONG et al., 2008).

Ambas as SH apresentaram presença de carbono aromáticos do tipo ($\text{C}_{\text{Aromatic-H,R}}$) nas suas estruturas. Os picos presentes entre 110-140 ppm confirma a presença dos carbonos aromáticos não funcionalizados, especificamente os picos em 131.99 ppm e 139.34 ppm para vermicomposto e turfa respectivamente, comprovam a existência de fragmentos aromáticos de aminoácidos, ligninas, suberinas e carvões nas SH. Os gráficos de matriz espectral na Figura 11A e 11B mostram maior intensidade destes picos nas SH extraídas de turfa. Por outro lado, os compostos aromáticos funcionalizados também foram identificados em ambas as estruturas das SH. Os picos entre 140-160 ppm indicam a presença nas SH de carbono do tipo ($\text{C}_{\text{Aromatic-O,N}}$). Os gráficos de matriz espectral na Figura 11A e 11B mostram que nas SH extraídas de turfa, estas estruturas correspondentes a fragmentos fenólicos de lignina e suberinas são mais predominantes (GARCÍA et al., 2019; SIMPSON e SIMPSON, 2016; KEELER et al., 2006; SONG et al., 2008).

Carbonos correspondentes a grupamentos carboxilas (-COOH), amidas e ésteres foram identificados tanto nas SH extraídas de turfa quanto nas SH extraídas de vermicomposto a

partir dos picos em 169.62 ppm e 171.19 ppm respectivamente. Estas estruturas se correspondem com fragmentos de aminoácidos e proteínas, ácidos graxos, ésteres de lipídeos. Por outro lado, um pico intenso em 196.77 ppm indica a presença de carbono carbonílico ($C_{C=O}$), mais resolvidos nas SH extraídas de turfa do que em vermicomposto. Os gráficos de matriz espectral 11A e 11B mostram que estas estruturas correspondentes com os fragmentos de produtos da degradação de ligninas são mais intensas em turfa (GARCÍA et al., 2019; SIMPSON e SIMPSON, 2016; KEELER et al., 2006; SONG et al., 2008).

4.1.1 Análises de PCA aplicados aos dados espectrais obtidos mediante ^{13}C NMR CP/MAS

Embora a análise espectral das SH de turfa e vermicomposto tenha mostrado as suas características estruturais, a análise de PCA na Figura 11C classificou as diferenças existentes. Os scores obtidos na PCA- ^{13}C NMR dos espectros puros (99% da variância total explicada) mostra que na PC-1 (98% da variância total explicada) as SH se separam em dois grupos onde, existem valores positivos da componente que se agruparam as SH de turfa enquanto os valores negativos se agruparam as SH de vermicomposto. Os *loadings* obtidos a partir destas análises mostrou que as estruturas alifáticas com baixa funcionalização do tipo $C_{Alkyl-H,R}$, as aromáticas não funcionalizadas ($C_{Aromatic-H,R}$) e funcionalizadas ($C_{Aromatic-O,N}$) são as responsáveis pelo agrupamento (Figura 11C). Já as estruturas alifáticas funcionalizadas ($C_{Alkyl-O}$; $C_{Alkyl-O,N}$; $C_{Alkyl-di-O}$) são as responsáveis pela semelhança entre as SH do vermicomposto.

A PCA realizada a partir dos tipos de estruturas (92% da variância total explicada) permite confirmar de forma semiquantitativa as diferenças entre as SH de turfa e de vermicomposto (Figura 11D). A valores positivos da PC-1 (90% da variância total explicada) se agruparam as SH de turfa com as estruturas de $C_{Alkyl-H,R}$; $C_{Aromatic-H,R}$ e $C_{Aromatic-O,N}$ e a valores negativos se agruparam as SH de vermicomposto com as estruturas $C_{Alkyl-O}$; $C_{Alkyl-O,N}$; $C_{Alkyl-di-O}$ e C_{COOH} .

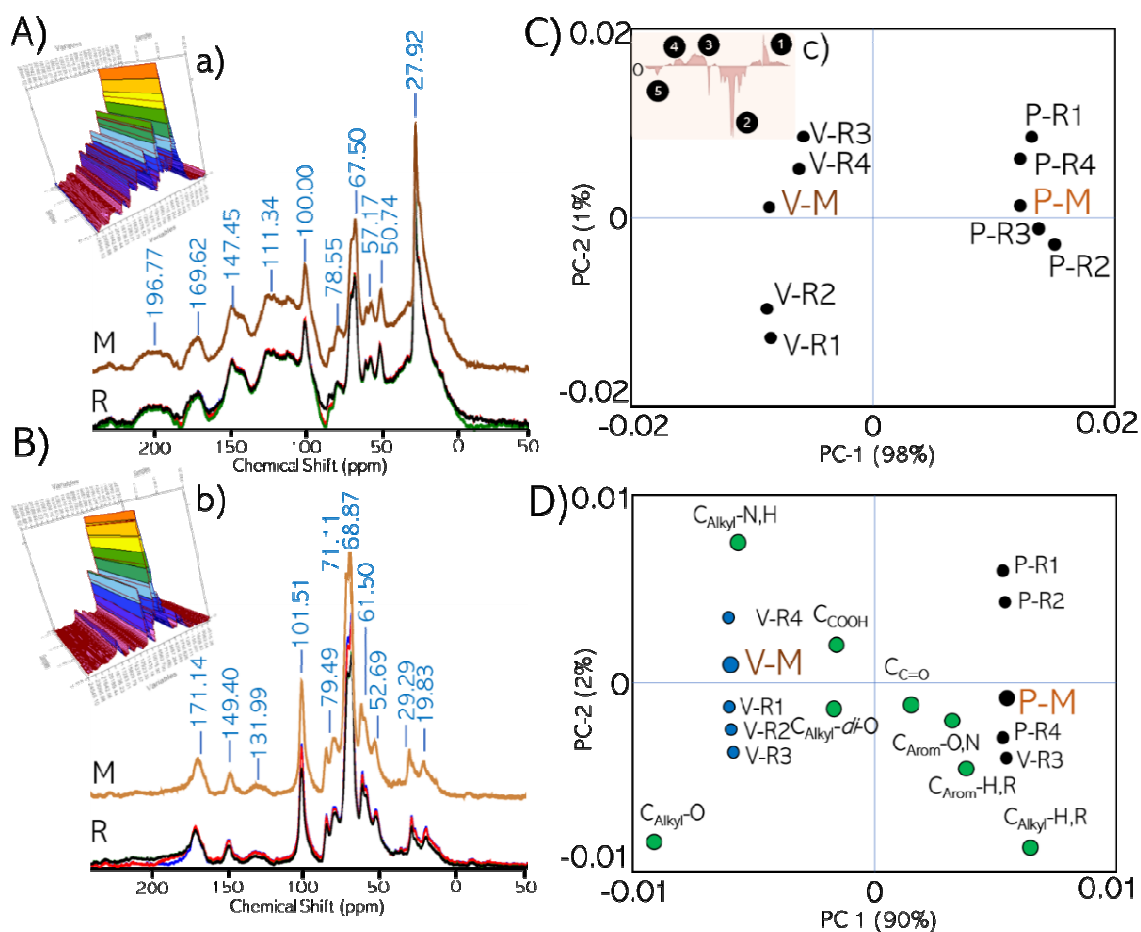


Figura 11. Características estruturais obtidas mediante espectroscopia de ressonâncias magnética nuclear em estado sólido (^{13}C NMR CP/MAS) e quimiometria (análise de componentes principais -PCA) das substâncias húmicas aplicadas nos experimentos aos fungos *Pleurotus eryngii*, *Panus strigellus* e *Ganoderma lucidum*. A) Espectros ^{13}C NMR CP/MAS das substâncias húmicas extraídas de turfa (R: são as 4 réplicas espectrais e M (cor marrom) representa o espectro médio) e a) expressa o conjunto espectral na forma de matriz de cores mostrando o contraste entre as estruturas. B) Espectros ^{13}C NMR CP/MAS das substâncias húmicas extraídas de vermicomposto (R: são as 4 réplicas espectrais e M (cor marrom clara) representa o espectro médio) e b) expressa o conjunto espectral na forma de matriz de cores mostrando o contraste entre as estruturas. c) Expressam os *loadings*, C e D) expressam os *scores* obtidos a partir da PCA- ^{13}C NMR dos espectros puros de turfa e vermicomposto, respectivamente.

4.1.2 Quantidade relativa de estruturas de carbono presentes nas SH de turfa e vermicomposto

A Figura 12 mostra a análise estatística realizada a partir das quantidades relativas de estruturas presentes nas SH de turfa e vermicomposto (Figura 12A) e as propriedades derivadas com aromaticidade e alifaticidade (Figura 12B) assim como o índice de hidrofobicidade (Figura 12C).

As quantidades de estruturas $\text{C}_{\text{Alkyl-H,R}}$; $\text{C}_{\text{Aromatic-H,R}}$ e $\text{C}_{\text{Aromatic-O,N}}$ presentes na SH de turfa são estatisticamente superiores quando comparada com a quantidade presentes no vermicomposto ($p < 0.001$). Estas estruturas geram propriedades aromáticas e hidrofóbicas estatisticamente superiores na SH de turfa quando comparadas com as SH de vermicomposto ($p < 0.001$) (Figura 12B e 12C).

Contrariamente, as estruturas $C_{Alkyl-O}$; $C_{Alkyl-O,N}$ são estatisticamente superiores nas SH de vermicomposto quando comparado com as presentes no vermicomposto e portanto as propriedades de alifaticidade e hidrofilicidade são estatisticamente superiores quando comparadas com as SH de turfa ($p < 0.001$).

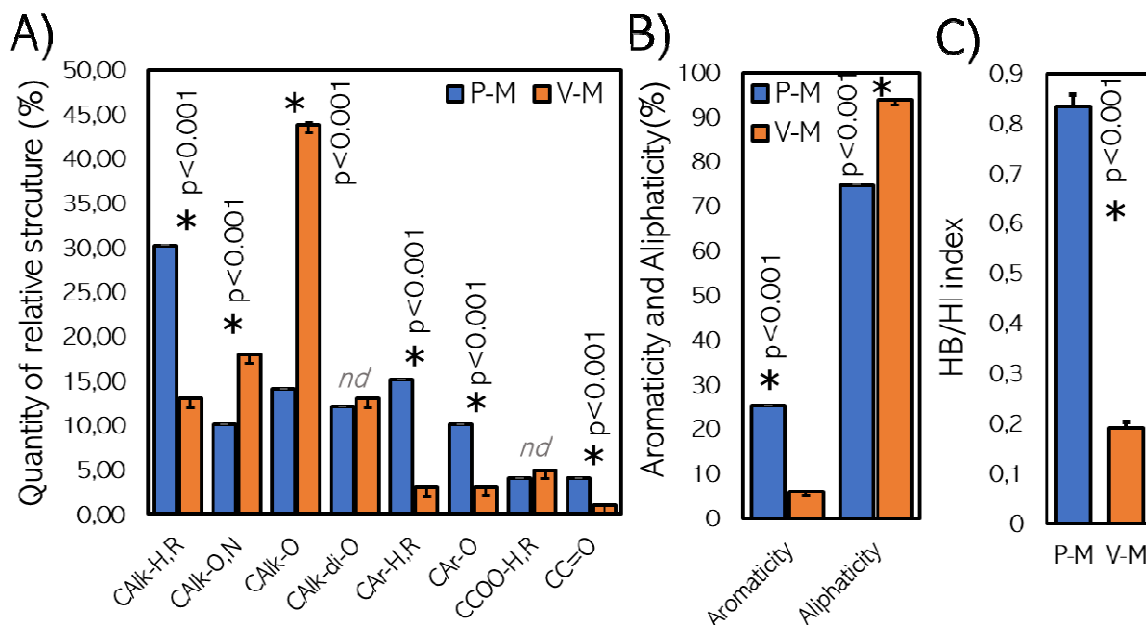


Figura 12. Quantificação das estruturas e das propriedades químicas nas substâncias húmicas. A) Quantidade relativa de estruturas do carbono. B) Porcentagem de aromaticidade e alifaticidade nas substâncias húmicas e C) índice de hidrofobicidade.

4.2 Curva de Resolução Multivariada (MCR) e Modelagem Química-Estrutural das SH

A curva de resolução multivariada reafirma a presença de níveis de estruturas de celulose/hemicelulose e lignina predominantes nas SH típico de tecidos ligo celulósicos, assim como também a importante presença de compostos extrativos como ácidos graxos e triacilglicerídeos (Figura 13A). O peso dos componentes mostra que a quantidade relativa dessas estruturas presentes nas SH gera propriedades diferentes em termos padrões celulósicos e lignínicos (Figura 13B). Ambas as SH selecionadas se confirmam como aptas em função dos objetivos traçados nessa tese, isto é, as SH extraídas de turfa apresentam aproximadamente 80% de fragmentos lignínicos enquanto as SH extraídas de vermicomposto apresenta aproximadamente 90% de fragmentos celulósicos.

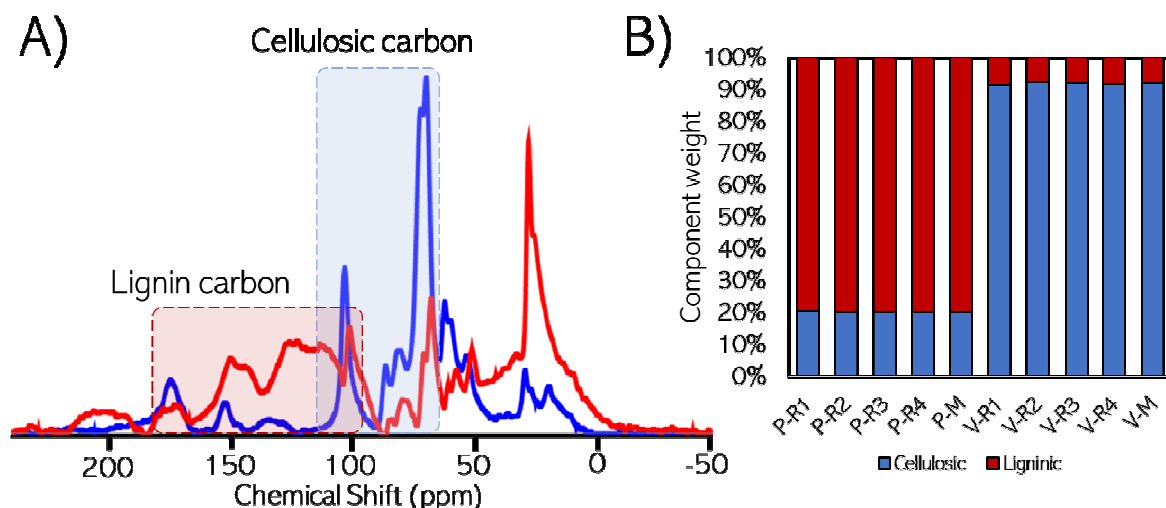


Figura 13. Análise de curva de resolução multivariada (MCR) realizado a partir dos espectros puros de ^{13}C NMR CP/MAS. A) Componentes espectrais, linha azul: PC-1 e PC-2; linha vermelha e B) concentrações dos componentes.

A Figura 14 mostra os modelos gerados a partir das informações espectrais para ambas as SH de trufa e vermicomposto. O modelo gerado para as SH de vermicomposto mostrou uma organização em um total de sete blocos, organizados aleatoriamente em blocos moleculares de 41, 16, 12, 11, 10, 5 e 5. O modelo gerou uma proposta para a quantidade de oxigênio de 44% e uma massa molecular de 11.294, 194 kDa. Por outro lado, o modelo gerado para as SH de turfa propõe uma organização estrutural baseada em um total aleatório de oito blocos, sendo estes em quantidades de moléculas de 43, 15, 11, 9, 7, 6, 6, 3. O modelo calculou uma quantidade de oxigênio de 33% e uma massa molecular de 9478,170 kDa para as SH de turfa.

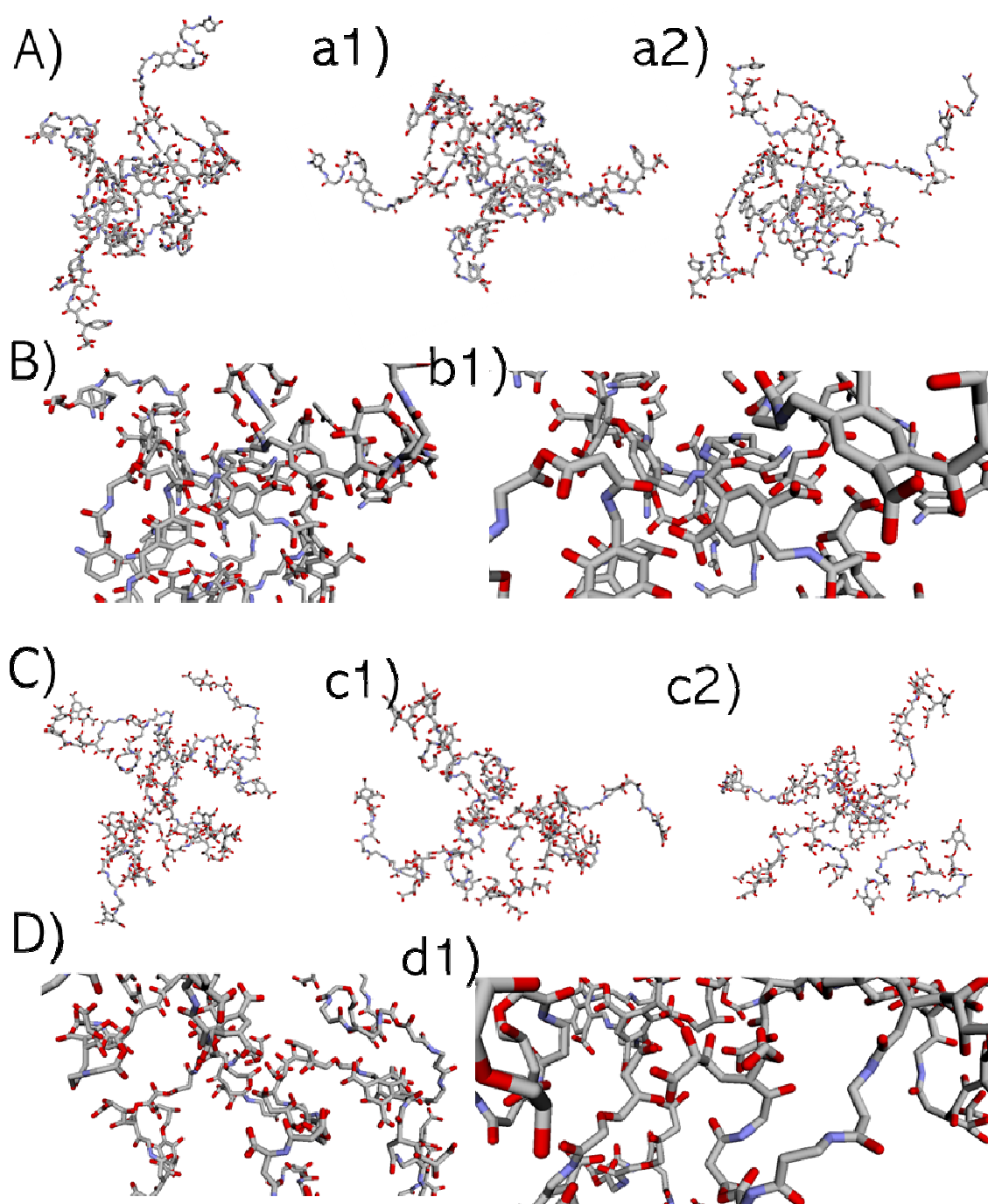


Figura 14. Modelos estruturais para as SH extraídas de trufa (A) e de vermicomposto (C). as partes a1, a2 e c1, c2 são representações rotacionais das SH extraídas de trufa e vermicomposto respectivamente. B e b1 são aproximações ao núcleo-centro do modelo estruturas 10x e 45x a partir da apresentação padrão para as SH de trufa respectivamente. D e d1 são aproximações ao núcleo-centro do modelo estruturas 10x e 45x a partir da apresentação padrão para as SH de vermicomposto, respectivamente. Model: Random Seed: 290557; Number of building blocks: 100; Building blocks per mol.: 10; Number of Water Molecules: 200; Number of ions: 26 Na⁺.

Os modelos mostram que as SH de VC se organizaram estruturalmente em um bloco molecular a menos (sete) do que as SH de turfa, as quais precisará de um bloco molecular a mais (oito) para satisfazer a estrutura húmicas. Os blocos moleculares na estrutura das SH de VC são mais homogêneos em quantidade, enquanto a estrutura das SH de turfa apresenta um bloco principal mais denso ou compacto de 43 moléculas.

A topologia estrutural de ambas as SH são resultado da sua organização estrutural discutida anteriormente. As SH de turfa apresentam uma morfologia mais compacta ao centro e núcleo estrutural (Figura 14B e b1), indicando um possível domínio interno mais aromático com estruturas mais abertas e alifáticas organizadas para um domínio mais superficial (Figura 14A, a1 e a2). As SH de VC por outro lado, não apresentam um núcleo central compacto quando comparado com as SH de turfa, mostrando espaços mais abundantes no domínio interior (Figura 14D e d1). Pode se observar uma maior quantidade de fragmentos lineares que compõem a estrutura (Figura 14C, c1 e c2).

Com a modelação estrutural se completa a caracterização das fontes de matéria orgânica humificada que foram utilizadas no presente estudo. Em resumo, as SH de VC são mais celulósicas, mais alifáticas e mais hidrofílicas, apresentam maior massa molecular e uma topologia mais aberta ou menos condensada. As SH de turfa são mais lignínicas, mais aromáticas e mais hidrofóbicas, apresentam menor massa molecular e uma topologia mais condensada. No entanto, ambas respondem a uma organização estrutural supramolecular, como descrito em Piccolo (2001, 2002).

