

MATEUS DIAS NUNES

ACUMULAÇÃO DE LÍTIO POR BASIDIOMICETOS

Dissertação apresentada a Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL

2012

MATEUS DIAS NUNES

ACUMULAÇÃO DE LÍTIO POR BASIDIOMICETOS

Dissertação apresentada a Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADO: 16 de fevereiro de 2012

Maria Cristina Dantas Vanetti

Rodrigo Siqueira Batista

Wendel Batista da Silveira
(Coorientador)

Humberto Josué de Oliveira Ramos
(Coorientador)

Maria Catarina Megumi Kasuya
(Orientadora)

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	iv
RESUMO	v
ABSTRACT	vi
INTRODUÇÃO GERAL	1
1. Basidiomicetos	1
2. Transtorno bipolar	Erro! Indicador não definido.
3. Utilização de sais de lítio na medicina	4
4. Referências bibliográficas	7
CAPÍTULO 1: Efeito de diferentes formas e concentrações de lítio no desenvolvimento de basidiomicetos	11
RESUMO	12
ABSTRACT	13
1-INTRODUÇÃO	14
2- MATERIAL E MÉTODOS	16
2.1. Microrganismos	16
2.2. Meios de cultura e condições de cultivo	16
2.3. Determinação do pH e do potencial redox (E_h) dos meios de cultura	17
2.4. Determinação da fase lag	17
2.5. Taxa de crescimento	17
2.6. Alterações culturais e morfológicas das colônias	17
2.7. Distância entre os septos e diâmetro das hifas	17
2.8. Determinação da biomassa (matéria seca)	18
2.9. Análises estatísticas	18
3- RESULTADOS	19
3.1. pH e potencial redox (E_h) dos meios de cultura	19
3.2. Fase lag	20
3.3. Velocidade de crescimento	27
3.4. Produção de biomassa fúngica	27
3.5. Distância entre os septos	27
3.6. Diâmetro das hifas	27
3.7. Morfologia	31
4- DISCUSSÃO	34
4.1. pH e potencial redox (E_h) dos meios de cultura	34

4.2. Fase lag.....	35
4.3. Velocidade de crescimento e biomassa.....	36
4.4. Alterações culturais e morfológicas das colônias e das hifas	36
5- CONCLUSÕES	38
6- REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	39
CAPÍTULO 2: Enriquecimento de cogumelos com diferentes formas de lítio	42
RESUMO	43
ABSTRACT.....	44
1- INTRODUÇÃO.....	45
2- MATERIAL E MÉTODOS.....	47
2.1. Micro-organismos e condições de cultivo	47
2.2. Substratos e condições de enriquecimento com lítio.....	47
2.3. Determinação das alterações morfológicas.....	48
2.4. Quantificação do teor de lítio nos cogumelos	48
2.5. Análise estatísticas.....	49
3- RESULTADOS.....	50
3.1. Eficiência biológica.....	50
3.2. Alterações morfológicas	50
3.3. Absorção de lítio	50
4- DISCUSSÃO	57
4.1. Eficiência biológica.....	57
4.2. Alterações morfológicas	58
4.3. Absorção de lítio	58
5- CONCLUSÕES	60
6 - CONCLUSÃO GERAL DO ESTUDO.....	61
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62

LISTA DE ABREVIATURAS

CAPÍTULO 1

PLO 6 – *Pleurotus ostreatus*

PLO 13 – *Pleurotus ostreatusroseus*

PLO A – *Pleurotus citrinopiliatus*

PH 01 – *Pholiota nameko*

GF – *Grifolla* sp

GF-JP – *Grifolla* sp

GR 117 – *Ganoderma* sp

PLE 04 – *Pleurotus erynki*

He 01 – *Hericium herinaceum*

Ly 01 – *Lyophyllum shimeji*

UFV 73 – *Lentinula edodes*

CAPÍTULO 2

PLO 6 – *Pleurotus ostreatus*

PLO 13 – *Pleurotus ostreatusroseus*

RESUMO

NUNES, Mateus Dias. M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, Fevereiro de 2012. **Acumulação de lítio por basidiomicetos.** Orientadora: Maria Catarina Megumi Kasuya. Coorientadores: Wendel Batista da Silveira e Humberto Josué de Oliveira Ramos

Cogumelos são alimentos de baixo teor calórico e a utilização dos mesmos na alimentação é benéfica para a saúde. Cogumelos são capazes de absorver e acumular lítio, entretanto, ainda não existem estudos sobre quais espécies de basidiomicetos são mais sensíveis a lítio, quais formas de lítio prejudicam mais o desenvolvimento dos fungos e dos cogumelos e qual a capacidade de absorção de lítio pelos cogumelos. Neste estudo, verificou-se que, dentre os 11 fungos avaliados, *Pleurotus ostreatusroseus*, *Pholiota nameko* e *Pleurotus ostreatus* são os menos sensíveis às diferentes formas de lítio testadas. O Li_2SO_4 é a forma de lítio que menos prejudicou o crescimento micelial dos fungos estudados. As formas e as concentrações de lítio testadas não prejudicam a formação e a produtividade dos cogumelos. *P. ostreatus* acumula, cerca de, 16% da concentração de lítio presente nos substratos, independentemente do tempo de interação do micélio com o substrato. Entretanto *P. ostreatusroseus* aumenta a acumulação de lítio com o tempo, assimilando até 90 % do lítio adicionado ao substrato. Nossos resultados sugerem os fungos do gênero *Pleurotus* são acumuladores de lítio, mas que o *P. ostreatusroseus* apresenta maior potencial para ser utilizado na produção de cogumelos enriquecidos com esse mineral.

ABSTRACT

NUNES, Mateus Dias. M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2012. **Accumulation of lithium by Basidiomycetes.** Adviser: Maria Catarina Megumi Kasuya. Co-advisers: Wendel Batista da Silveira and Humberto Josué de Oliveira Ramos.

Mushrooms are low calorie foods and intake of some could be health. Mushrooms are capable of absorbing and accumulating lithium, however, there is no studies evaluating which Basidiomycetes are more sensitive to lithium, lithium forms that affect the development of most fungi and mushrooms lithium absorption capacity. We demonstrate that the *Pleurotus ostreatusroseus*, *Pleurotus ostreatus* and *Pholiota nameko* among the 11 fungi evaluated, are less sensitive to different forms of lithium. The Li_2SO_4 is the less affect the fungi growth. It was found that the forms and the lithium concentrations tested did not affect the development and production of mushrooms. *P. ostreatus* accumulates about 16% of the concentration of lithium present in the substrate irrespective of the interaction time with the substrate. *P. ostreatusroseus* accumulation of lithium increases with time, reaching 90% of the lithium concentration present in the substrate. Our results suggest that *P. ostreatusroseus* has a high potential to be used in the production of mushrooms enriched with lithium.

INTRODUÇÃO GERAL

1. Basidiomicetos

A maioria dos basidiomicetos são fungos saprófitos capazes de produzirem cogumelos. Os corpos de frutificação de alguns basidiomicetos são muito apreciados na culinária de diversos países, com destaque, para a China, Japão, Coréia do Sul e Estados Unidos. Estes países são os principais produtores de cogumelos do mundo (FAOSTAT, 2010). Estima-se que