4.3 Avaliação do crescimento e desenvolvimento dos fungos em contacto com SH de turfa e de Vermicomposto

4.3.1 Efeito das substâncias húmicas sobre o crescimento e desenvolvimento de *Pleurotus eryngii*

As SH isoladas de vermicomposto e turfa regularam de forma diferenciada o crescimento e desenvolvimento de *P. eryngii*. Os efeitos de ambas as SH dependeram das características estruturais e do tempo de avaliação. De maneira geral, os indicadores avaliados responderam de acordo com a relação de tipos de carbonos presentes nas SH onde, as estruturas mais funcionalizadas provenientes de fragmentos de carboidratos (celulose/hemicelulose) regulam o crescimento e a produção de biomassa em momentos mais tardios após aplicação. De maneira contrária, as estruturas mais aromáticas, menos funcionalizadas e hidrofóbicas exercem efeitos em momentos iniciais do crescimento e pode chegar à inibição (Figura 15).

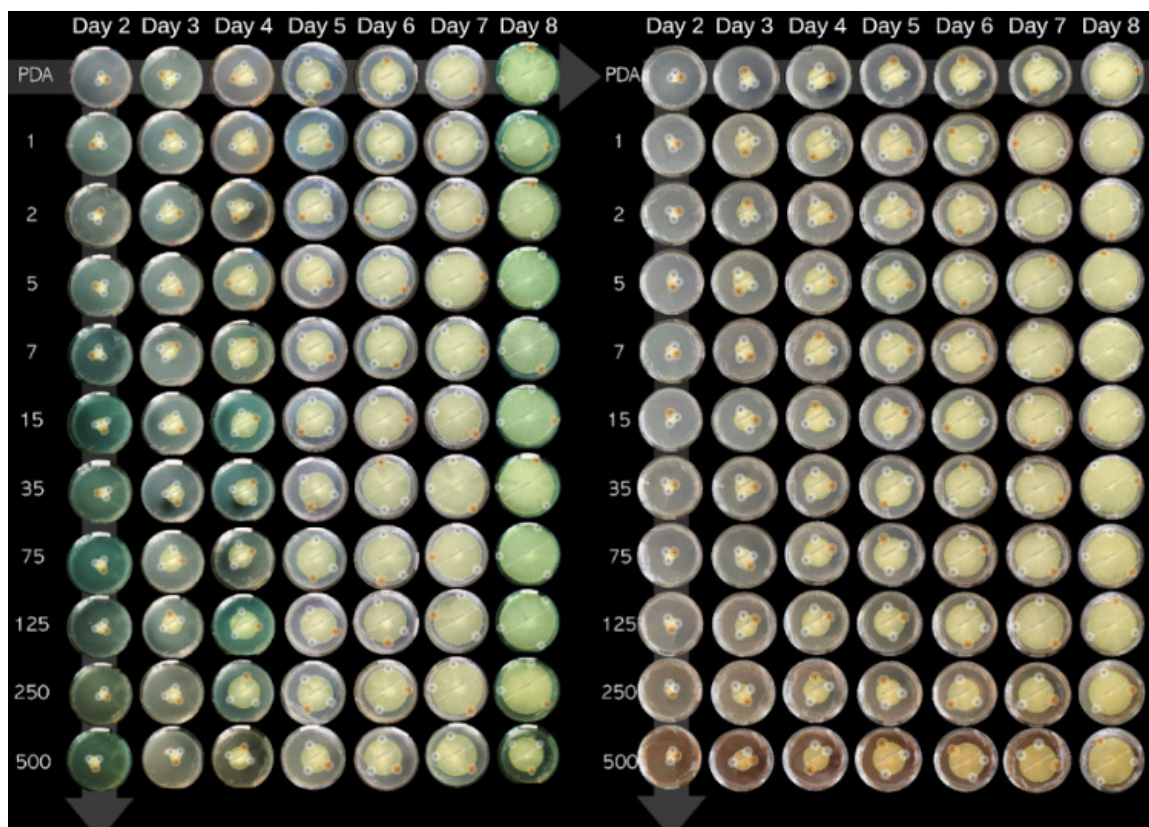


Figura 15. Medição do diâmetro de crescimento micelial de *P. eryngii* com doses de substâncias húmicas de vermicomposto e turfa como fonte de carbono em meios de crescimento 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192 h após a inoculação.

4.3.2 Efeito das substâncias húmicas sobre o diâmetro do micélio de *P. eryngii*

Com base nos resultados obtidos do diâmetro de crescimento micelial em meio de cultura ágar, é possível observar que ocorrem diferenças entre as doses de SH de vermicomposto ocorrem às 48 h depois da inoculação, sendo maiores nas doses 5, 15, 35, 75, 125, 250 mg SH L⁻¹, com melhor dose a 125 SH L⁻¹ (Figura 16). As diferenças entre o controle ocorrem às 72 h depois da inoculação, sendo maiores nas doses 5, 7, 35, 75, 125 mg SH L⁻¹, com a melhor dose de 75 mg SH L⁻¹. As diferenças entre o controle ocorrem às 96 h depois da inoculação, sendo menores nas doses 1 e 500 mg SH L⁻¹ (Figura 16). As diferenças entre o controle ocorrem às 120 h depois da inoculação, sendo menores nas doses 1, 2, 250, 500 mg SH L⁻¹, e maior na dose 75 mg SH L⁻¹. As diferenças entre o controle ocorrem às 144 h depois da inoculação, sendo menores nas doses 1, 250, 500 mg SH L⁻¹ (Figura 16), e maior na dose 15, 35 mg SH L⁻¹. As diferenças entre o controle ocorrem às 192 h depois da inoculação, sendo menores nas doses 1, 2, 250, 500 mg SH L⁻¹, e maior na dose 5, 75 mg SH L⁻¹ (Figura 16).

Por outro lado, quando tratadas com SH de turfa com todas as outras doses, sendo maiores as 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192 h depois da inoculação com relação ao controle (Figura 16). Embora às 192 h, as doses 250, 500 mg SH L⁻¹ de turfa sejam menores que o controle. O tratamento 7, 125 mg SH L⁻¹ de turfa foram determinados como os de maior estímulo para o crescimento em diâmetro micelial de *P. eryngii*.

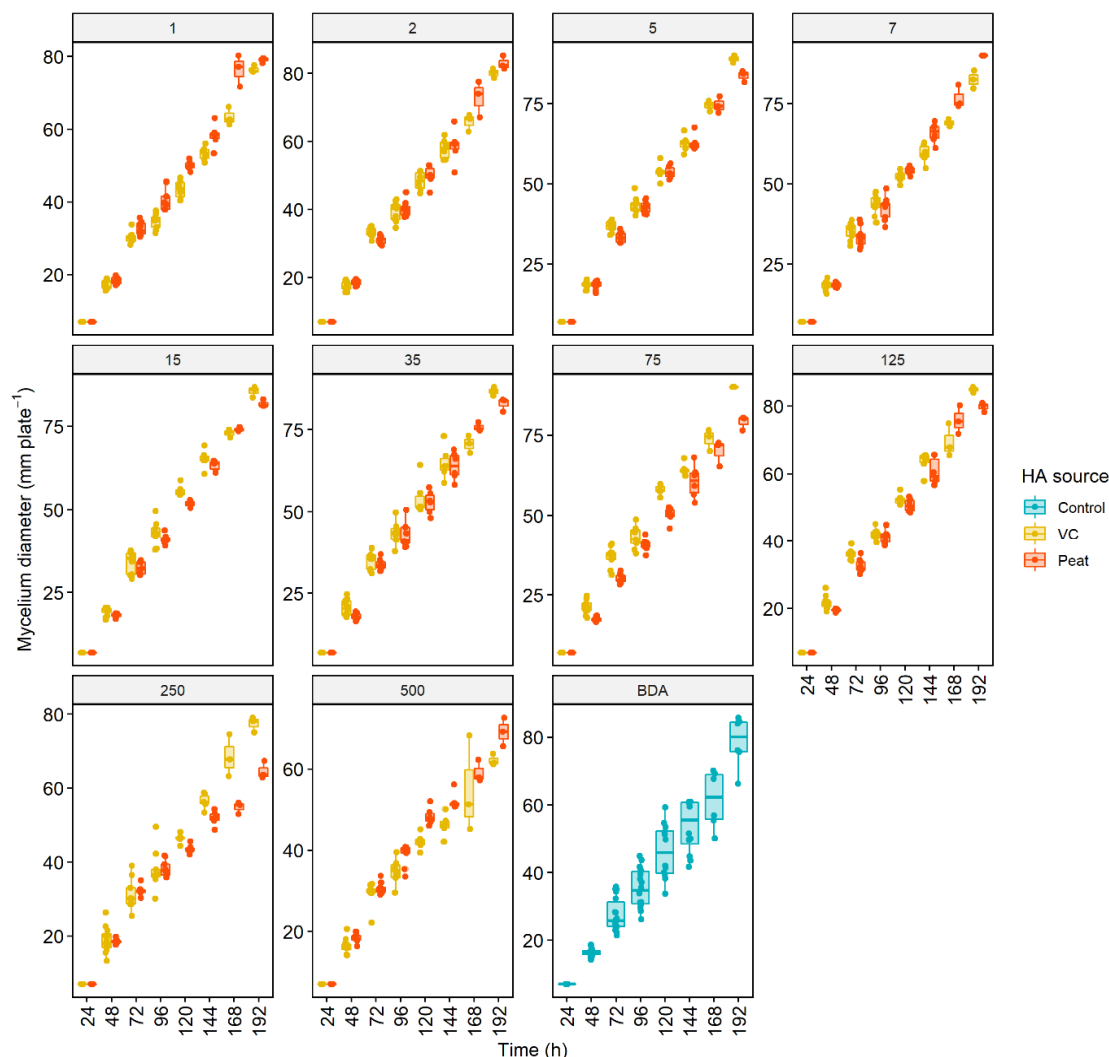


Figura 16. Diâmetro do micélio de *P. eryngii* em função do tempo (24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192 h após a inoculação) dentro de cada nível (1, 2, 5, 7, 15, 35, 75, 125, 250, 500 mg SH L⁻¹) de doses de substâncias húmicas de vermicomposto (VC) ou turfa (peat) + controle de BDA, como fonte de carbono em meios de cultura. Cada valor é expresso como média \pm erro padrão (SE).

Os efeitos das SH de ambas as fontes de origem induzem mudanças no crescimento do diâmetro micelial de forma diferenciada. As SH de vermicomposto e turfa produzem estímulo ou atraso no diâmetro, de acordo com a concentração aplicada e o tempo de crescimento. Às 192 h, momento final do experimento, é possível observar que as SH extraídas de vermicomposto com predomínio de estruturas alifáticas (C_{Alkyl}-O,N e C_{Alkyl}-O) e menor hidrofbicidade, induzem estímulo do diâmetro a menores concentrações (5 e 75 mg L⁻¹). Por outro lado é possível observar que as SH extraídas de turfa com maior presença de estruturas com baixa funcionalização química (C_{Alkyl}-H,R e C_{Aromatic}-H,R), maior aromaticidade e hidrofbicidade, induzem estímulo do diâmetro a concentrações maiores (7 e 125 mg L⁻¹).

4.3.3 Efeito das SH sobre a área do micélio

Os resultados de área micelial de *Pleurotus eryngii* durante crescimento em meio de cultura quando tratadas com SH provenientes de vermicomposto apresentaram diferenças entre o controle que se restringem às 192 h após a inoculação, sendo menores nas doses 1, 2, 250, 500 mg SH L⁻¹ e maiores do que o controle nas doses 5, 75, mg SH L⁻¹ (Figura 17). Por outro lado, as diferentes doses de SH de turfa apresentaram diferenças significativas em relação ao controle às 96, 144, 192 h após a inoculação (Figura 17). Embora sejam maiores que o controle às 48 h de coleta. Nos demais períodos, o controle foi maior do que todas as doses, sendo o melhor, para o crescimento micelial (Figura 17).

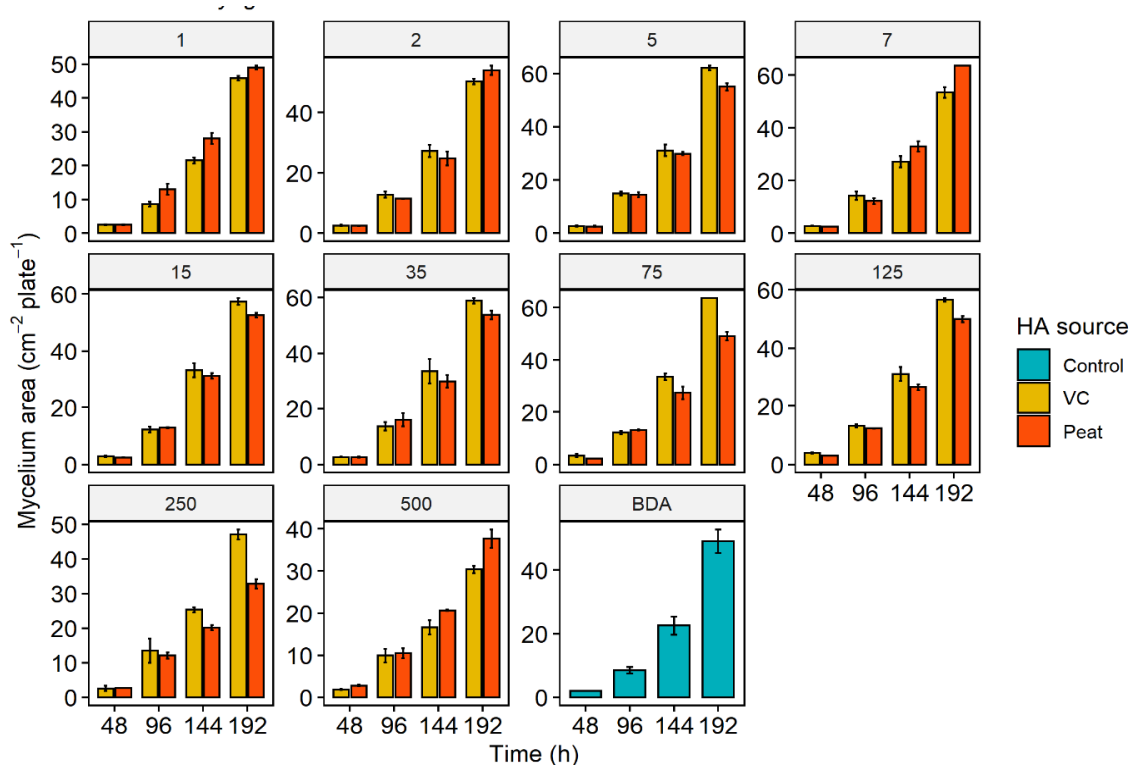


Figura 17. Área micelial de *P. eryngii* em função do tempo (48, 96, 144, 192 h após a inoculação) dentro de cada nível (1, 2, 5, 7, 15, 35, 75, 125, 250, 500 mg SH L⁻¹) de dose de substâncias húmicas de vermicomposto (VC) ou turfa (peat)+ controle de BDA, como fonte de carbono em meio de cultura. Cada valor é expresso como média \pm erro padrão (SE).

O estímulo na área do micélio parece ser mais tardio quando aplicada as SH extraídas de vermicomposto em comparação com o efeito da aplicação das SH de turfa. Estes resultados parecem indicar que o efeito de aumentar a área micelial em *Pleurotus eryngii* pode ser induzida em um primeiro estágio (até 48 h) por estruturas predominantemente aromáticas (C_{Aromatic}-H,R e C_{Aromatic}-O,N), provavelmente pertencentes a fragmentos de lignina. Posteriormente, cadeias alifáticas oxigenadas (C_{Alkyl}-O), provavelmente pertencentes a carboidratos e derivados lignínicos, as quais seriam responsáveis pela manutenção deste estímulo.

4.3.4 Efeito das SH sobre a massa fresca e seca micelial

Com base nos resultados obtidos da produção de massa fresca micelial durante o crescimento em meio de cultura ágar, houve diferenças significativas entre as diferentes doses de SH de vermicomposto com relação ao controle (Figura 18), especialmente às 96, 144 h após inoculação. Entretanto não se diferenciam ao final do experimento.

A produção de massa fresca micelial apresentou diferenças significativas entre as diferentes doses de SH de turfa com relação ao controle (Figura 18). Embora não se diferenciem ou mesmo sejam maiores que o controle nas duas primeiras épocas de coleta. Nos demais períodos o controle foi maior do que todas as doses, sendo a melhor condição para o crescimento micelial de *Pleurotus eryngii* (Figura 18).

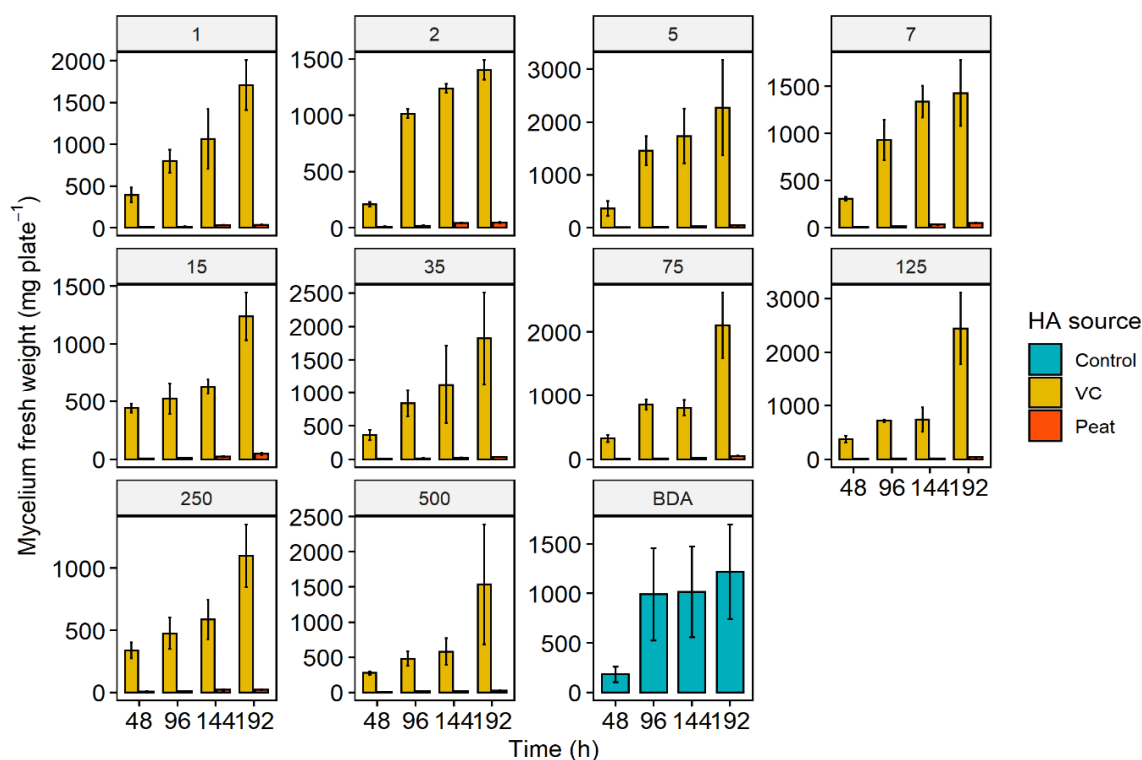


Figura 18. Massa fresca de micélio de *P. eryngii* em função do tempo (48, 96, 144, 192 h após a inoculação) dentro de cada nível (1, 2, 5, 7, 15, 35, 75, 125, 250, 500 mg SH L⁻¹) de doses de substâncias húmicas de vermicomposto (VC) ou turfa (peat) + controle de BDA, como fonte de carbono em meio de cultura. Comparação do teste de Dunnett com um controle (• p <0,1, * p <0,05). Cada valor é expresso como média ± erro padrão (SE).

Os resultados obtidos da produção de massa seca micelial de *P. eryngii* durante crescimento em meio de cultura, apresentou diferenças significativas entre as diferentes doses de SH provenientes de vermicomposto. As diferenças com relação ao controle ocorrem em sua maioria às 192 h após inoculação, sendo menores em todas as doses (Figura 19).

Quando tratadas com SH provenientes de turfa com relação ao controle às 96, 144, 192 h após inoculação (Figura 19). Com o controle sendo maior do que todas as doses (Figura 19).

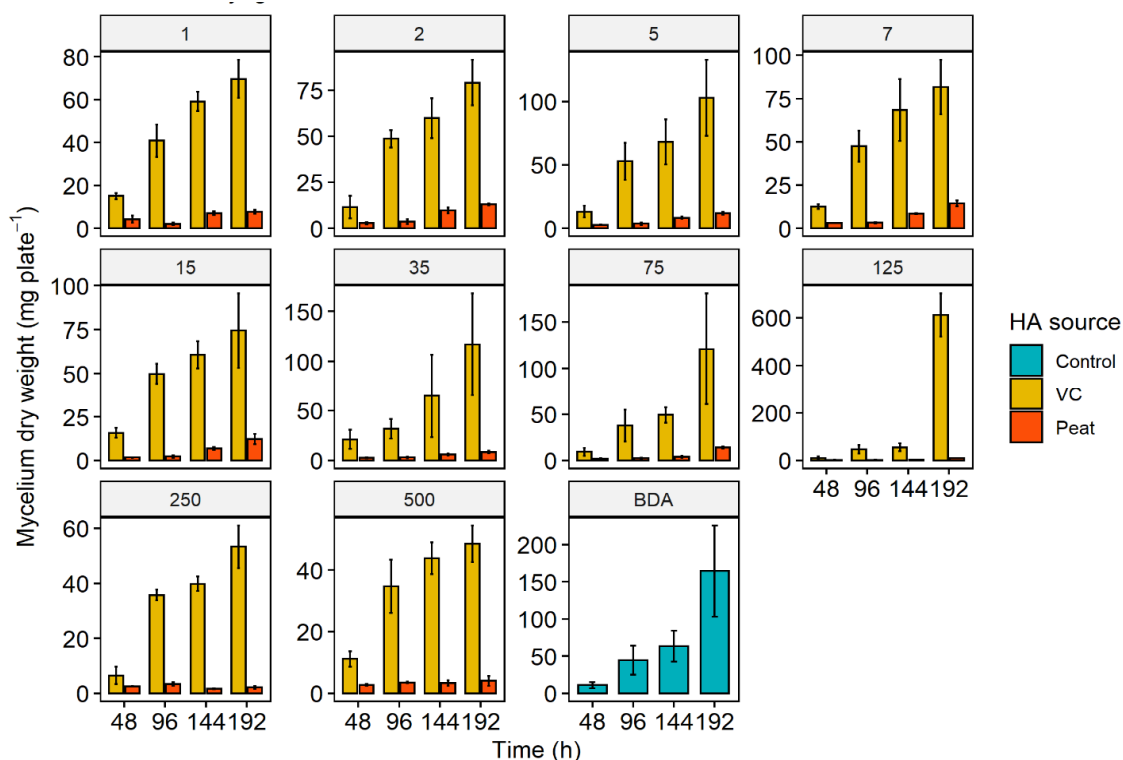


Figura 19. Massa seca de micélio de *P. eryngii* em função do tempo (48, 96, 144, 192 h após a inoculação) dentro de cada nível (1, 2, 5, 7, 15, 35, 75, 125, 250, 500 mg SH L⁻¹) de doses de substâncias húmicas de vermicomposto (VC) ou turfa (peat) + controle de BDA, como fonte de carbono em meio de cultura. Cada valor é expresso como média \pm erro padrão (SE).

As SH extraídas de vermicomposto e turfa não mostraram indução expressiva do estímulo na produção de biomassa tanto fresca como seca, quando comparada com o controle (condições ideais de crescimento). No entanto, quando observado o comportamento entre as doses das SH de acordo com a sua fonte de origem, novamente se evidenciam diferenças nos efeitos em relação à concentração e o tempo. Os efeitos exercidos na produção de biomassa demonstraram que as SH de vermicomposto preservam ou respondem por esse efeito em momentos finais do experimento enquanto em SH de turfa (mais aromáticas e hidrofóbicas) foram evidentes mais cedo.

4.3.5 Efeito das SH sobre a densidade micelial

Os resultados densidade micelial calculados de *P. eryngii* durante período de crescimento em meio de cultura, apresentou uma tendência de redução ao longo do tempo (Figura 20). As diferenças significativas entre as diferentes doses de SH provenientes de vermicomposto com relação ao controle ocorrem em sua maioria às 192 h após inoculação, sendo menores em todas as doses. Embora, na dose de 125 mg SH L⁻¹, seja a única maior do que controle (Figura 20).

Quando tratadas com SH de turfa com relação ao controle foram observadas às 96, 144, 192 h após inoculação (Figura 20). Com o controle sendo maior do que todas as doses (Figura 20).

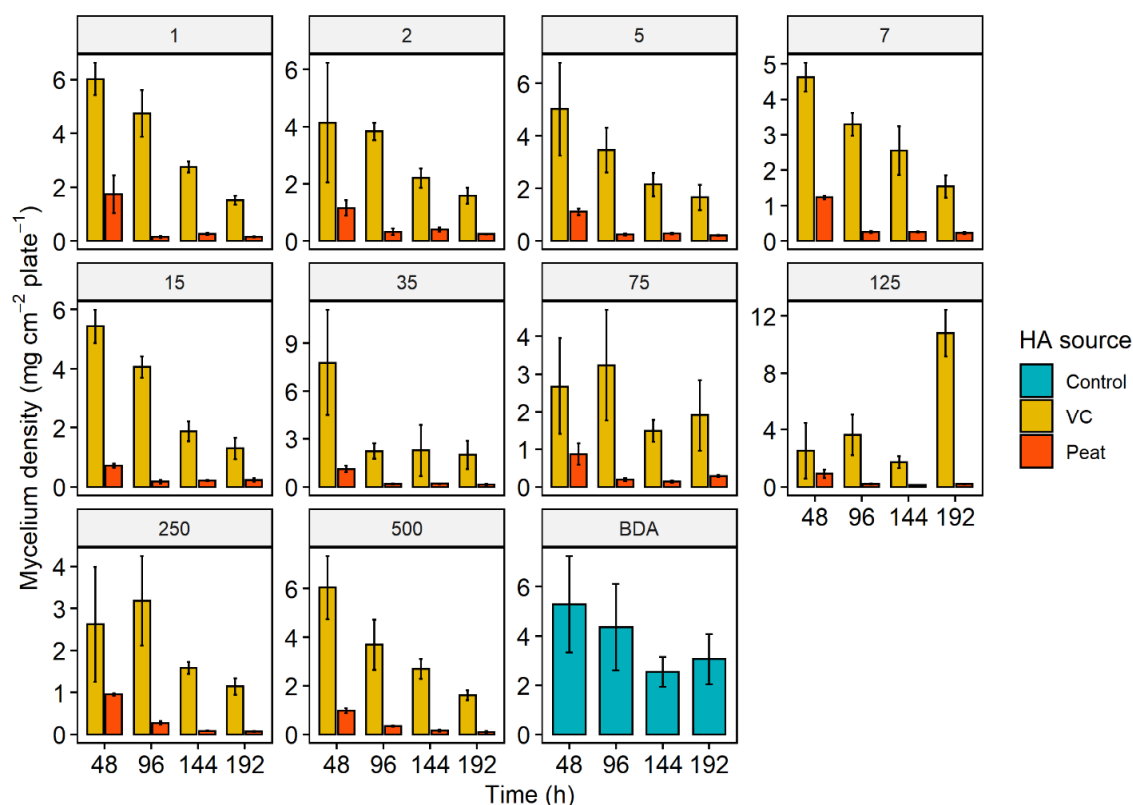


Figura 20. Densidade de micélio de *P. eryngii* em função do tempo (48, 96, 144, 192 h após a inoculação) dentro de cada nível (1, 2, 5, 7, 15, 35, 75, 125, 250, 500 mg SH L⁻¹) de doses de substâncias húmicas de vermicomposto (VC) ou turfa (peat) + controle de BDA, como fonte de carbono em meios de cultura. Cada valor é expresso como média \pm erro padrão (SE).

O comportamento da densidade do micélio, expresso como a unidade de massa micelial por unidade de área de micélio, refletiu o efeito das SH de vermicomposto e turfa já observado na produção de biomassa. Isto porque as diferenças foram mais evidentes na avaliação da densidade, uma vez que as SH de vermicomposto aplicadas a 125 mg L⁻¹ e no final do experimento (192 h) foi o único tratamento a induzir uma resposta superior ao tratamento controle (Figura 20). Enquanto, novamente as SH de turfa ocasiona mudanças no comportamento do parâmetro em momentos mais próximos do início do experimento.

4.3.6 Efeito das SH sobre a eficiência biológica

Os resultados da eficiência biológica do micélio de *P. eryngii* durante período de crescimento apresentou diferenças entre as diferentes doses de SH vermicomposto com relação ao controle que em sua maioria foi às 192 h após inoculação, sendo menores em todas as doses (Figura 21). Embora, na dose de 125 mg SH L⁻¹, apresente maior eficiência biológica do que controle (Figura 21).

Quando tratadas com SH provenientes de turfa observa-se que as diferenças com relação ao controle ocorrem às 96, 144, 192 h após inoculação (Figura 21). Com o controle sendo maior do que todas as doses.

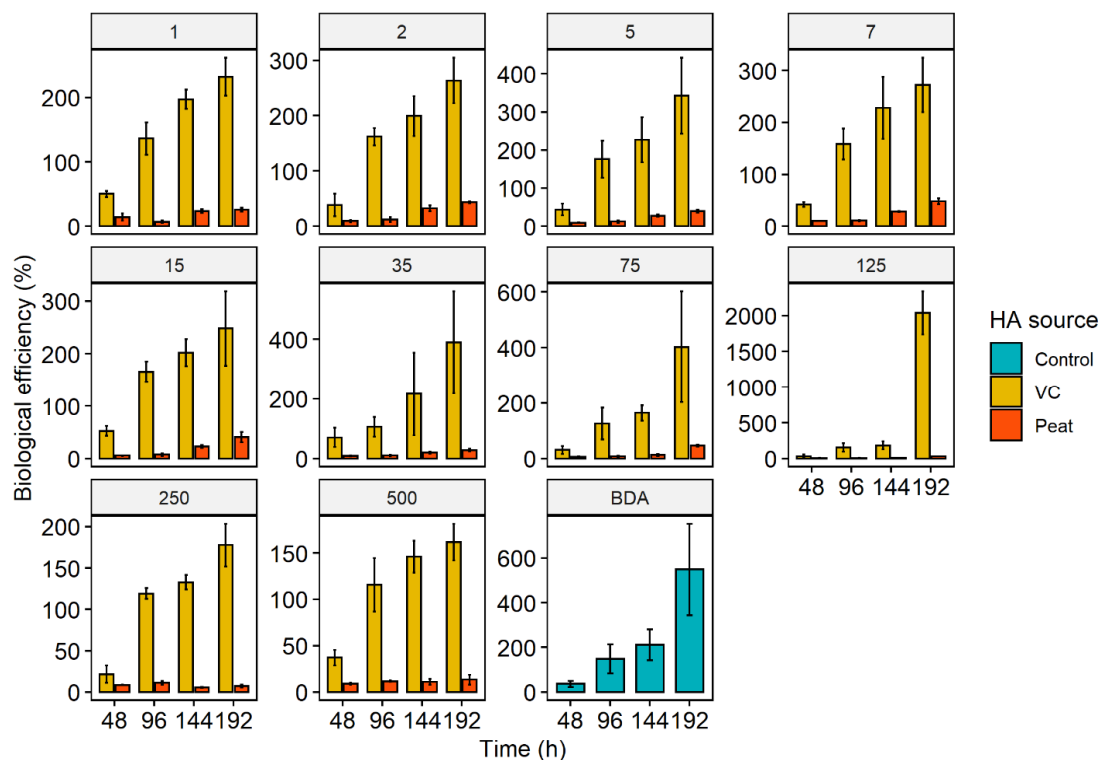


Figura 21. Eficiência biológica do micélio de *P. eryngii* em função do tempo (48, 96, 144, 192 h após a inoculação) dentro de cada nível (1, 2, 5, 7, 15, 35, 75, 125, 250, 500 mg SH L⁻¹) de doses de substâncias húmicas vermicomposto (VC) ou turfa (peat) + controle de BDA, como fonte de carbono em meio de cultura. Cada valor é expresso como média \pm erro padrão (SE).

O comportamento da eficiência biológica pela aplicação das SH foi semelhante ao observado e já discutido nos parâmetros anteriores. As SH de vermicomposto a 125 mg L⁻¹ induzem o estímulo da eficiência biológica à 192 h e isto resume os efeitos desta SH em todos os parâmetros avaliados.

Neste ponto é necessário destacar que uma comparação mais real dos efeitos observados deve ser realizada quando analisadas apenas as SH, isto porque a fonte de carbono presente no BDA não corresponde às condições de crescimento do fungo na natureza. Neste sentido, os efeitos de ambas as fontes de SH em *P. eryngii* são mais heterogêneos e evidentes para o crescimento da área e do diâmetro do micélio a todas as doses aplicadas, porém, menos intensas para a produção de biomassa.

4.3.7 Análise de componentes principais (PCA) em relação a diferentes variáveis

A análise de componentes principais (PCA) em relação às variáveis massa fresca de micélio (FW), massa seca (DW), diâmetro (Diam), área, densidade e desempenho de rendimento (YP), às 192h após a inoculação, em cada nível (1, 2, 5, 7, 15, 35, 75, 125, 250, 500 mg HS L⁻¹) de turfa (Figura 22A), reteve 99,3% da variabilidade total nos primeiros dois componentes: o componente principal (PC1) explica 65,5 % Esse componente separou o BDA em oposição aos demais tratamentos, correlacionando-se positivamente com massa fresca, massa seca, densidade e rendimento (Figura 22A). Por outro lado, as doses 250 e 500 são agrupadas no valor positivo de PC1. No entanto, PC2 explica 33,8% da variabilidade, o diâmetro e a área, fortemente relacionadas à dose 7, são projetadas negativamente (Figura 22A).

A PCA referente ao VC reteve 87,9% da variabilidade total nos dois primeiros componentes (Figura 12B). O PC1 explica 59,0% e o PC2 explica 28,9% da variabilidade. O PC1 separou a dose 125 e o BDA em oposição aos demais tratamentos, correlacionando-se positivamente com massa seca, densidade e rendimento (Figura 22B). Por outro lado, os 500 especialmente se separaram. No entanto, as doses 5 e 75 estão em PC2, positivamente correlacionadas com diâmetro e área (Figura 22B).

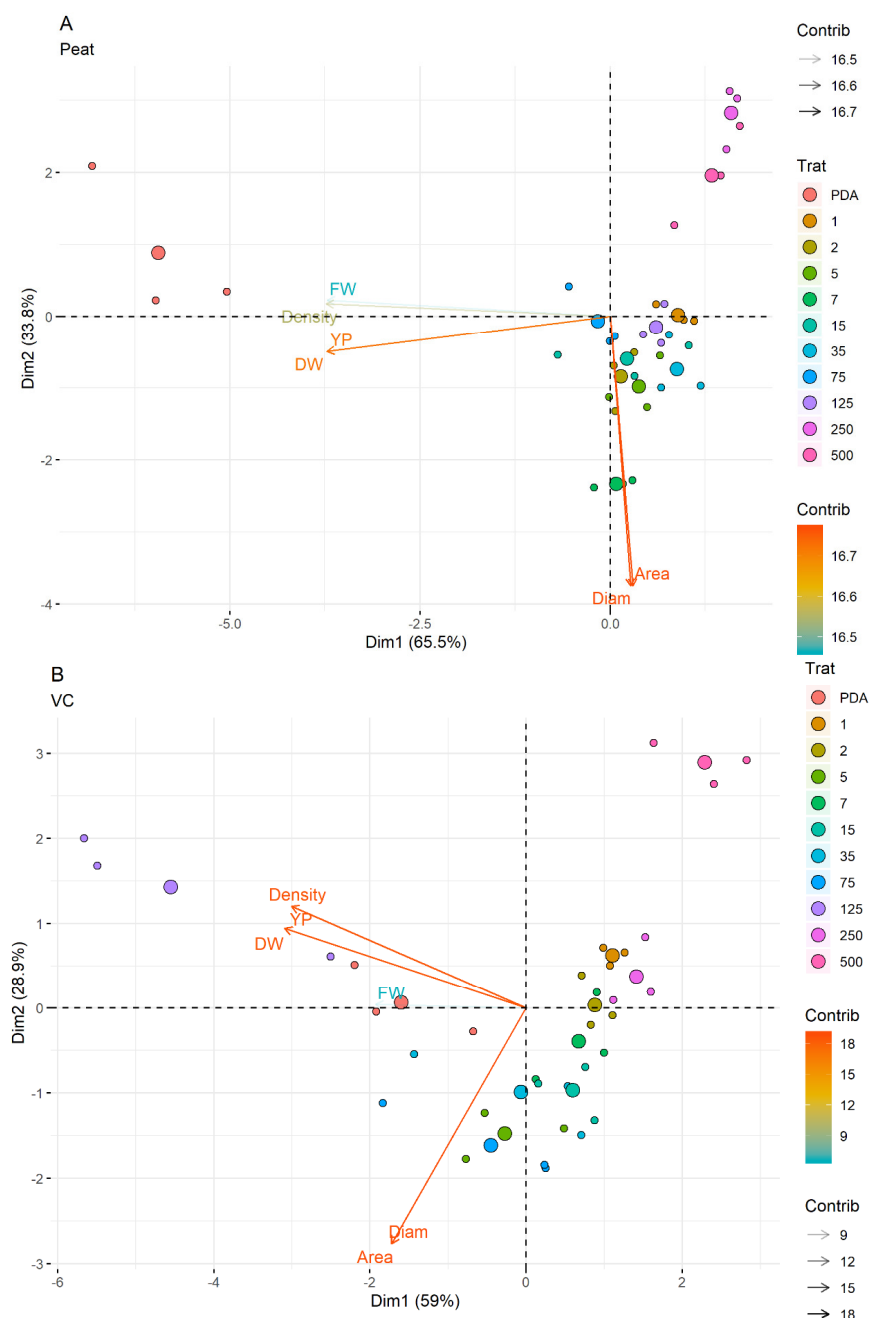


Figura 22. PCA das variáveis massa fresca de micélio (FW), massa seca (DW), diâmetro (Diam), área, densidade e Eficiência biológica (YP), em *P. eryngii* 192h após a inoculação, em cada nível (1, 2, 5, 7, 15, 35, 75, 125, 250, 500 mg HS L⁻¹) de dosagem de substâncias húmicas de turfa (A) ou vermicomposto (B) + controle de BDA (PDA).

Zahid et al. (2020) em seus estudos sobre o efeito do resíduo de algodão enriquecido com ácido húmico demonstrou que parâmetros como tempo de crescimento do micélio,

produção, eficiência biológica e minerais de fungos ostra (*Pleurotus ostreatus* e *Lentinus sajor-caju*) foram favorecidos com menos custo de produção indicando que a substância húmica em questão é considerada eficaz para o cultivo de fungos em escala comercial visto que influenciou na composição nutricional e química.

4.4 Análises de *Panus strigellus* (Berk.)

4.4.1 Efeito das substâncias húmicas sobre o crescimento e desenvolvimento do fungo

Assim como observado nos resultados obtidos para os experimentos com *Pleurotus eryngii*, as SH presentes no vermicomposto e na turfa exerceram uma regulação sobre o crescimento e desenvolvimento de *P. strigellus* (Berk.). Tais efeitos de ambas as SH dependeram das características estruturais e do tempo de avaliação (Figura 23).

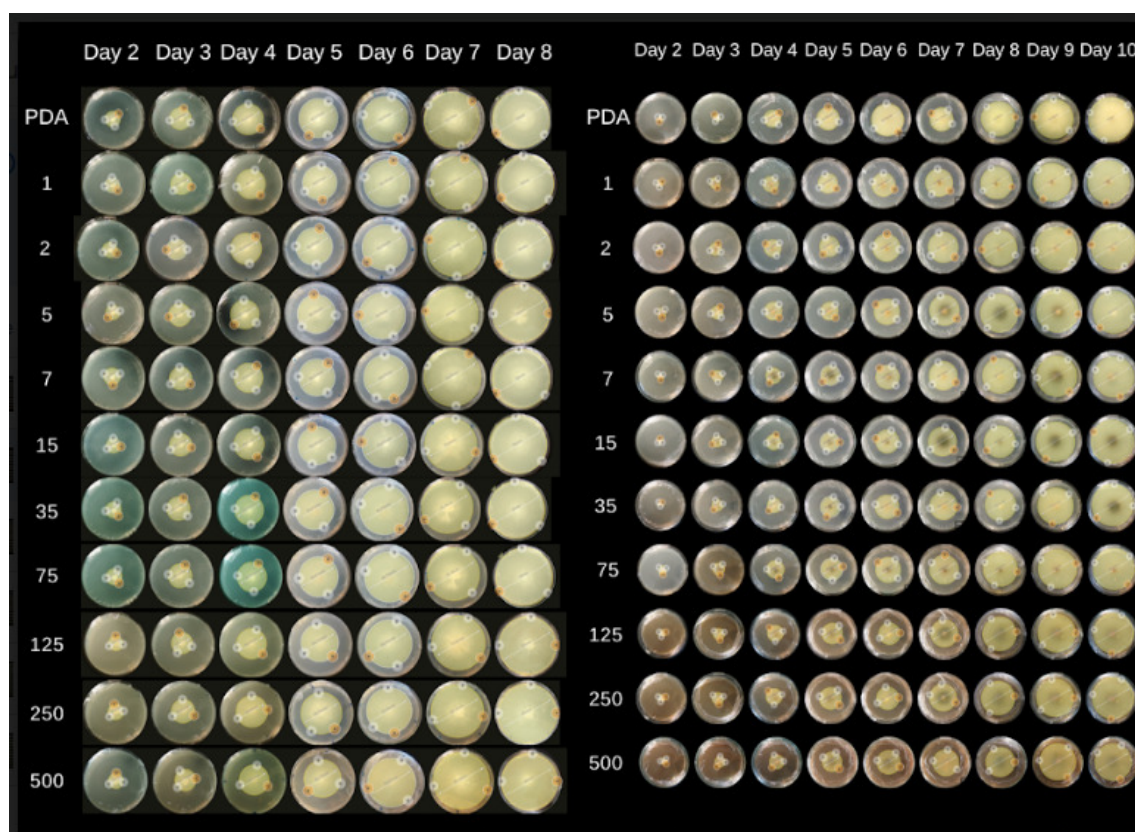


Figura 23. Medição do diâmetro de crescimento micelial de *P. strigellus* (Berk.). Tratadas com doses de substâncias húmicas de vermicomposto e turfa como fonte de carbono em meios de crescimento 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216, 240 h após a inoculação.

4.4.2 Efeito das SH sobre o diâmetro do micélio

O diâmetro de crescimento micelial em meio de cultura ágar não mostrou diferenças entre as doses de SH de vermicomposto, embora seja possível observar que às 72 horas após a inoculação ocorre uma diferenciação para a dose de 75 mg SH L⁻¹, com resultados menores quando comparado aos outros tratamentos (Figura 24). Por outro lado, o tratamento com SH de turfa mostrou às 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216 e 240 h após a inoculação, resultados similares ao controle para todas as doses. Especificamente a dose de 500 mg SH L⁻¹ que

apresentou valores inferiores ao do controle em todos os momentos de avaliação após a inoculação.

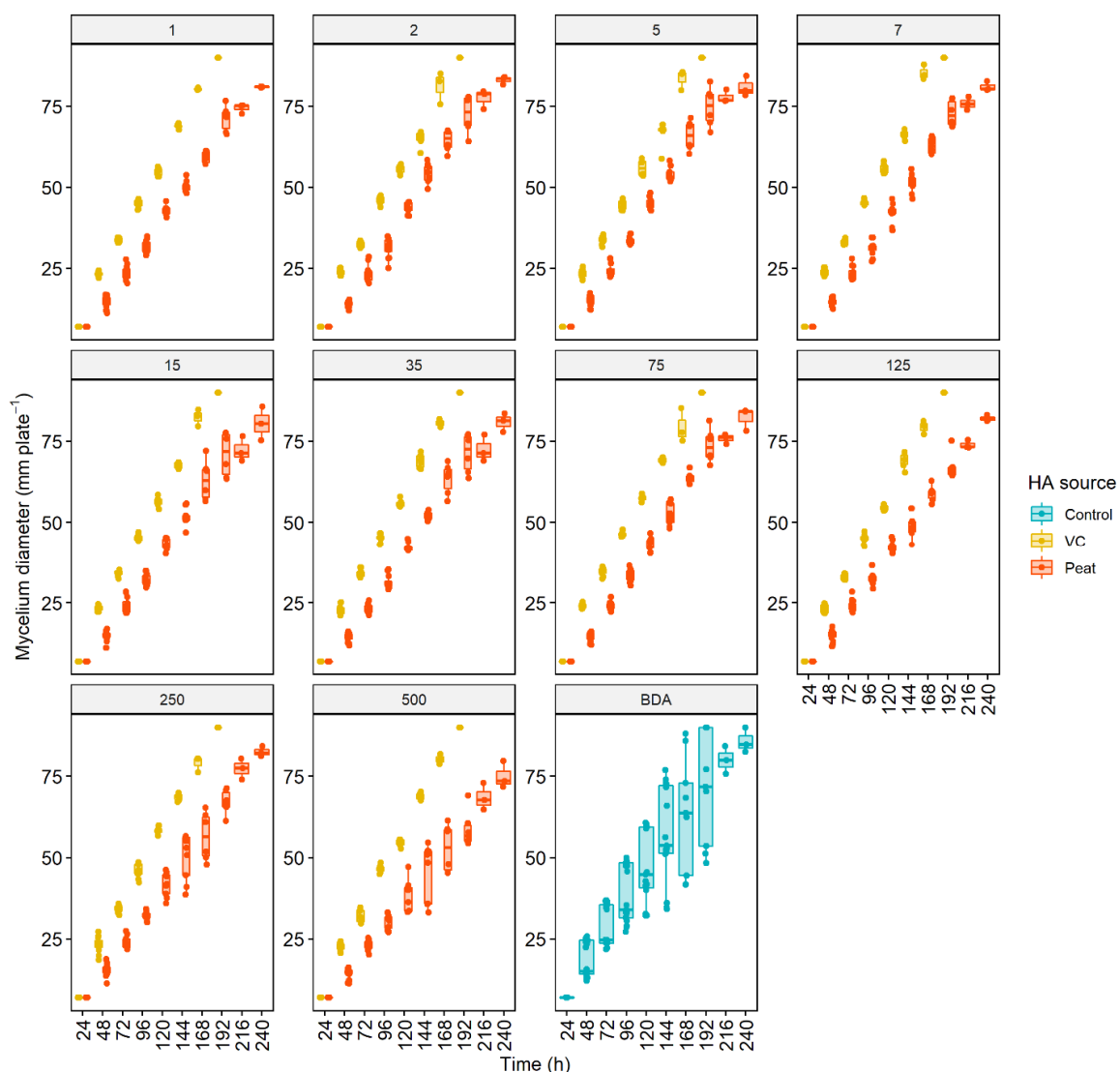


Figura 24. Diâmetro do micélio de *P. streigellus* (Berk.) em função do tempo (24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192 h após a inoculação) dentro de cada nível (1, 2, 5, 7, 15, 35, 75, 125, 250, 500 mg SH L⁻¹) de doses de substâncias húmicas de vermicomposto (VC) ou turfa (peat) + controle de BDA, como fonte de carbono em meios de cultura. Cada valor é expresso como média ± erro padrão (SE).

As SH de vermicomposto e turfa produziram estímulo ou atraso no diâmetro, de acordo com a concentração aplicada e o tempo de crescimento. Às 192 h, momento final de coleta do tratamento com VC, é possível observar que as SH extraídas de vermicomposto com predomínio de estruturas alifáticas (C_{Alkyl}-O,N e C_{Alkyl}-O) e menor hidrofobicidade, induziram estímulo do diâmetro em todas as concentrações de forma bem similar, acelerando a ocupação de toda placa (Figura 24). Assim, pode ser observado que com SH extraídas de turfa demorou até 240 h para ocorrer ocupação de toda placa com a turfa bem como para o controle de BDA, pois a SH de turfa apresentam uma quantidade maior de estruturas com baixa funcionalização química (C_{Alkyl}-H,R e C_{Aromatic}-H,R), maior aromaticidade e hidrofobicidade.

4.4.3 Efeito das SH sobre a área do micélio

Os resultados de área micelial de *P. strigellus* (Berk.) durante o crescimento em meio de cultura, não apresentou diferenças evidentes entre as doses de SH de vermicomposto e o controle às 48, 96 e 144 h após a inoculação (Figura 25). Desta forma, nestes períodos tanto o controle quanto as diferentes doses de SH de vermicomposto influenciaram o crescimento micelial de forma similar. Entretanto, às 48 h de coleta, as diferentes doses de SH foram maiores do que o controle. Em contrapartida, quando tratadas com SH provenientes de turfa foram evidenciadas maiores diferenças, principalmente na dose de 500 mg SH L⁻¹ e a partir das 96 h após a inoculação quando comparado ao controle (Figura 25). Nas demais doses, o crescimento micelial é influenciado de forma similar.

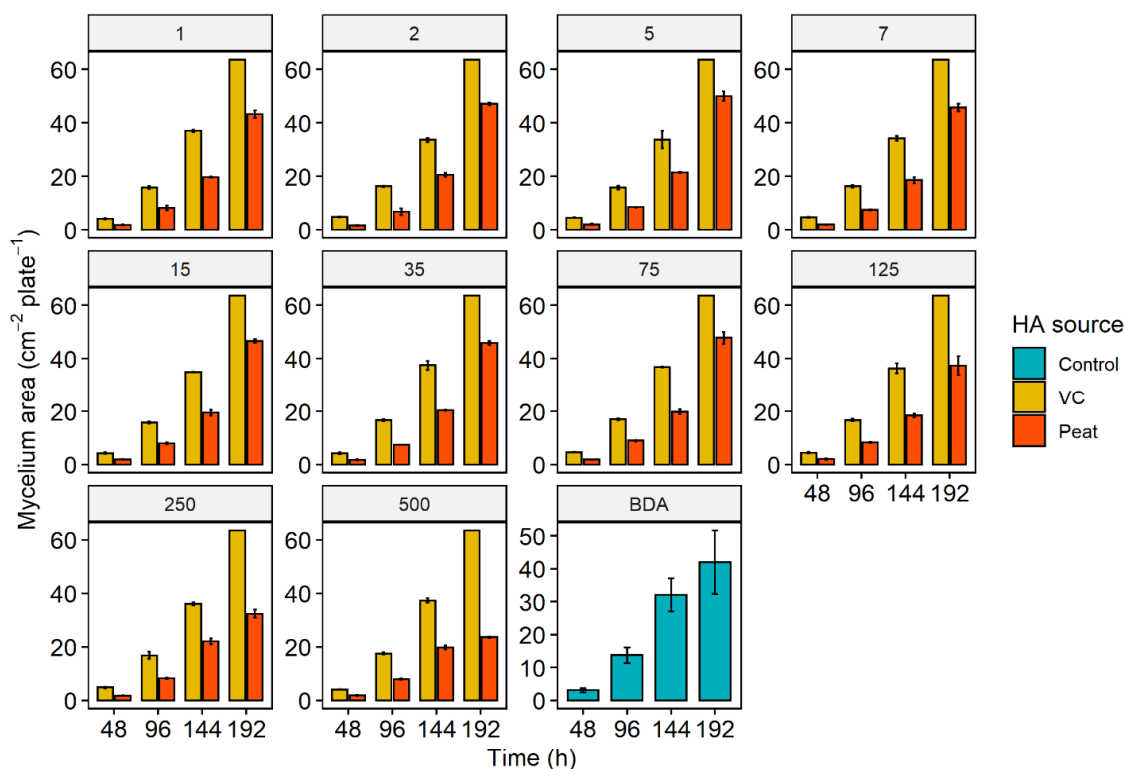


Figura 25. Área de micélio de *P. strigellus* (Berk.). em função do tempo (48, 96, 144, 192 h após a inoculação) dentro de cada nível (1, 2, 5, 7, 15, 35, 75, 125, 250, 500 mg SH L⁻¹) de doses de substâncias húmicas de vermicomposto (VC) ou turfa (peat) + controle de BDA, como fonte de carbono em meio de cultura. Cada valor é expresso como média \pm erro padrão (SE).

O estímulo na área do micélio parece ser mais tardio quando aplicada as SH extraídas de turfa ao fungo em comparação com o efeito de substância húmica de vermicomposto (Figura 25). Estes resultados parecem indicar que o efeito de aumentar a área micelial em *Panus strigellus* (Berk.) pode ser induzido em um primeiro estágio (até às 48 h) por estruturas predominantemente aromáticas (C_{Aromatic}-H,R e C_{Aromatic}-O,N), provavelmente pertencentes a fragmentos de lignina bem como cadeias alifáticas oxigenadas (C_{Alkyl}-O) pertencentes a carboidratos e derivados ligníticos. Posteriormente, cadeias alifáticas oxigenadas (C_{Alkyl}-O) seriam responsáveis pela manutenção deste estímulo de uma maneira mais significativa.

4.4.4 Efeito das SH sobre a massa fresca e seca micelial

A massa fresca micelial medida durante o crescimento em meio de cultura BDA, teve diferenças mais evidentes para as doses de SH de vermicomposto e quando comparada ao controle (Figura 26). Estas diferenças são mais evidentes a partir das 96 h, no entanto, para as doses 2, 15, 35 e 75 mg SH L⁻¹, as maiores diferenças podem ser observadas a partir das 48 h. As diferenças apresentadas demonstram que o crescimento micelial de *Panus strigellus* (Berk.) foi maior e melhor sobre a influência das diferentes doses de SH de vermicomposto em relação ao controle.

A produção de massa fresca micelial apresentou diferenças significativas entre as diferentes doses de SH de turfa (Figura 26) em relação ao controle especialmente às 96 e 144 h após a inoculação. Após às 192 h de inoculação todas as diferentes doses de SH apresentaram um crescimento micelial representativo em relação ao momento anterior, exceto para a dose de 500 mg SH L⁻¹ que apresentou crescimento similar constante desde às 96 h após a inoculação até o final do experimento. Em todas as épocas de coleta o controle proporcionou maior desenvolvimento do que todas as doses de SH de turfa, sendo melhor para o crescimento micelial de *Panus strigellus* (Berk.).

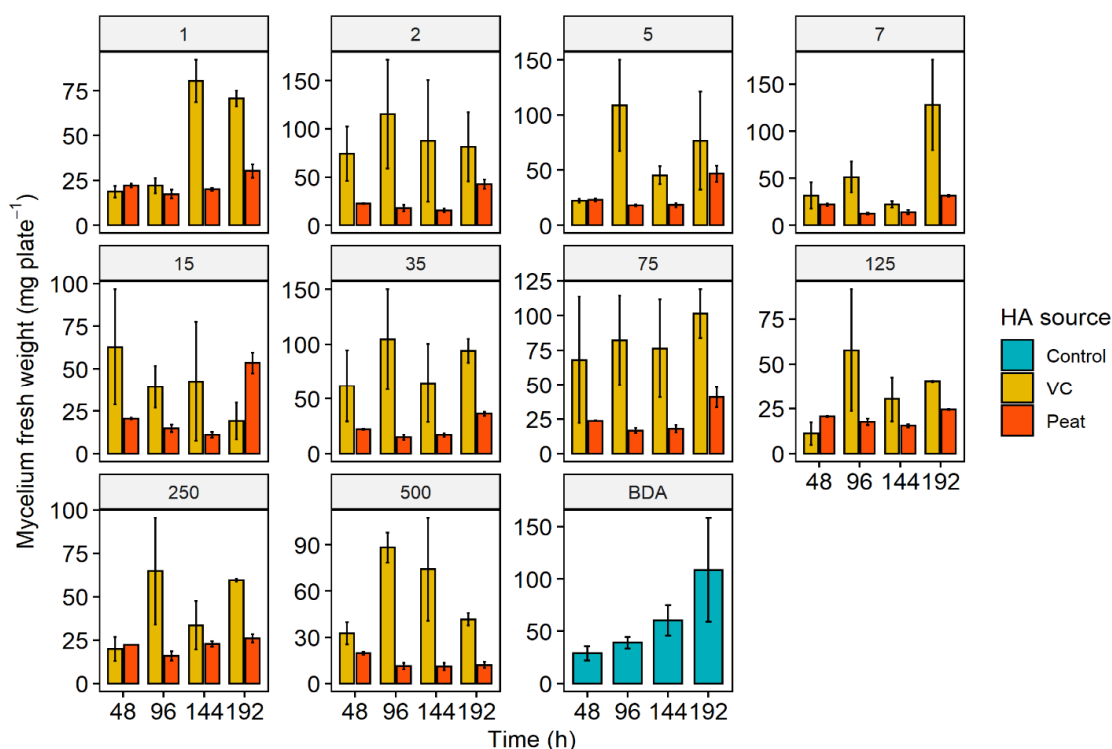


Figura 26. Massa fresca de micélio de *Panus strigellus* (Berk.). em função do tempo (48, 96, 144, 192 h após a inoculação) dentro de cada nível (1, 2, 5, 7, 15, 35, 75, 125, 250, 500 mg SH L⁻¹) de doses de substâncias húmicas de vermicomposto (VC) ou turfa (peat) + controle de BDA, como fonte de carbono em meio de cultura. Cada valor é expresso como média \pm erro padrão (SE).

Os resultados obtidos para produção de massa seca micelial de *Panus strigellus* (Berk.) mostraram diferenças entre as doses de SH de vermicomposto em relação ao controle, isto para todos os momentos de coleta após a inoculação. Com o controle sendo maior em todas as doses (Figura 27).

Quando tratadas com SH provenientes de turfa as diferenças em relação ao controle também ocorrem em todos os momentos de coleta após a inoculação sendo maiores em todas as doses (Figura 26).

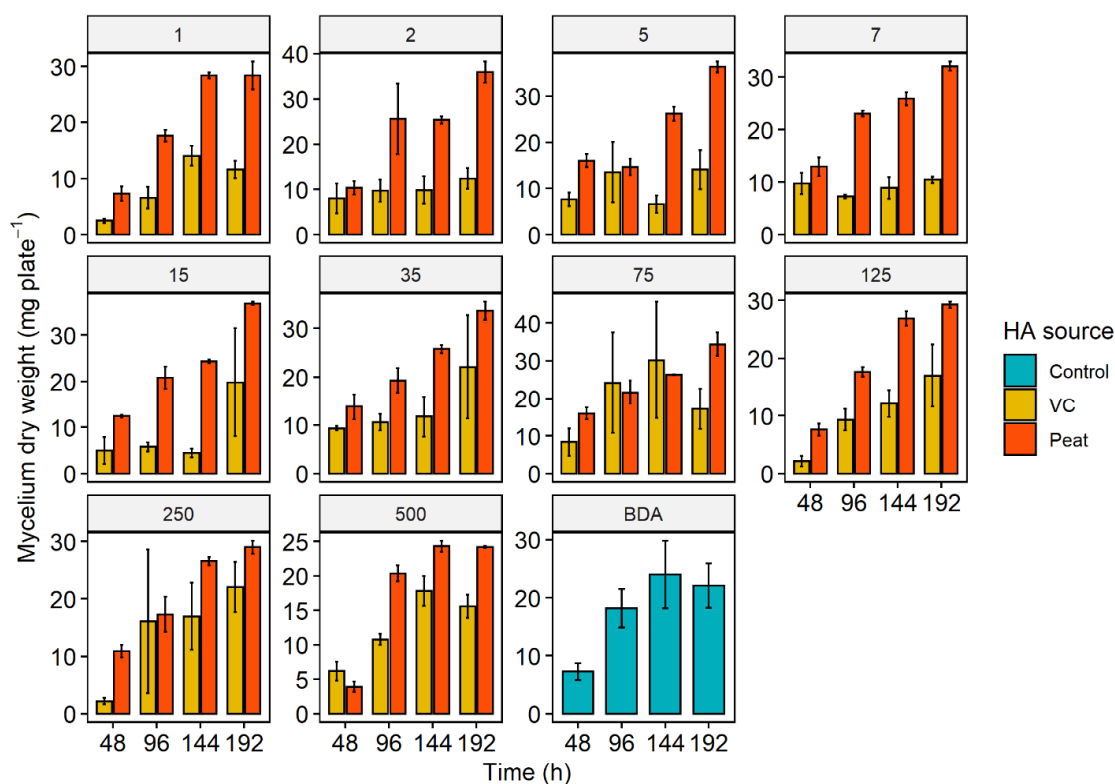


Figura 27. Massa seca de micélio de *Panus strigellus* (Berk.). em função do tempo (48, 96, 144, 192 h após a inoculação) dentro de cada nível (1, 2, 5, 7, 15, 35, 75, 125, 250, 500 mg SH L⁻¹) de doses de substâncias húmicas de vermicomposto (VC) ou turfa (peat) + controle de BDA, como fonte de carbono em meio de cultura. Cada valor é expresso como média ± erro padrão (SE).

As SH extraídas de vermicomposto e turfa demonstraram indução expressiva na produção de biomassa quando comparada com o controle (condições ideais de crescimento) sendo que, as doses contendo SH provenientes de vermicomposto influenciaram a produção de massa fresca em detrimento das doses contendo SH provenientes de turfa que influenciaram a produção de massa seca.

No entanto, quando observado o comportamento entre as doses de SH de sua fonte de origem, novamente se evidenciam diferenças nos efeitos em relação à concentração e o tempo. Os efeitos exercidos na produção de biomassa novamente foram evidentes mais cedo em SH de vermicomposto (menos aromáticas e hidrofílicas) enquanto as SH de turfa, preservam ou respondem por este efeito nos diferentes momentos do experimento.

4.4.5 Efeito das SH sobre a densidade micelial

Os resultados da densidade micelial calculados em *Panus strigellus* (Berk.) durante o período de meio de cultura, apresentou uma tendência de redução ao longo do tempo (Figura 28). As diferenças significativas entre as diferentes doses de SH de vermicomposto com o controle foram observadas em todos os momentos após a inoculação sendo o controle maior em todas as doses.

Quando tratadas com SH provenientes de turfa, as diferenças com relação ao controle ocorrem em sua maioria às 48 h após a inoculação, sendo maiores em todas as doses. Embora, na dose de 500 mg SH L⁻¹ seja única menor do que o controle.

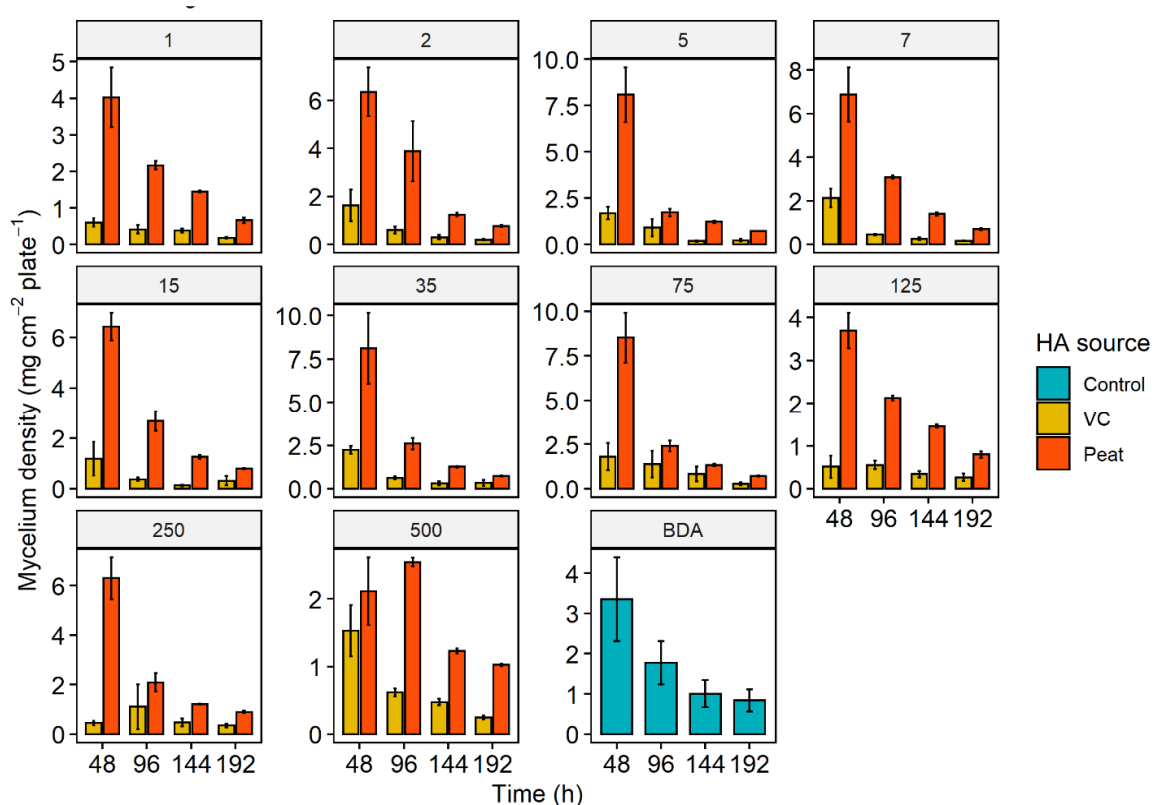


Figura 28. Densidade de micélio de *Panus strigellus* (Berk.). em função do tempo (48, 96, 144, 192 h após a inoculação) dentro de cada nível (1, 2, 5, 7, 15, 35, 75, 125, 250, 500 mg SH L⁻¹) de doses de substâncias húmicas de vermicomposto (VC) ou turfa (peat) + controle de BDA, como fonte de carbono em meios de cultura. Cada valor é expresso como média \pm erro padrão (SE).

O comportamento da densidade do micélio, expressado como a unidade de massa micelial por unidade de área, refletiu o efeito das SH de vermicomposto e de turfa já observado na produção de biomassa. Isto porque, as SH de turfa ocasionam mudanças no comportamento do parâmetro em todos os momentos do experimento. Estas diferenças foram mais evidentes na avaliação da densidade, uma vez que as SH de vermicomposto aplicadas em todas as doses e em todos os momentos do experimento induziram respostas inferiores ao tratamento controle.

4.4.6 Efeito das SH sobre a eficiência biológica

Os resultados da eficiência biológica do micélio de *P. strigellus* (Berk.). durante o período de crescimento apresentou diferenças significativas entre as diferentes doses de SH de vermicomposto em relação ao controle às 96, 144 e 192 h após a inoculação, sendo o controle maior do que todas as doses (Figura 29).

Quando tratadas com SH provenientes de turfa as diferenças ocorreram em todos os momentos após a inoculação sendo que as doses apresentaram eficiência biológica maiores do que o controle (Figura 29).

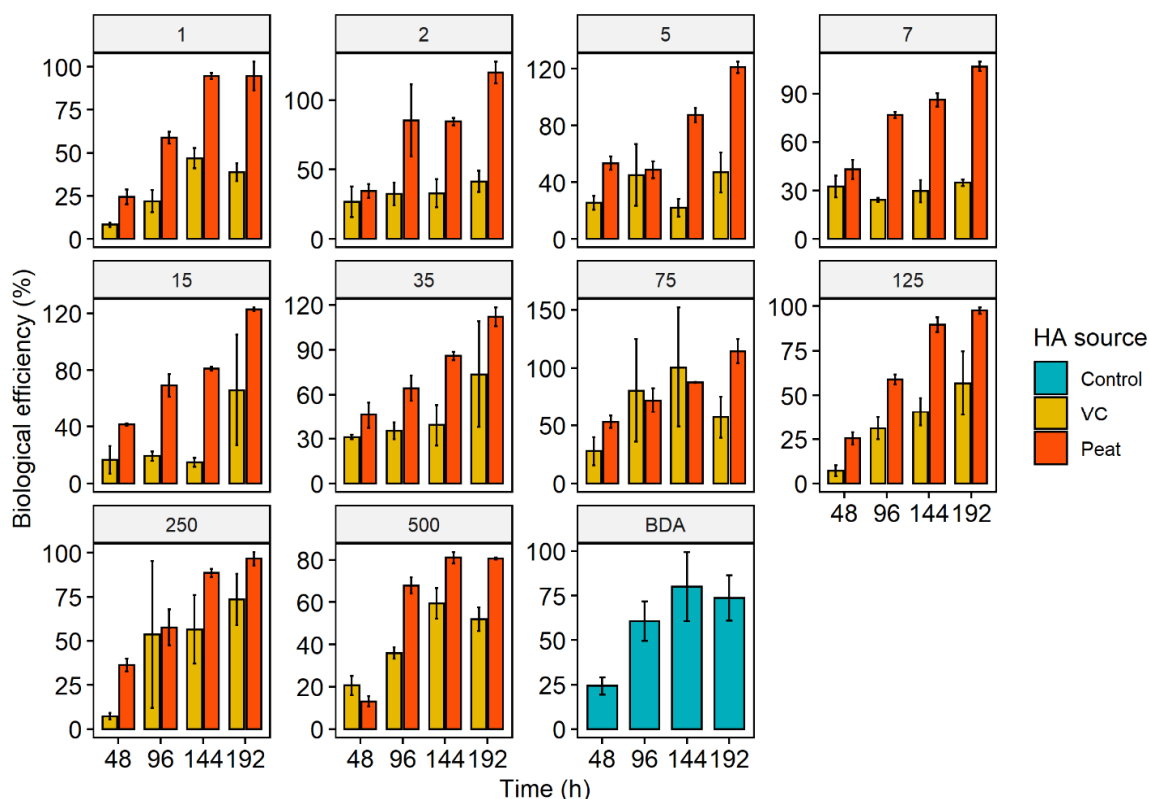


Figura 29. Eficiência biológica do micélio de *P. strigellus* (Berk.). em função do tempo (48, 96, 144, 192 h após a inoculação) dentro de cada nível (1, 2, 5, 7, 15, 35, 75, 125, 250, 500 mg SH L⁻¹) de doses de substâncias húmicas vermicomposto (VC) ou turfa (peat) + controle de BDA, como fonte de carbono em meio de cultura. Cada valor é expresso como média ± erro padrão (SE).

O comportamento da eficiência biológica pela aplicação das SH foi semelhante ao observado e já discutido nos parâmetros anteriores. As SH de turfa em todas as diferentes doses e em todos os momentos do experimento induziram o estímulo da eficiência biológica e isto resume os efeitos desta SH em todos os parâmetros avaliados.

Faz-se necessário destacar que uma comparação mais real dos efeitos observados deve ser realizada, isto porque a fonte de carbono presente no BDA não corresponde às condições de crescimento do fungo em condições naturais. Neste sentido, os efeitos de ambas as fontes de SH em *P. strigellus* (Berk.) foram mais homogêneos para o crescimento do diâmetro do micélio a todas as doses aplicadas, porém mais heterogêneas e evidentes para a produção de biomassa.

4.4.7 Análise de componentes principais (PCA) para as variáveis mensuradas em *Panus strigellus*

A análise de componentes principais (PCA) em relação às variáveis massa fresca de micélio (FW), massa seca (DW), diâmetro (Diam), área, densidade e eficiência biológica (YP), às 144h após a inoculação, em cada nível (1, 2, 5, 7, 15, 35, 75, 125, 250, 500 mg HS L⁻¹) de turfa (Figura 30A), reteve 96,8% da variabilidade total nos primeiros dois componentes: o componente principal (PC1) explica 60,7 % Esse componente separou o BDA em oposição aos demais tratamentos, correlacionando-se positivamente com massa seca, eficiência biológica (Figura 30A). Por outro lado, as doses 15 e 500 são agrupadas no valor positivo de PC1. No entanto, PC2 explica 36,1% da variabilidade, o diâmetro e a área, fortemente relacionadas à dose 15 e 250, são projetadas negativamente (Figura 30A).

A PCA referente ao VC reteve 87,7% da variabilidade total nos dois primeiros componentes (Figura 30B). O PC1 explica 55,9% e o PC2 explica 31,8% da variabilidade. O PC1 separou a dose 75, 250, 500 e o BDA em oposição aos demais tratamentos, correlacionando-se positivamente com massa seca, eficiência biológica (Figura 30B). Por outro lado, na PC2 o BDA especialmente se separou dos demais negativamente. No entanto, as doses 2, 5 e 7 estão positivamente correlacionadas na PC2 com diâmetro e área (Figura 30B).

Ao analisar o crescimento e a respiração de basidiomicetos sob condições limitadas de carbono, Klein et al (2014) sugeriu que sob condições que imitam o ambiente natural a adição de substâncias húmicas no substrato resultou no aumento de rendimento de massa além de afetar positivamente alterações fisiológicas, bioquímicas e morfológicas dos fungos *Trametes máxima*.

4.5 Análises de *Ganoderma lucidum*

4.5.1 Efeito das substâncias húmicas sobre o crescimento e desenvolvimento do fungo

As SH isoladas de vermicomposto e turfa regularam de forma diferenciada o crescimento e desenvolvimento de *Ganoderma lucidum* (Figura 31). Os efeitos de ambas as SH dependeram das características estruturais e do tempo de avaliação.

Pode-se ainda observar que ao longo do tempo não houve crescimento e desenvolvimento do fungo em questão com a fonte de SH proveniente do vermicomposto na dose 500 mg SH L⁻¹.

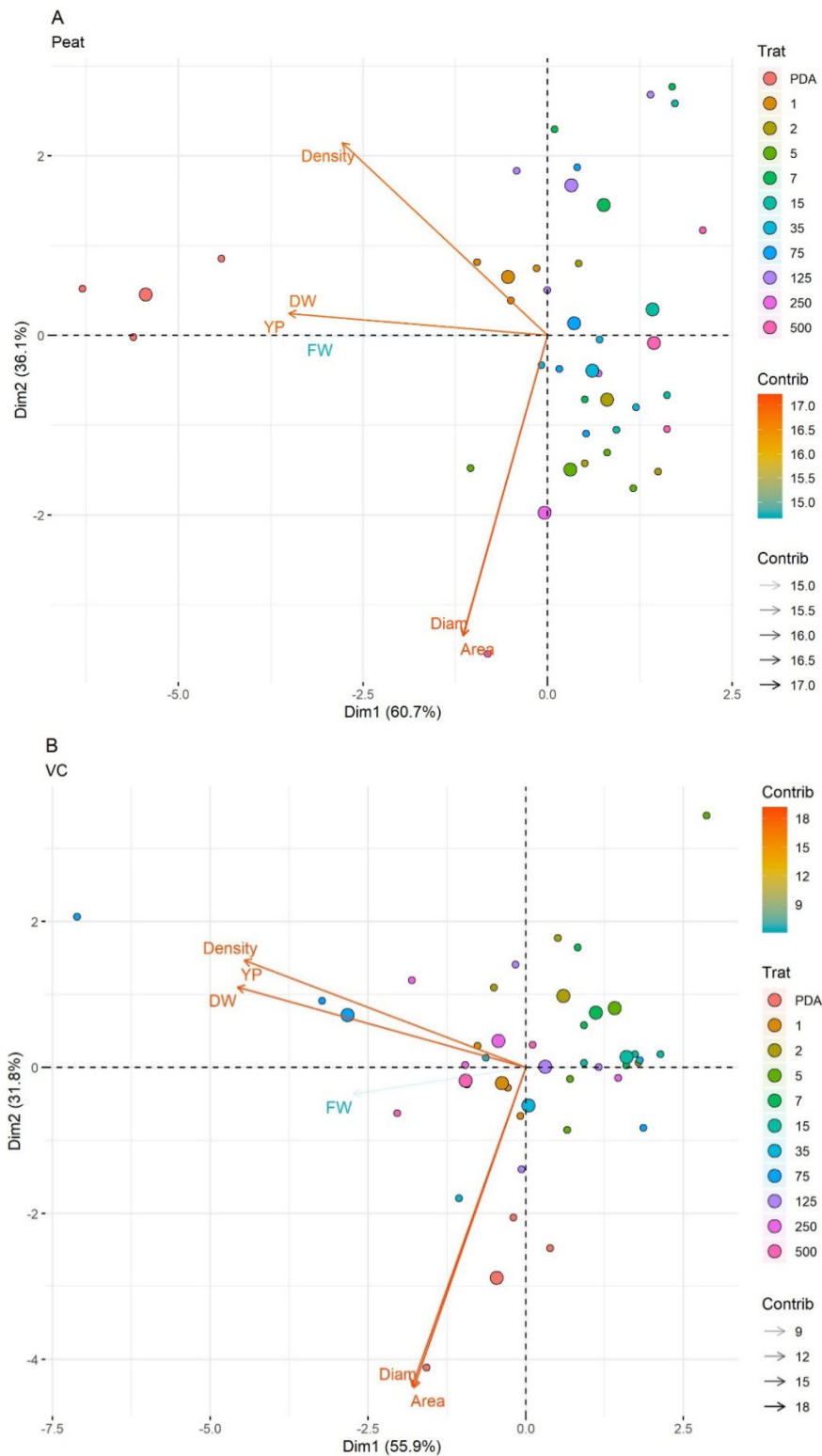


Figura 30. PCA das variáveis massa fresca de micélio (FW), massa seca (DW), diâmetro (Diam), área, eficiência biológica (YP), de *Panus strigellus* (Berk.) 144h após a inoculação, em cada nível (1, 2, 5, 7, 15, 35, 75, 125, 250, 500 mg SH L⁻¹) de dose de substâncias húmicas de turfa (A) ou vermicomposto (B) + controle de BDA (PDA).

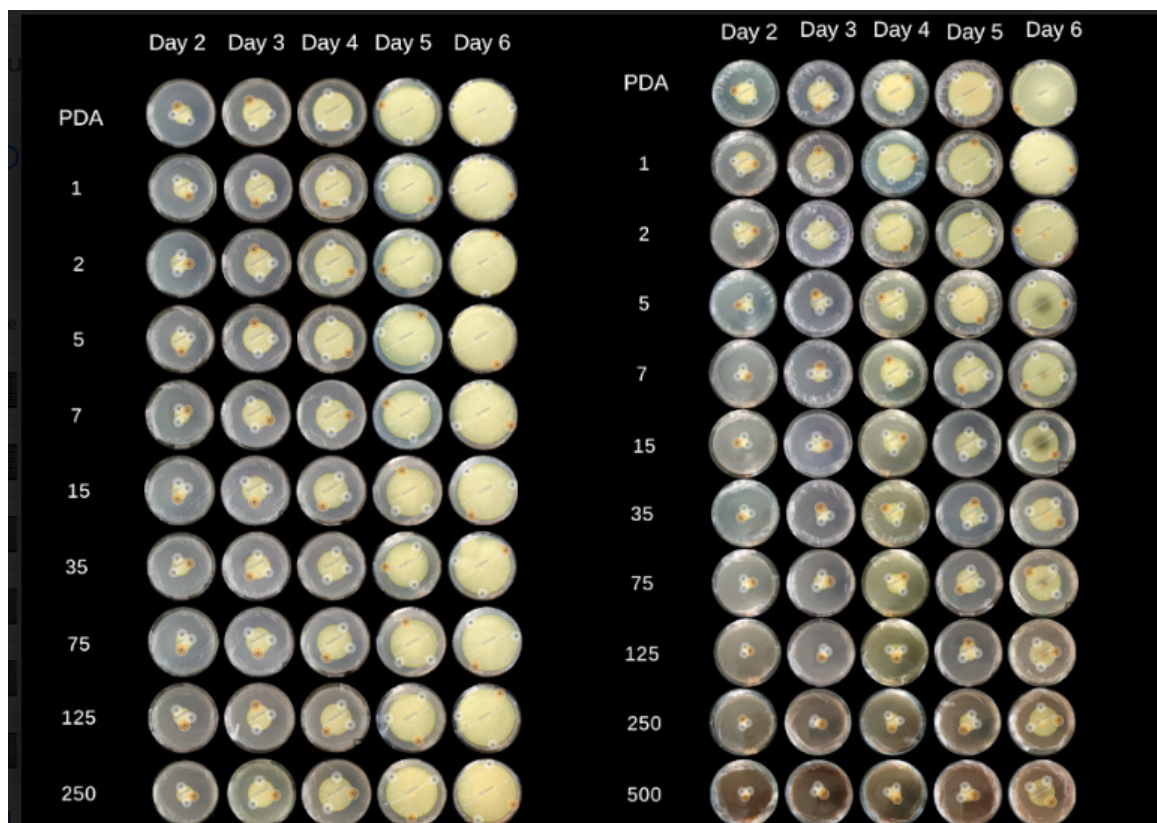


Figura 31. Medição do diâmetro de crescimento micelial de *G. lucidum* com doses de substâncias húmicas de vermicomposto e turfa como fonte de carbono em meios de crescimento 48, 72, 96, 120, 144 h após a inoculação.

4.5.2 Efeito das SH sobre o diâmetro do micélio

Com base nos resultados obtidos do diâmetro de crescimento micelial em meio de cultura ágar, é possível observar que as diferenças significativas entre as doses de SH de vermicomposto ocorrem às 48 h depois da inoculação, sendo maiores nas doses 2, 5, 75 e 250 mg SH L⁻¹, com a melhor dose 250 mg SH L⁻¹ (Figura 32). Este padrão se repete ao longo do tempo até às 144 h após a inoculação que corresponde ao final do experimento.

Ao serem tratadas com SH provenientes de turfa observa-se que todas as doses apresentaram resultados menores do que o controle às 48, 72, 96, 120, 144 h após a inoculação sendo que os tratamentos 125 e 250 mg SH L⁻¹ proporcionaram os piores resultados.

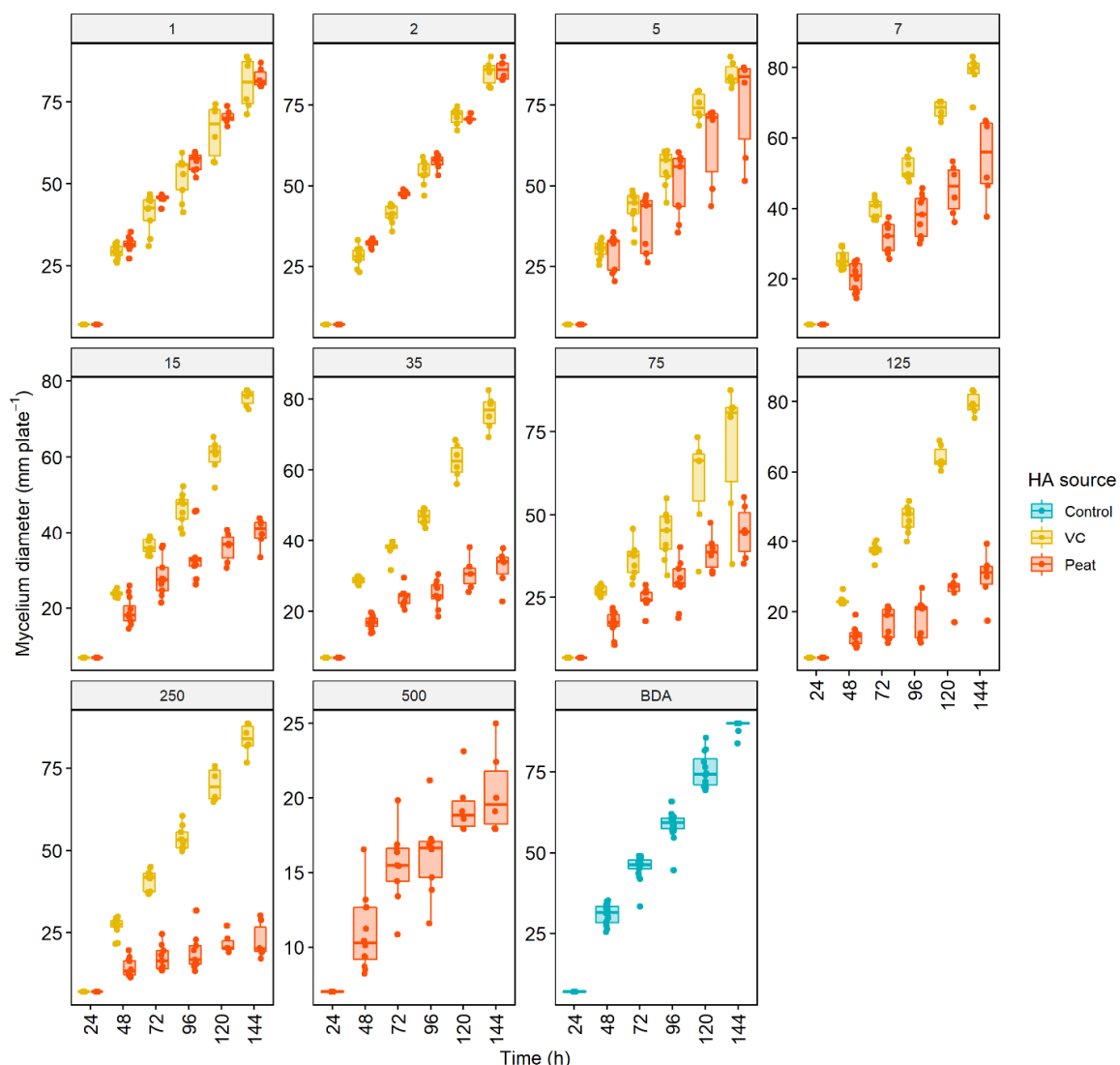


Figura 32. Diâmetro do micélio de *G. lucidum* em função do tempo (24, 48, 72, 96, 120, 144 h após a inoculação) dentro de cada nível (1, 2, 5, 7, 15, 35, 75, 125, 250, 500 mg SH L⁻¹) de doses de substâncias húmicas de vermicomposto (VC) ou turfa (peat) + controle de BDA, como fonte de carbono em meios de cultura. Cada valor é expresso como média \pm erro padrão (SE).

Os efeitos das SH de ambas as fontes de origem induzem mudanças no crescimento do diâmetro micelial de forma diferenciada. As SH de vermicomposto e turfa produzem estímulo ou atraso no diâmetro, de acordo com a concentração aplicada e o tempo de crescimento. Às 144 h, momento final do experimento (Figura 32), é possível observar que as SH extraídas de vermicomposto com predomínio de estruturas alifáticas (C_{Alkyl}-O,N e C_{Alkyl}-O) e menor hidrofobicidade, induzem estímulo do diâmetro a maiores concentrações (75 e 125 mg L⁻¹). Por outro lado é possível observar que as SH extraídas de turfa com maior presença de estruturas com baixa funcionalização química (C_{Alkyl}-H,R e C_{Aromatic}-H,R), maior aromaticidade e hidrofobicidade, induzem estímulo do diâmetro a concentrações menores (1, 2 e 5 mg L⁻¹).

4.5.3 Efeito das SH sobre a área do micélio

Os resultados de área micelial em *Ganoderma lucidum* apresentaram diferenças significativas entre as doses de SH de vermicomposto em relação ao controle em todos os momentos após a inoculação bem como em todas as doses utilizadas (Figura 33). Nos parâmetros analisados, as SH provenientes de vermicomposto apresentaram melhores resultados quando comparadas ao controle.

Quando tratadas com SH provenientes de turfa observa-se que as diferenças entre o controle são significativas às 96, 144 h após a inoculação sendo maiores nas doses 125, 250 e 500 mg SH L⁻¹ e maiores do que o controle nas doses 2, 5, 7, 15, 35 e 75 mg SH L⁻¹.

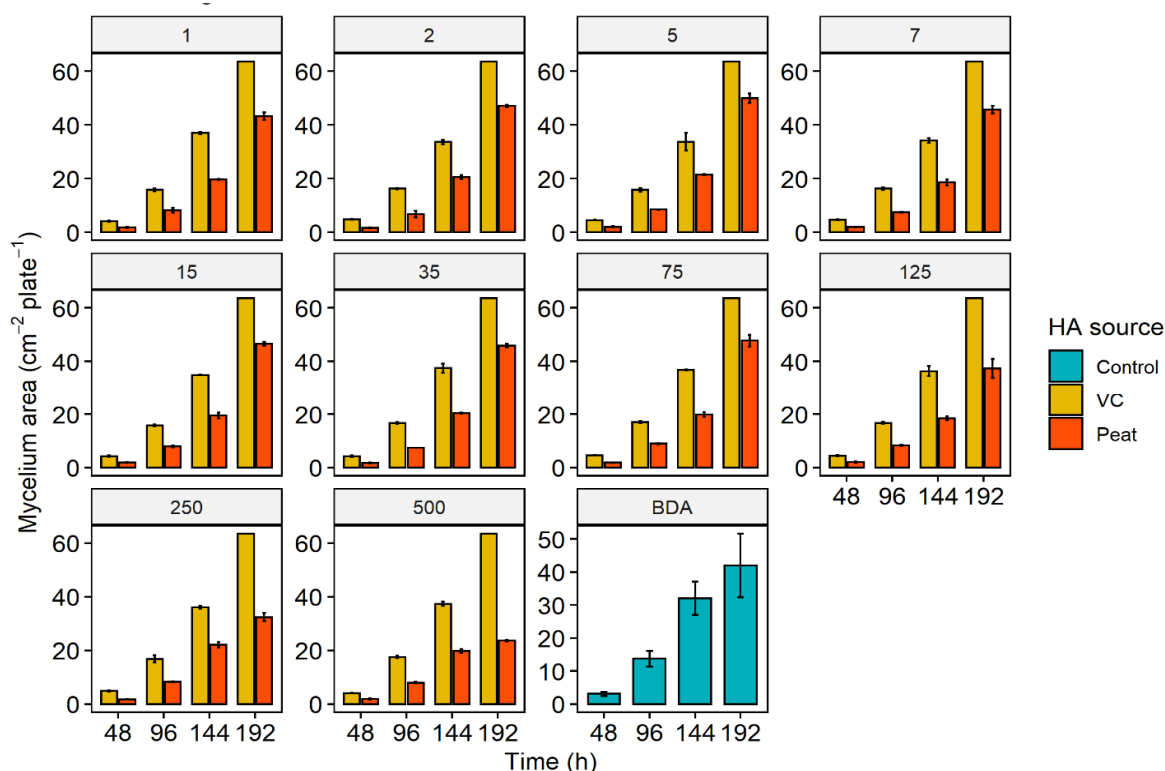


Figura 33. Área de micélio de *G. lucidum* em função do tempo (48, 96, 144, 192 h após a inoculação) dentro de cada nível (1, 2, 5, 7, 15, 35, 75, 125, 250, 500 mg SH L⁻¹) de dose de substâncias húmicas de vermicomposto (VC) ou turfa (peat) + controle de BDA, como fonte de carbono em meio de cultura. Cada valor é expresso como média \pm erro padrão (SE).

O estímulo na área do micélio parece ser mais tardio quando aplicada as SH extraídas de turfa ao fungo em comparação com o efeito da aplicação das SH de vermicomposto (Figura 33). Estes resultados parecem indicar que o efeito de aumentar a área micelial em *Ganoderma lucidum* pode ser induzida em um primeiro estágio por estruturas alifáticas oxigenadas (C_{Alkyl}-O) provavelmente pertencentes a carboidratos e derivados lignínicos. Posteriormente, estruturas predominantemente aromáticas (C_{Aromatic}-H,R e C_{Aromatic}-O,N) seriam responsáveis pela manutenção deste estímulo.

4.5.4 Efeito das SH sobre a massa fresca e seca micelial

Com base nos resultados obtidos da produção de massa fresca micelial durante o crescimento em meio de cultura ágar, houve diferenças significativas entre as diferentes doses de SH de vermicomposto em relação ao controle. Em todos os períodos de coleta o controle foi maior do que todas as doses, sendo o melhor para o crescimento micelial de *G. lucidum* (Figura 34). Os resultados obtidos para a produção de massa fresca provenientes de SH de turfa em relação ao controle foram os mesmos observados na outra fonte de SH onde o controle sobressaiu em todos os períodos de coleta em relação às doses.

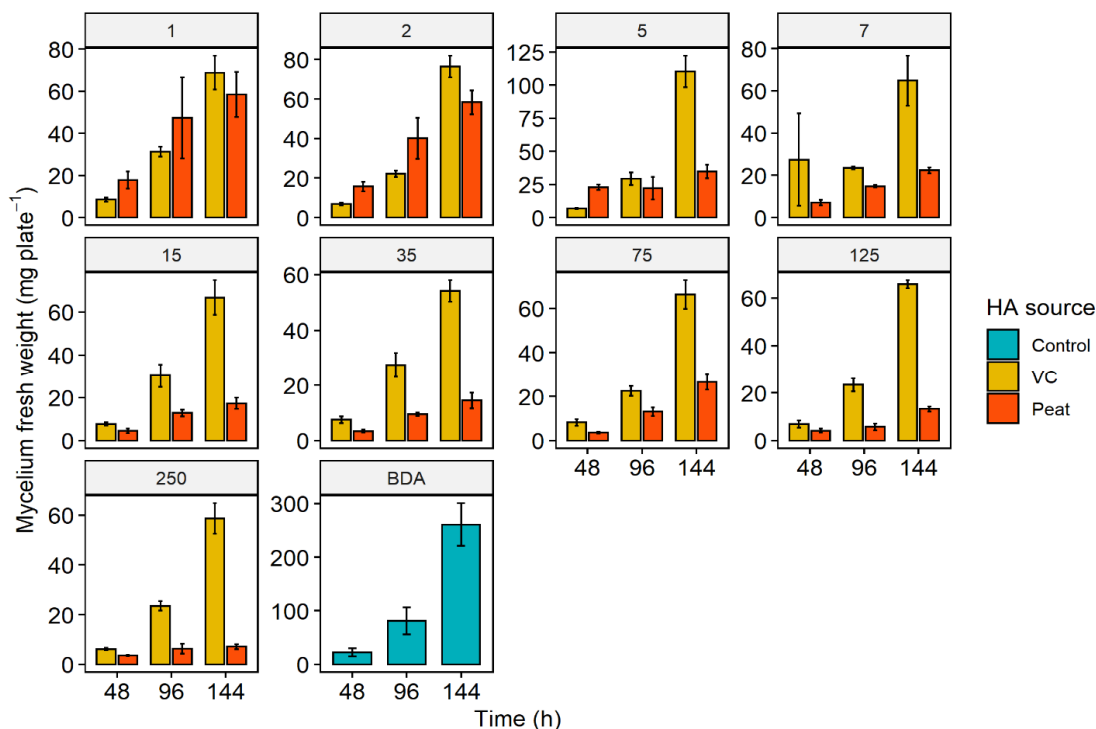


Figura 34. Massa fresca de micélio de *G. lucidum* em função do tempo (48, 96, 144, 192 h após a inoculação) dentro de cada nível (1, 2, 5, 7, 15, 35, 75, 125, 250mg SH L⁻¹) de doses de substâncias húmicas de vermicomposto (VC) ou turfa (peat) + controle de BDA, como fonte de carbono em meio de cultura. Cada valor é expresso como média \pm erro padrão (SE).

Os resultados obtidos na produção de massa seca micelial em *Ganoderma lucidum* durante o crescimento em meio de cultura apresentaram diferenças significativas entre as diferentes doses de SH de vermicomposto com relação ao controle (Figura 35), em todos os momentos após a inoculação sendo o controle maior do que todas as doses testadas.

Resultados similares foram observados no tratamento com SH provenientes de turfa onde o controle também apresentou melhor produção de massa seca micelial do que todas as doses em todos os períodos de coleta.

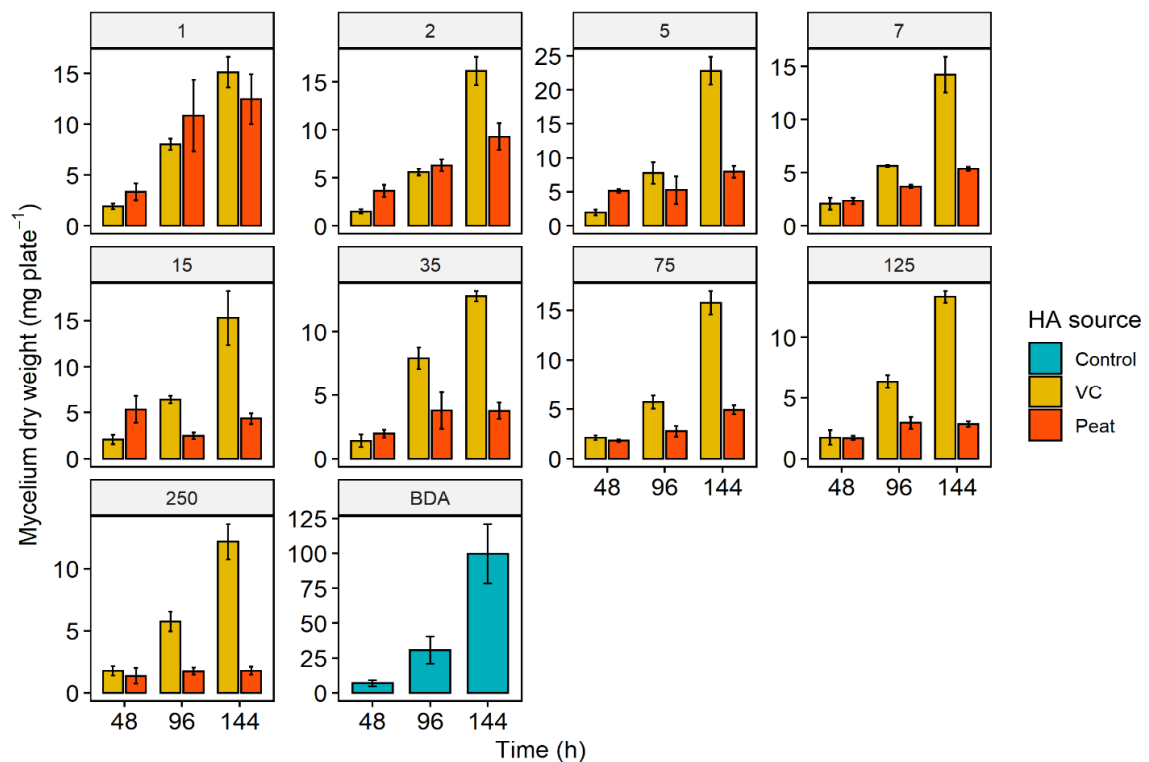


Figura 35. Massa seca de micélio de *G. lucidum* em função do tempo (48, 96, 144, 192 h após a inoculação) dentro de cada nível (1, 2, 5, 7, 15, 35, 75, 125, 250, 500 mg SH L⁻¹) de doses de substâncias húmicas de vermicomposto (VC) ou turfa (peat) + controle de BDA, como fonte de carbono em meio de cultura. Cada valor é expresso como média \pm erro padrão (SE).

As SH extraídas de vermicomposto e turfa não mostraram indução expressiva do estímulo na produção de biomassa tanto fresca quanto seca (Figura 35), quando comparadas com o controle (condições ideais de crescimento). Em contrapartida, quando observado o comportamento entre as diferentes doses de SH de acordo com a sua fonte origem notam-se diferenças nos efeitos em relação à concentração e o tempo. Os efeitos exercidos na produção de biomassa foram evidentes mais cedo em SH de vermicomposto (menos aromáticas e hidrofílicas) enquanto as SH de turfa preservam ou respondem por este efeito tardiamente.

4.5.5 Efeito das SH sobre a densidade micelial

Os resultados para densidade micelial calculados em *Ganoderma lucidum* durante o período de crescimento em meio de cultura apresentou uma tendência de desenvolvimento ao longo do tempo (Figura 36). As diferenças significativas entre as diferentes doses de SH de vermicomposto com relação ao controle foram observadas em todos os momentos após a inoculação com o controle sendo maior do que todas as doses (Figura 36).

Quando tratadas com SH provenientes de turfa observa-se também que em todos os momentos após a inoculação a tendência é do controle apresentar os melhores resultados do que todas as doses e fontes (Figura 36). Embora nas doses 15 e 75 mg SH L⁻¹ às 48 h após a inoculação e a dose 125 SH L⁻¹ às 96 h após a inoculação sejam maiores do que o controle.

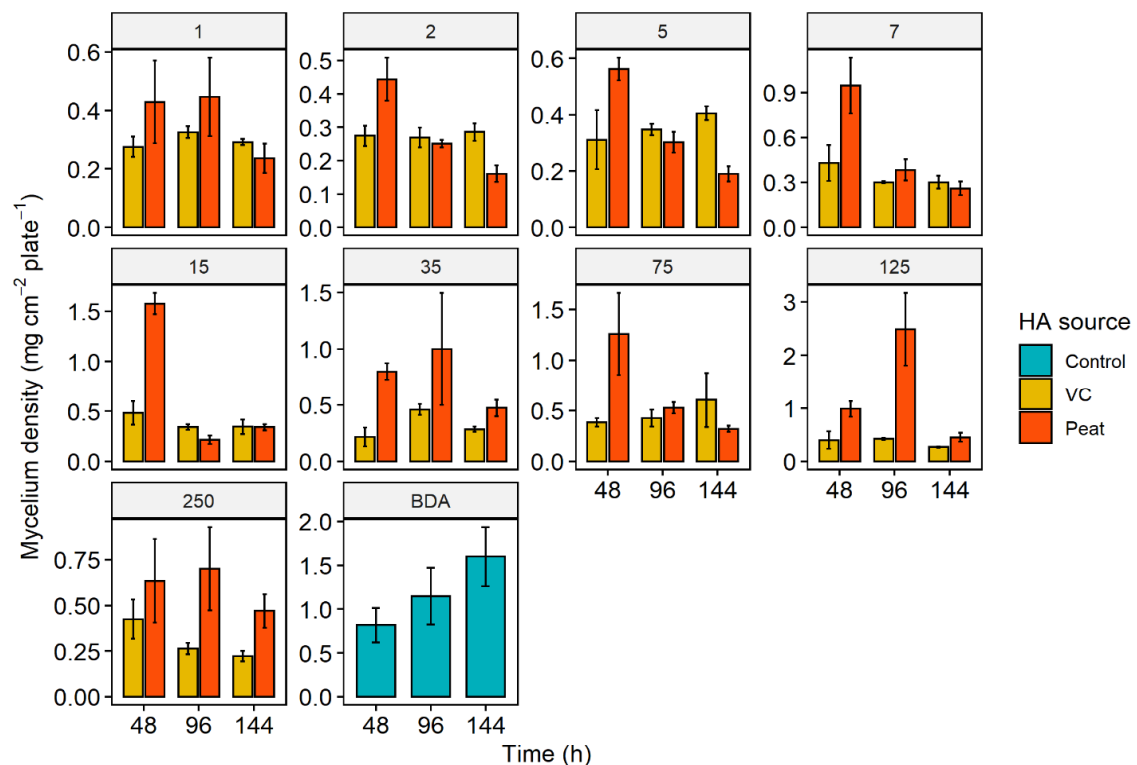


Figura 36. Densidade de micélio de *G. lucidum* em função do tempo (48, 96, 144, 192 h após a inoculação) dentro de cada nível (1, 2, 5, 7, 15, 35, 75, 125, 250, 500 mg SH L⁻¹) de doses de substâncias húmicas de vermicomposto (VC) ou turfa (peat) + controle de BDA, como fonte de carbono em meios de cultura. Cada valor é expresso como média \pm erro padrão (SE).

O comportamento da densidade do micélio, expressado como a unidade de massa micelial por unidade de área, refletiu o efeito das SH de vermicomposto e turfa observado na produção de biomassa. Isto porque a SH de turfa ocasiona mudanças significativas no parâmetro em momentos mais próximos do início do experimento. Com exceção das doses 35 e 125 mg SH L⁻¹ que apresentaram densidades mais expressivas às 96 h após a inoculação (Figura 36).

4.5.6 Efeito das SH sobre a eficiência biológica

Os resultados da eficiência biológica do micélio de *Ganoderma lucidum* apresentou diferenças significativas entre as diferentes doses de SH de vermicomposto com relação ao controle às 96, 144 e 192 h após a inoculação com o controle sendo maior em todas as doses (Figura 37).

Quando tratadas com SH provenientes de turfa as diferenças com o controle foram em sua maioria às 192 h após a inoculação sendo maiores em todas as doses.

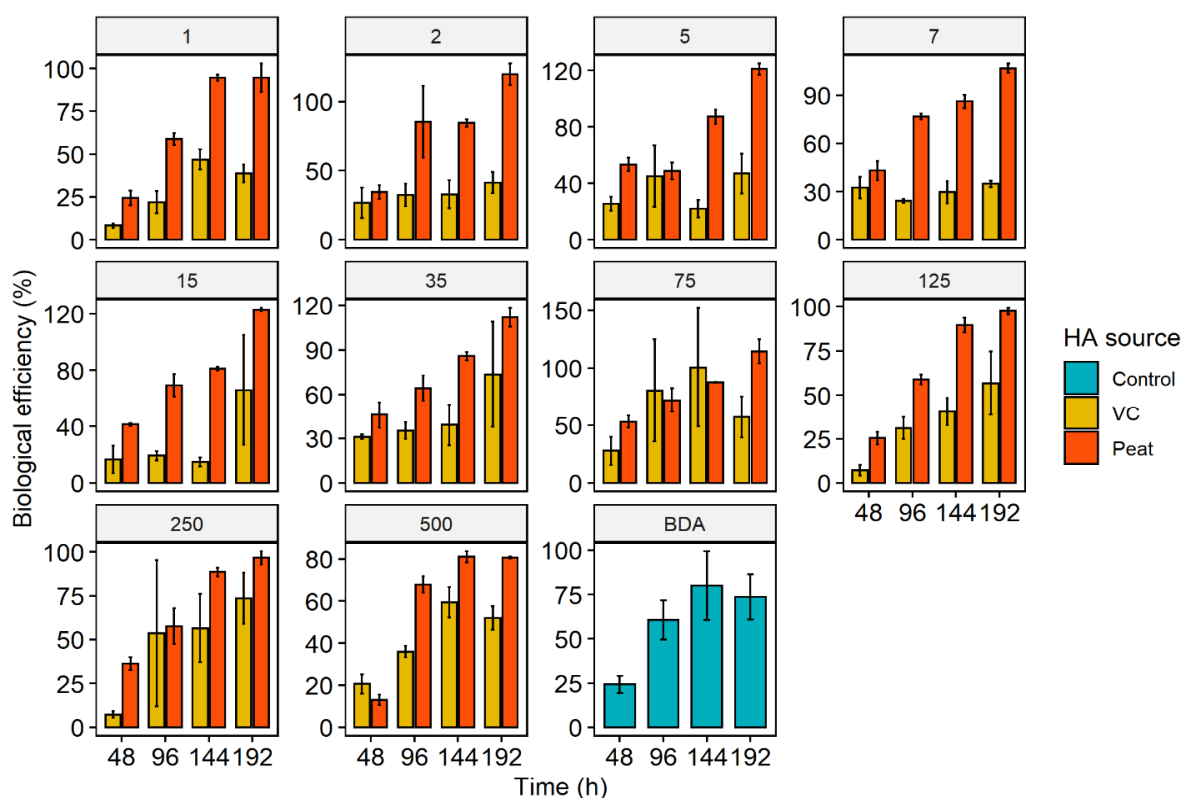


Figura 37. Eficiência biológica do micélio de *Ganoderma lucidum* em função do tempo (48, 96, 144, 192 h após a inoculação) dentro de cada nível (1, 2, 5, 7, 15, 35, 75, 125, 250, 500 mg SH L⁻¹) de doses de substâncias húmicas de vermicomposto (VC) ou turfa (peat) + controle de BDA, como fonte de carbono em meio de cultura. Cada valor é expresso como média \pm erro padrão (SE).

O comportamento da eficiência biológica pela aplicação das SH foi semelhante ao observado e já discutido nos parâmetros anteriores (Figura 37). As SH de turfa induzem o estímulo da eficiência biológica em todos os momentos com grande expressividade às 192 h.

Entretanto é válido destacar que uma comparação mais real dos efeitos observados deve ser realizada quando analisadas apenas as SH, visto que a fonte de carbono BDA não corresponde às condições naturais do crescimento do fungo. Neste sentido, os efeitos de ambas as SH sobre *Ganoderma lucidum* são heterogêneos e perceptíveis para o crescimento da área e do diâmetro do micélio a todas as doses aplicadas, porém menos intensas para a produção de biomassa.

4.5.7 Análise de componentes principais (PCA) para as variáveis mensuradas em *Ganoderma lucidum*

A análise de componentes principais (PCA) em relação às variáveis massa fresca de micélio (FW), massa seca (DW), diâmetro (Diam), área, densidade e eficiência biológica (YP), às 144h após a inoculação, em cada nível (1, 2, 5, 7, 15, 35, 75, 125, 250mg HS L⁻¹) de turfa (Figura 38A), reteve 99,9% da variabilidade total nos primeiros dois componentes: o componente principal (PC1) explica 77,1 %. Esse componente separou o BDA em oposição aos demais tratamentos, correlacionando-se positivamente com massa fresca, massa seca, densidade e eficiência biológica (Figura 38A). Por outro lado, as doses 7, 15, 35, 75, 125, 250 são agrupadas no valor positivo de PC1. No entanto, PC2 explica 22,5% da variabilidade, o

diâmetro e a área, estão fortemente relacionadas à dose 1, 2, 5, e que são projetadas negativamente na PC2 (Figura 38A), sendo as doses que mais se aproximam de BDA.

A PCA referente ao VC reteve 95,9% da variabilidade total nos dois primeiros componentes (Figura 38B). O PC1 explica 59,3% e o PC2 explica 36,6% da variabilidade. O PC1 praticamente não separou as doses do controle BDA, porém é muito próximo da dose 2 e 5 (Figura 38B). Ainda correlacionando-se positivamente com massa fresca, massa seca, densidade, eficiência biológica, diâmetro e área (Figura 38B).

Grinhut et al. (2007) ao analisar os processos e mecanismos da degradação e transformação de substâncias húmicas pelos fungos sapotróficos destacaram que os fungos de podridão branca são demasiadamente ativos na degradação e mineralização da substância supracitada resultando em sua modificação e polimerização favorecendo a manutenção dos ecossistemas.

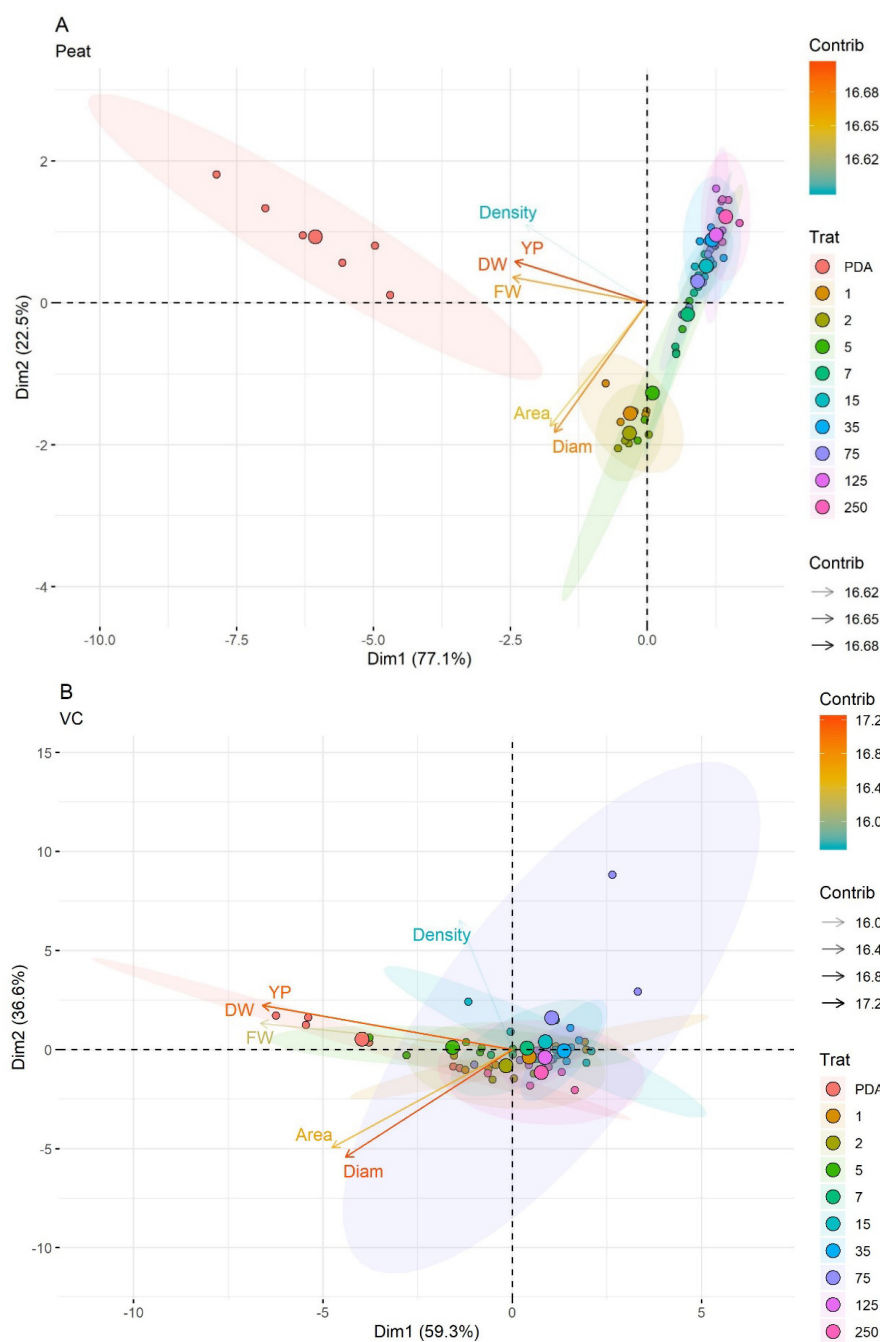


Figura 38. PCA das variáveis massa fresca de micélio (FW), massa seca (DW), diâmetro (Diam), área, eficiência biológica (YP), de *Ganoderma lucidum*, 144h após a inoculação, em cada nível (1, 2, 5, 7, 15, 35, 75, 125, 250 mg SH L⁻¹) de dose de substâncias húmicas de turfa (A) ou vermicomposto (B) + controle de BDA (PDA).

5. CONCLUSÕES

As SHs analisadas apresentam características estruturais diferentes resultando em diferentes propriedades e funcionalidades.

Percebe-se no que vermicomposto apresenta semelhanças de grupamentos funcionais em alguns picos analisados com a turfa sendo que essa possui uma abundância em estruturas alifáticas. As diferenças na composição dos grupamentos funcionais são corroboradas pela análise quimiométrica de PCA.

A quantificação das estruturas e das propriedades encontradas nas SH em questão demonstrou a relação dos grupamentos funcionais com a porcentagem de aromaticidade e alifaticidade comprovando que as propriedades analisadas sofrem influência direta da composição estrutural.

Considerando as informações obtidas de acordo com os estudos realizados pode-se afirmar que o uso de SHs como substituto de fontes de carbono em meios de cultura alternativo influencia o crescimento e desenvolvimento de fungos agaricomycetes benéficamente.

As análises referentes em *Pleurotus eryngii*, *Panus strigellus* (Berk.) e *Ganoderma lucidum* demonstraram que o crescimento e o desenvolvimento sofreram influências das características estruturais das diferentes fontes de SH. Pode-se ainda observar que a corrida micelial sobre efeitos destas fontes como substituta do carbono em algumas doses são superiores ao controle. Entretanto, cada fungo respondeu aos estímulos causados pelas diferentes fontes de SH de formas distintas.

Pleurotus eryngii apresentou resultados mais significativos em todos os parâmetros analisados quando a fonte de carbono era proveniente da SH de vermicomposto.

Já as análises de *Panus strigellus* (Berk.) demonstraram que a área e a massa fresca apresentaram resultados mais significativos para a fonte de SH de vermicomposto. Em contrapartida, os parâmetros massa seca, densidade e eficiência biológica apresentaram resultados mais significativos quando a fonte de SH era a turfa.

Resultados similares foram observados nas análises de *Ganoderma lucidum* onde os parâmetros área, massa fresca e massa seca obtiveram resultados mais satisfatórios com SH proveniente de vermicomposto enquanto a densidade e a eficiência biológica apresentaram resultados mais significativos quando a fonte de carbono era proveniente da turfa.

O conhecimento das vias bioquímicas da decomposição da MOS realizada pelos fungos permite a utilização de substratos alternativos provenientes de resíduos agroindustriais e pecuários propiciando modelos e projetos de produção sustentável.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTI, J.; DALEO, P.; IRIBARNE, O. ¿Blanco, negro o escala de grises? Determinación de la contribución relativa del nicho ecológico y la teoría neutral en los ensambles de especies. **Ecología Austral**, v. 28, p. 104-112, 2018.

ALEXSANDER, I. J. A Knight of symbiosis. **New Phytologist**, v. 176, p. 499-501, 2007.

ARANA-GABRIEL, Y.; BURROLA-AGUILAR, C.; GARIBAY-ORIJEL, R.; FRANCO-MAASS, S. Obtención de cepas y producción de inóculo de cinco especies de hongos silvestres comestibles de alta montaña en el centro de México. **Rev Chapingo Ser Ciencias For y del Ambient**. 2014;20.

AREND, K. **Substâncias húmicas e formas de cobre em solos de áreas de videira**. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) - Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2010.

ASGHER, M.; BHATTI, H. N.; ASHRAF, M.; LEGGE, R. L. Recent developments in biodegradation of industrial pollutants by white rot fungi and their enzyme system. **Biodegradation**, v. 19, p. 771-783, 2008.

ASSI, L.; STANGARLIN, J. R.; ZANELLA, A. L.; CARRÉ, V.; BECKER, A.; SHIKIDA, S. A. R. L.; FRANZENER, R. Desenvolvimento de substratos alternativos para o cultivo de cogumelos comestíveis e medicinais. **Scientia Agraria Paranaensis**, 6:1-2, 2007.

ATAGANA, H. I.; HAYNES, R. J.; WALLIS, F. M. Fungal Bioremediation of creosote contaminated soil: a laboratory scale bioremediation study using indigenous soil fungi. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 172, p. 201-219, 2006.

ATIYEH, R. M.; LEE, S.; EDWARDS, C. A.; ARANCON, N. Q.; METZGER, J. D. The influence of humic acids derived from earthworm-processed organic wastes on plant growth. **Biorsource Technology**, 84: 7-14, 2002.

AZEVEDO, J. M. A. **Variabilidade genética entre acessos de Amendoim Forrageiro quanto à associação micorrízica e resposta ao fósforo**. 156 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia), Curso de Pós Graduação em Agronomia, Universidade Federal do Acre, Rio Branco, 2010.

BALDRIAN, P.; SNAJDR, J. Production of ligninolytic enzymes by litter-decomposing fungi and their ability to decolorize synthetic dyes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 1023-1029, 2006.

BALOTA, E. L.; MACHINESKI, O.; STENZEL, N. M. C. Resposta da acerola à inoculação de fungos micorrízicos arbusculares em solo com diferentes níveis de fósforo. **Bragantia**, v. 70, n. 1, p. 166-175, 2011.

BARRIQUELO, M. F. **Influência de íons metálicos na estrutura de substâncias húmicas detectadas por eletroscopia**. Tese (Doutorado em Ciências) - Centro de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2005.

BERTOLAZZI, A. A.; CANTON, G. C.; AZEVEDO, I. G.; CRUZ, Z. M. A.; SOARES, D. N. E. S.; CONCEIÇÃO, J. M.; SANTOS, W. O.; RAMOS, A. C. O papel das ectomicorizas na biorremediação dos metais pesados no solo. **Natureza On Line**, v. 8, n. 1, p. 24-31, 2010.

BERUDE, M. C.; ALMEIDA, D. S.; RIVA, M. M.; CABANÊZ, P. A.; AMARAL, A. A. Micorizas e sua importância agroecológica. **Enciclopédia Biosfera**, v. 11, n. 22, p. 132-146, 2015.

BITTENCOURT, M. V. L. Impactos da agricultura no meio ambiente: principais tendências e desafios. **Economia & Tecnologia**, v. 20, p. 157-168, 2010.

BROINTEIN, J. L. **Mutualism**. Oxford University Press, 2015.

BONFANTE, P.; GENRE, A. Mechanisms underlying beneficial plant–fungus interactions in mycorrhizal symbiosis. **Nature Communications**, v. 1, p. 48, 2010.

BOTERO, W. G. **Substâncias húmicas: interações com nutrientes e contaminantes**. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2010.

CANTON, G. C. **Efeito do manganês sobre a ecofisiologia e bioquímica de ectomicorizas**. 61 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia de Ecossistemas), Programa de Pós Graduação em Ecologia de Ecossistemas, Universidade de Vila Velha, Vila Velha, 2012.

CARDOSO, E. J. B. N.; NOGUEIRA, M. A. Fungos micorrízicos mantêm sustentabilidade do SPD. **Visão agrícola**, n. 9, p. 67-69, 2009.

CARNEIRO, R. F V.; CARDOSO JÚNIOR, F. M.; PEREIRA, L. F.; ARAÚJO, A. S F.; SILVA, G. A. Fungos micorrízicos arbusculares como indicadores da recuperação de áreas degradadas no Nordeste do Brasil. **Revista Ciência Agronômica**, v. 43, n. 4, p. 648-657, 2012.

CONTESSA, C. R.; SOUZA N. B.; ALMEIDA, L.; MANERA, A. P.; MORAES, C. C. Extração e purificação de antimicrobiano do cogumelo *Pleurotus Sajor-caju*. **Revista CSBEA**, 2 (1): 1-7, 2016.

COSTA, M. D.; PEREIRA, O. L.; KASUYA, M. C. M.; BORGES, A. C. Ectomicorizas: a face oculta da floresta. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, n. 29, p. 38-46, 2003.

COSTA, R. S. C. **Micorizas arbusculares em sistemas agroflorestais em duas comunidades rurais do Amazonas**. 155 p. Tese (Doutorado em Biotecnologia), Programa Multi- Institucional de Pós Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2010.

COURTY, P. E.; BUÉE, M.; DIEDHIOU, A. G.; FREY-KLETT, P.; LE TACON, F.; RINEAU, F.; GARBAYE, J. The role of ectomycorrhizal communities in forest ecosystem processes: new perspectives and emerging concepts. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 42, n. 5, p. 679-698, 2010.

DAG, A.; YERMIYAHU, U.; BEN-GAL, A.; ZIPORI, I., KAPULNIK, Y. Nursery and post-transplant field response of olive trees to arbuscular mycorrhizal fungi in an arid region. **Crop and Pasture Science**, v. 60, n 5, p. 427-433, 2009.

DANTAS, J. S.; SOUZA, A. P.; FARIAS, M. F.; NOGUEIRA, V. F. B. Interações entre grupos de microorganismos com a rizosfera. **Pesquisa Aplicada & Agrotecnologia**, v. 2, n. 2, p. 213-218, 2009.

DEHORTER, B.; KONTCHOU, C. Y.; BLONDEAU, R. C-¹³NMR Spectroscopic analysis of soil humic acids recovered after incubation with some white rot fungi and actinomycetes. **Soil Biology and Biochemistry** 24: 667-673, 1992.

DUAN, T.; FACCELIC, E.; SMITHC, S. E.; SMITHC, F. A.; NANA, Z. Differential effects of soil disturbance and plant residue retention of arbuscular mycorrhizal (AM) symbioses are not reflected in colonization of roots or hyphal development in soil. **Soil Biology and Biochemistry**. v. 43, n. 3, p. 571-578, 2011.

FARIA, A. B. C.; MONTEIRO, P. H. R.; AUER, C. G.; ÂNGELO, A. C. Uso de ectomicorizas na biorremediação florestal. **Ciência Florestal**, v. 27, n. 1, p. 21-29, 2017.

FILHO, A. V.; SILVA, M. I. V. **Importância das substâncias húmicas para a agricultura**. Disponível em: <<http://audienciapublica.ana.gov.br>> Acesso: 06.jun.2018.

FONTANA, A. **Fracionamento da matéria orgânica e caracterização dos ácidos húmicos e sua utilização no sistema brasileiro de classificação de solos**. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) - Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2009.

FRANCK, J. **Macrofungos saprofíticos comestíveis da mata atlântica catarinense e aspectos relacionados à produção comercial de cogumelo**. TCC (Licenciatura em Ciências Biológicas) - Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2019.

FRANCO, A. A.; CAMPELLO, E. F. C.; SILVA, E. M. R.; FARIA, S. M. **Revegetação de solos degradados**. Seropédica: Embrapa-CNPS, p. 8, 1992.

FURLANI, R. P. Z. **Valor nutricional de cogumelos comestíveis cultivados no Brasil**. Tese (Doutorado em Ciência dos alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

FURLANI, R.P.Z.; GODOY, H.T. Valor nutricional de cogumelos comestíveis: uma revisão. **Rev. Inst Adolfo Lutz**, 6 (2): 149-154, 2005.

GARCÍA, A. C.; VAN TOL de CASTRO, T. A.; SANTOS, L. A.; TAVARES, O. C. H.; CASTRO, R. N.; BERBARA, R. L. L.; GARCÍA-MINA, J. M. Structure-Property-Function

Relationship of Humic Substances in Modulating the Root Growth of Plants: A Review. **Journal of Environmental Quality**, 48(6), 1622-1632. 2019.

GIRI, B.; KAPOOR, R.; MUKERJI, K. G. Influence of arbuscular mycorrhizal fungi and salinity on growth, biomass, and mineral nutrition of *Acacia auriculiformis*. **Biology and Fertility of Soils**, v. 38, n. 3, p. 170-175, 2003.

GURGEL, F. E. **Fungos ectomicorrízicos em áreas de mata atlântica do nordeste do Brasil**. 66 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas), Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2009.

HALLING, R. E. Ectomycorrhizae: co-evolution, significance, and biogeography. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, p. 5-13, 2001.

HAWKSWORTH, D. L. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance and conservation. **Mycological Research**, n. 95, p. 641-655, 1991.

HAWKSWORTH, D. L. Fungal diversity and its implications for genetic resource collections. **Studies in Mycology**, v. 50, p. 9-18, 2004.

HEIJDEN, M. G., MARTIN, F. M., SELOSSE, M. A., SANDERS, I. R. Mycorrhizal ecology and evolution: the past, the present, and the future. *New Phytologist*, v. 205; n. 4; p. 1406-1423, 2015.

HOFF, J. A.; KLOPFENSTEINS, N. B.; TONN, J. R.; MCDONALD, G. I.; ZAMBINO, P. J.; ROGERS, J. D.; PEEVER, T. L.; CARRIS, L. M. **Roles of wood root-associated fungi in forest ecosystem process: recente advances in fungal identification**. Res. Pap. RMRS-RP-47. Fort Collins, CO: US Department of Agriculture, Forest Service, Rocky Mountain Research Station, 6 pp, 2004.

HOTHORN, T.; BRETZ, F.; WESTFALL, P. Simultaneous inference in general parametric models. **Biometrical Journal: Journal of Mathematical Methods in Biosciences**, 50(3), 346-363. 2008.

HOTHORN, T.; BRETZ, F.; WESTFALL, P.; HEIBERGER, R. M.; SCHUETZENMEISTER, A.; SCHEIBE, S.; HOTHORN, M. T. **Package ‘multcomp’**. Simultaneous inference in general parametric models. Project for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2016.

IDOWU, O. O.; AKINYEMI, S. O. S. No waste in *Musa* species: the use of banana and plantain leaves in the production of edible mushrooms. In: II All Africa Horticulture Congress 1007 (**Annals**) (pp. 589-595). 2012.

ISHIKAWA, N. K.; VARGAS ISLA, R.; GOMES, D.; MENOLLI JR, N. Principais cogumelos comestíveis cultivados e nativos do estado de São Paulo. **Pesquisa & Tecnologia** 14(2), 2017.

JOHNSON, N. C. Mutualisms and ecosystem-level processes. In: BRONSTEIN, J. L. (ed) **Mutualisms**, p. 221-240, Oxford University Press, 2015.

JÚNIOR, E. E.; ROCHA, J. C.; ROSA, A. H.; ZARA, L. F.; SANTOS, A. Substâncias húmicas aquáticas: fracionamento molecular e caracterização de rearranjos internos após complexação com íons metálicos. **Química Nova**, 24 (3): 399-344, 2001.

KARLEN, D. L.; MAUSBACH, M. J.; DORAN, J. W.; CLINE, R. G.; HARRIS, R. F.; SCHUMAN, G. E. Soil quality: a concept, definition and framework for evolution. **Soil Science Society of America Journal**, v. 61, n. 1, p. 4-10, 1997.

KLEIN, O. I.; ISAKOVA, E. P.; DERYABINA, Y. I.; KULINOVA, N. A.; BADUN, G. A.; CHERNYSHEVA, M. G.; STEPANOVA, E. V.; KOROLEVA, O. V. Humic substances enhance growth and respiration in the basidiomycetes *Trametes maxima* under carbon limited conditions. **J Chem Ecol**, 2014.

KLEIN, O. I.; KULINOVA, N. A.; KONSTANTINOV, A. I.; FEDEROVA, T. V.; LANDESMAN, E. O.; KOROLEVA, O. V.; Transformation of humic substances of highly oxidized brown coal by basidiomycetes *Trametes hirsuta* and *Trametes maxima*. **Applied and Biochemistry and Microbiology**, 49 (3): 287-295, 2013.

KÖHLER, J.; YANG, N.; PENA, R.; RAGHAVAN, V.; POLLE, A.; MEIER, I. C. Ectomycorrhizal fungal diversity increases phosphorus uptake efficiency of European beech. **New Phytologist**, v. 220, p. 1200-1210, 2018.

KULIKOVA, N. A.; PERMINOVA, I. V.; BADUN, G. A.; CHERNYSHEVA, M. G.; KOROLEVA, O. V.; TSVETKOVA, E. A. Estimation of Uptake of Humic Substances from Different Sources by Escherichia Coli Cells J Chem Ecol Under Optimum and Salt Stress Conditions by use of Tritium Labeled Humic Materials. **Appl Environ Microbiol**, 76:6223-623, 2010.

KUMARI, M.; PRASAD, H.; KUMARI, S. Association of am (arbuscular mycorrhizal) fungi in fruit crops production : A review. **The Pharma Innovation Journal**, v. 6, n. 6, p. 204-208, 2017.

LÉON, M. L. V. **Ectomicorrizas tropicais**: estudos de caso na mata atlântica. 78 p. Dissertação (Mestrado em Biologia de Fungos, Algas e Plantas), Curso de Pós Graduação em Biologia de Fungos, Algas e Plantas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2017.

LIPRELI, A. **Melhoramento genético de *Lentinula edodes* e *Pleurotus sajor-caju* para aumento da atividade extracelular de genol-oxidases e produtividade de basidiomas**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Centro de Ciências Agrárias e Biológicas, Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, 2012.

LÓPEZ, R. H.; BALMORI, D. M.; GARCÍA, A. C.; GONZÁLEZ, L. O. H.; GURIDI, I. Propriedades químicas y química-físicas de derivados estructurales de ácidos húmicos obtenidos de vermicomposto. Actividad biológica. **Rev Ciências Técnicas Agropecuárias**, 22 (2): 55-60, 2013.

MARSCHNER, H.; DELL, B. Nutrient uptake in mycorrhizal symbiosis. **Plant and Soil**, v. 159, p. 89-102, 1994.

MARTIN NETO, L.; BAYER, C.; MIELNICZUK, J.; COLNAGO, L. A.; SAAB, S. C.; CONCEIÇÃO, M. **Ressonância magnética nuclear e eletrônica aplicadas a estudos da material orgânica em amostras de solos intactos e fracionados fisicamente**. Disponível em: < https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/recursos/BP07_98ID-ceRa14R4RQ.pdf>. Acesso: 9.set.2018.

MARTÍNEZ, D. A.; BUGLIONE, M. B.; FILIPPI, M. V.; REYNOSO, L. D. C.; RODRÍGUEZ, G. E.; AGÜERO, M. S. Mycelial growth evaluation of *Pleurotus ostreatus* and *Agrocybe aegerita* on pear pomaces. In: **Anales de Biología** (Vol. 37, pp. 1-10). Facultad de Biología, Universidad de Murcia. 2015.

MEDDAD-HAMZA, A.; BEDDIAR, A.; GOLLOTE, A.; LEMOINE, M. C.; KUSZALA, C.; GIANINAZZI. Arbuscular mycorrhizal fungi improve the growth of olive trees and their resistance to transplantation stress. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 8, p. 1159-1167, 2010.

MELLO, A. H.; ANTONIOLLI, Z. I.; KAMINSKI, J.; SOUZA, E. L.; OLIVEIRA, V. L. Fungos arbusculares e ectomicorrízicos em áreas de eucalipto e de campo nativo em solo arenoso. **Ciência Florestal**. v. 16, n. 3, p. 293-301, 2006.

MERGULHÃO, A. C. E. S.; SIVA, M. V. da; LYRA, M. C. C. P.; FIGUEIREDO, M. V. B.; SILVA, M. L. R. B.; MAIA, L. C. Caracterização morfológica e molecular de fungos micorrízicos arbusculares isolados de áreas de mineração de gesso, Araripina, PE, Brasil. **Hoehnea**. v. 41, n. 3, p. 393-400, 2014.

MIQUELANTE, F. A. **Prospecção de fungos filamentosos halotolerantes para uso na descoloração de corantes têxteis**. 88 p. Dissertação (Mestrado em Ciências), Programa de Pós Graduação em Ciências, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

MOHAMMADI, K.; KHALESRO, S.; SOHRABI, Y.; HEIDARI, G. A review: Beneficial effects of the mycorrhizal fungi for plant growth. **Journal of Applied Environmental and Biological Sciences**. v. 1, p. 310-319, 2014.

MORAES, V. R. **Prospecção química e avaliação do potencial biológico do fungo endofítico *Aspergillus unguis* obtido da alga *Palmaria decipiens* proveniente da Antártida**. 93 p. Dissertação (Mestrado em Ciências), Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

MOREIRA NETO, S. L. **Enzimas lignolíticas produzidas por *Psilicybe castanella* CCB444 em solo contaminado com hexaclorobenzeno**. 124 p. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente), Programa de Pós Graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente, Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, São Paulo, 2006.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: UFLA, p. 625, 2002.

NARDI, S., PIZZEGHELLO, D.; MUSCOLO, A.; VIANELLO, A. Physiological effects of humic substances on higher plants. **Soil Biology & Biochemistry**, 34: 1527-1536, 2002.

NEGRI, K. M. S. **Estudo comparativo de diferentes cogumelos comestíveis comercializados no Brasil:** ação contra radicais livres, espécies reativas e atividade microbiana. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, 2012.

NGUYEN, T. M.; RANAMUKHAARACHCHI, S. L. Study on the mycelium growth and primordial formation of king oyster mushroom (*Pleurotus eryngii*) on cardboard and spent coffee ground. **Research on Crops**, 20(4), 835-842. 2019.

NOVOTNY, E. H.; TRAGHETA, D. G.; MANGRICH, A. S. Espectroscopia de RPE e RMN em ácidos húmicos extraídos de solos submetidos a diferentes sistemas de manejo. In: Encontro Brasileiro de Substâncias Húmicas, **Anais...** Santa Maria: UFSM, 1999.

OULEDALI, S.; ENNAJEH, M.; ZRIG, A.; GIANINAZZI, S.; KHEMIRA, H. Estimating the contribution of arbuscular mycorrhizal fungi to drought tolerance of potted olive trees (*Olea europaea*). **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 40, n. 5, p. 80-93, 2018.

OLIVEIRA, D. F. B. **Micorrização aumenta a tolerância de mudas de *Jatropha curca* L. à salinidade.** 59 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia), Programa de Pós Graduação em Agronomia, Universidade Federal de Alagoas, Rio Largo, 2016.

OLIVEIRA, E. A. B. **Avaliação de método alternativo para extração e fracionamento de substâncias húmicas em fertilizantes orgânicos.** Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical). Instituto Agrônomo de Campinas. Campinas, 2011.

OROS-ORTEGA, I.; ANDRADE-TORRES, A.; LARA-PÉREZ, L. A.; GUZMÁN-OLMOS, R. F.; CASANOVA-LUGO, F.; SÁENZ-CARBONELL, L. A.; CÓDOVA-LARA, I. Ectomycorrhizal ecology, biotechnology and taxonomy for the conservation and use of *Abies religiosa* in temperate areas of Mexico. **Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente**, v. 23, n. 3, 2017.

ORSINI, J. V. C.; BRITO, L. M.; NOVAES, M. R. C. G. Cogumelos comestíveis: uso, conservação, características nutricionais e farmacológicas. **Rev. HCPA**, 34 (4): 452-460, 2012.

PARDO-GIMÉNEZ, A.; PARDO, J. E.; DIAS, E. S.; RINKER, D. L.; CAITANO, C. E. C., & ZIED, D. C. (2020). Optimization of cultivation techniques improves the agronomic behavior of *Agaricus subrufescens*. **Scientific Reports**, 10(1), 1-9.

PEDROSO, A. L. **Produção de *Pleurotus* spp. em resíduo da indústria do cigarro e avaliação do substrato exaurido.** Dissertação (Mestrado em Ciências do Solo) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2003.

PELLMYR, O. Evolution of insect pollination and angiosperm diversification. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 7, p.46-49, 1992.

PERGHER, E. S. **Caracterização do processo produtivo de cogumelos comestíveis e medicinais.** TCC (Bacharel em Engenharia Agrônoma) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2016.

PINHEIRO, G. L.; SILVA, C. A.; NETO, E. F. Crescimento e nutrição de clone de eucalipto em resposta à aplicação de concentração de C- ácido húmico. **Rev. Brasileira de Ciência do Solo**, 34:1217-1229, 2010.

PIROLI, V. L. B. **Efeito de uma micorriza comercial na biodisponibilidade de nutrientes no solo e crescimento de plantas jovens de oliveira**. 82 p. Dissertação (Mestrado em Agroecologia), Programa de Pós Graduação em Agroecologia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Bragança, 2019.

PIROSYNSKI, K. A.; MALOCH, D. W. The origin of land plants: A matter of mycotrophism. **Biosystems**, v. 6, p. 153-164, 1975.

PRIMO, D. C.; MENEZES, R. S. C.; SILVA, T. O. Substâncias húmicas da matéria orgânica do solo: uma revisão de técnicas analíticas e estudos do nordeste brasileiro. **Scientia Plena**, 7(5), 1-13.

QI, B. C.; ALDRICH, C.; LORENZEN L.; WOLFAARDT, G. M. Degradation of humic acids in a microbial film consortium from landfill compost. **Industrial and Engineering Chemistry Research** 43: 6309-6316, 2004.

R CORE TEAM **R**: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2019.

RAMOS, A. C.; FAÇANHA, A. R.; PALMA, L. M.; OKOROKOV, L. A.; CRUZ, Z. M. A.; SILVA, A. G.; SIQUEIRA, A. F.; BERTOLAZI, A. A.; CANTON, G. C.; MELO, J.; SANTOS, O. O.; SCHIMITBERGER, V. M. B.; OKOROKOVA-FAÇANHA, A. L. An outlook on ion signaling and ionome of mycorrhizal symbiosis. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 23, n. 1, p. 79-89, 2011.

RAMOS, T. C. D. A. **Identificação e caracterização genética para prospecção do potencial biotecnológico de fungos filamentosos isolados de solos do quadrilátero ferrífero - MG**. 94 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias), Programa de Pós Graduação em Ciências Agrárias, Universidade Federal de São João Del Rei, Sete Lagoas, 2016.

REDECKER, D.; MORTON, J. B.; BRUNS, T. D. Ancestral lineages of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomales). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 14, p. 276-284, 2000b.

REIS, M. A. C. **Perfil cromatográfico, atividade biológica e elaboração de produto biotecnológico a partir de shimeji branco**. 29 p. TCC (Bacharelado em Biotecnologia) – Instituto de Saúde e Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas, Coari, 2019.

ROCHA, J. C.; ROSA, A. H. **Substâncias húmicas aquáticas: interação com espécies metálicas**. São Paulo. Ed. UNESP, p.34, 2003.

ROMAN, M.; CLAVERIA, V.; MIGUEL, A. M. A revision of the descriptions of ectomycorrhizas published since 1961. **Mycological Research**, v. 109, p. 1063-1104, 2005.

SAGAN, L. On the origin of mitosing cells. **Journal of Theoretical Biology**. v. 14, p. 225-274, 1967.

SALES, N. L. P. **Modelo para estudo da diversidade genética em populações naturais de *Pisolithus***. 95 f. Tese (Doutorado em Agronomia), Programa de Pós Graduação em Agronomia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2001.

SÁNCHEZ, C. **Bioactives from mushroom and their application**. Food Bioactives, p. 23-57. 2017.

SANTOS, J. R. P. **Potencial de biodegradação de resíduos por *Pleurotus* spp.** Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura Luiz Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014.

SANTOS, T. L. **Estudo teórico da interação de modelos análogos dos ácidos húmicos com íons metálicos Fe e Al**. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Ambiental) – Escola de Engenharia Industrial e Metalúrgica de Volta Redonda, Universidade Federal Fluminense, Volta Redonda, 2016.

SARTORI, S. B. **Atividade enzimática e valores nutricionais de *Pleurotus* spp. cultivados em vinhaça**. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura Luiz Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

SCHUßLER, A.; SCHWARZOTT, D.; WALKER, C. A. new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. **Mycological Research**, v. 105, n. 12, 1413-1421, 2001.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; PASCHOLATI, S. F.; KRUGNER, T. L. Utilização de fontes de carbono e caracterização esterásica de fungos ectomicorrízicos. **Acta Scientiarum: Agronomy**, v. 25, n. 1, p. 237-241, 2003.

SERRA, L. S.; MENDES, M. R. F.; SOARES, M. V. A.; MONTEIRO, I. P. Revolução Verde: reflexões acerca da questão dos agrotóxicos. **Revista do CEDS** (Revista Científica do Centro de Estudos em Desenvolvimento Sustentável da UNDB). v. 1. n.4, p. 24, 2016.

SILVA, A. C. Espectrometria de ressonância magnética nuclear em amostras de ácidos húmicos. **Cad. Pesq**, 1(12): 38-44, 2001.

SILVA, A. C. S. **Aspectos nutricionais e ocorrência de fungos micorrízicos em pau-rosa (*Aniba duckei kosterm*) e mogno (*Swietenia macrophylla king*) em propriedades rurais da comunidade do brasileiro, Manaus**. 30 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais e Florestais), Programa de Pós Graduação em Ciências Ambientais e Florestais, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2006.

SILVA, C. J. A.; MALTA, D. J. N. A importância dos fungos na Biotecnologia. **Cadernos de Graduação** (Ciências Biológicas e da Saúde), 2 (3): 49-66, 2016.

SILVA, R. R.; COELHO, G. D. **Fungos: principais grupos e aplicações biotecnológicas**. Disponível em: < <http://www.biodiversidade.pgibt.ibot.sp.gov.br>>. Acesso em: 15. Mai. 2018.

SILVERSTEIN, R. **Spectrometric identification of organic compounds**. New York: John Wiley & Sons, 1994.

SIMARD, S. W.; DURALL, D. M. Mycorrhizal networks: a review of their extent, function, and importance. **Canadian Journal of Botany**, v. 82, n. 8, 2004.

SIMÕES, M. G. **Desenvolvimento e crescimento da espécie de cogumelo *Pleurotus ostreatus* em garrafas de plástico reutilizado**. Dissertação (Mestrado em Tecnologia e Segurança Alimentar) – Universidade dos Açores, Angra do Heroísmo, 2015.

SMITH, S. E.; READ, D. J.; **Mycorrhizal Symbiosis**. 3 ed.; Academic Press, p. 800, 2008.

SMITH, S. E.; READ, D. J.; HARLEY, J. L. **Mycorrhizal symbiosis**. 2. ed. Academic Press, p. 605, 1997.

SIMPSON, A. J.; MACNALLY, D. J.; SIMPSON M.J. NMR spectroscopy in environmental research: From molecular interactions to global processes. **Progress in nuclear magnetic resonance spectroscopy**, 58: 97-175, 2011.

SIMPSON, M. J.; CHEFETZ, B.; HATCHER, P. G. Phenanthrene sorption to structurally modified humic acids. **Journal of Environmental Quality**, 32: 1750-1758, 2003.

SIMPSON, M. J.; SIMPSON, A. J. NMR of soil organic matter. In: **Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry** (3rd ed.). Elsevier Ltd. 2016.

ŠNAJDR, J.; STEFFEN, K. T.; HOFRICHTER, M.; BALDRIAN, P. Transformation of C-labelled lignin and humic substances in forest soil by the saprobic basidiomycetes *Gymnopus erythropus* and *Hypholoma fasciculare*. **Soil Biology e Biochemistry**, 42: 1541-1548, 2010.

SOARES, I. A.; FLORES, A. C.; MENDONÇA, M. M.; BARCELOS, R. P.; BARONI, S. Fungos na biorremediação de áreas degradadas. **Arq Inst Biol**, v. 78. n. 2, p. 341-350, 2011.

SOUZA, C. B. C. **Solos e sociedade: popularização do conhecimento para o manejo adequado do solo**. 59 p. Trabalho de conclusão de curso (Tecnólogo em Agroecologia) Graduação de Tecnologia em Agroecologia, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, 2019.

SOUZA, V. C.; SILVA, R. A.; CARDOSO, G. D.; BARRETO, A. F. Estudos sobre fungos micorrízicos. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 10, n. 3, p.612-618, 2006.

STEFFEN, K. T.; HATAKA, A.; HONFRICHTER, M. Degradation of humic acids by the litter-decomposing basidiomycete *Collybia dryophila*. **Applied and Environmental Microbiology**; 68 (7): 3442-3448, 2002.

TABLAS, R. R. A. **Implementación de micorrizas y *Azospirillum brasiliense* em agricultura sustentable del estado de Morelos**. 183 p. Tesis (Maestro en Ingeniería Ambiental y Tecnologías Sustentables), Programa Educativo de Maestría en Ingeniería Ambiental y Tecnologías Sustentables, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, México, 2018.

TAYLOR, R. J. Plants, fungi and bettongs: a fire dependente co-evolutionary relationship. **Australian Journal Ecology**. v. 16, n. 3 p. 409-411, 1991.

TRIERVEILER-PEREIRA, L.; SULZBACHER, M. A.; BALTAZAR, J. M. **Diversidade de fungos brasileiros e alimentação: o que podemos consumir?**. Disponível em: <<https://www.researchgate.net/publication/325736818>>. Acesso em: 13. Jul. 2018.

TRINDADE, A. V.; PEREIRA, J. M.; MUCHOVEJ, R. M. C.; NEVES, J. C. L. Efeito de fungos ectomicorrizicos na resposta de mudas de *Eucalyptus grandis* a enxofre no solo. **Revista Árvore**, v. 25, n. 2, p. 175-181, 2001.

VASCONCELOS, M. R. S. **Prospecção de fungos derivados de esponjas marinhas na degradação/descoloração de poluentes ambientais**. 102 p. Tese (Doutorado em Ciências), Programa de Pós Graduação em Microbiologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

VAZ, D. O. **Estudo das interações de íons metálicos divalentes com ácidos fúlvicos extraídos das águas do Rio Suwanee**. Tese (Doutorado em Química). Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2006.

VENDRUSCOLO, D. **Seleção de plantas para fitorremediação de solo contaminado com cobre**. 58 p. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo), Programa de Pós Graduação em Ciência do Solo, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2013.

VERGARA, C.; ARAUJO, K. E. C.; SOUZA, S. R.; SCHULTZ, N.; SAGGIN JÚNIOR, O. J.; SPERANDIO, M. V. L.; ZILLI, J. E. Plant-mycorrhizal fungi interaction and response to inoculation with different growth-promoting fungi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 54, 2019.

VEZZANI, F. M. **Qualidade do sistema solo na produção agrícola**. 196 p. Tese (doutorado em Ciência do Solo), Programa de pós-graduação em Ciência do Solo, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2001.

WANG, B.; QIU, Y. L. Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. **Mycorrhiza**. v. 16, p. 299-363, 2006.

WICKHAM, H. **ggplot2: elegant graphics for data analysis**. Springer-Verlag, New York. 2016.

WIN, T. T.; OHGA, S. Study on the cultivation of *Agaricus blazei* (almond mushroom) grown on compost mixed with selected agro-residues. **Advances in Microbiology**, 8(10), 778-789. 2018.

YEL, E.; AHMETLI, G. Enviromental dilemma of humic substances: being absorbents and being carcinogens. **International Journal of Evironmental Science and Developments**, v. 1, n. 6, p. 73-76, 2015.

YOKOMIZO, N. K. S.; MASUHARA, G. Termosensibilidade de propágulos de fungos ectomicorrízicos em *Pinus luchuensis* Mayr. **Revista do Instituto Florestal**, v. 8, n. 2, p. 123-130, 1996.

ZHANG, S.; WANG, L.; MA, F.; BLOOMFIELD, K. J.; YANG, J.; ATKIN, O. K. Is resource allocation and grain yield of rice altered by inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi? **Journal of Plant Ecology**, v. 8, n. 4, p. 436-448, 2014.

STEFFEN, K. T.; HATAKKA, A.; HOFRICHTER, M. Degradation of humic acids by the litter-decomposing basidiomycete *Collybia dryophila*. **Applied and Environmental Microbiology**, 68(7), 3442-3448. 2002.

KLEIN, O. I.; ISAKOVA, E. P.; DERYABINA, Y. I.; KULIKOVA, N. A.; BADUN, G. A.; CHERNYSHEVA, M. G.; KOROLEVA, O. V. Humic substances enhance growth and respiration in the basidiomycetes *Trametes maxima* under carbon limited conditions. **Journal of Chemical Ecology**, 40(6), 643-652. 2014.

ŠNAJDR, J.; STEFFEN, K. T.; HOFRICHTER, M.; BALDRIAN, P. Transformation of ¹⁴C-labelled lignin and humic substances in forest soil by the saprobic basidiomycetes *Gymnopus erythropus* and *Hypholoma fasciculare*. **Soil Biology and Biochemistry**, 42(9), 1541-1548. 2010.

SIMPSON, A. J.; SALLOUM, M. J.; KINGERY, W. L.; HATCHER, P. G. Improvements in the two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy of humic substances. **J. Environ. Qual.** 31:388-392. doi:10.2134/jeq2002.3880. 2002

SONG, G.; NOVOTNY, E. H.; SIMPSON, A. J.; CLAPP, C. E.; HAYES, M. H. B. 2008. Sequential exhaustive extraction of a Mollisol soil, and characterizations of humic components, including humin by solid and solution state NMR. **Eur. J. Soil Sci.** 59:505-516. doi.org/10.1111/j.1365-2389.2007.01006.x

KEELER, C.; KELLY, E. F.; MACIEL, G. E. Chemical-structural information from solid-state ¹³C NMR studies of a suite of humic materials from a lower montane forest soil, Colorado, USA. **Geoderma**. 124:130. doi.org/10.1016/j.geoderma.2005.01.015. 2006.

SÜNDERMANN, A.; SOLC, R.; TUNEGA, D.; HABERHAUER, G.; GERZABEK, M. H.; OOSTENBRINK, C. Vienna Soil-Organic-Matter Modeler-Generating Condensed-Phase Models of Humic Substances. **J. Mol. Graphics Modell.** 62, 253-261 DOI: 10.1016/j.jmglm.2015.10.007. 2015.

PICCOLO, A. The supramolecular structure of humic substances. **Soil science**, 166(11), 810-832. 2001.

PICCOLO, A. **The supramolecular structure of humic substances:** a novel understanding of humus chemistry and implications in soil science. 2002.

ZECH, W.; SENESI, N.; GUGGENBERGER, G.; KAISER, K.; LEHMANN, J.; MIANO, T. M.; SCHROTH, G. (1997). Factors controlling humification and mineralization of soil organic matter in the tropics. **Geoderma**, 79(1-4), 117-161.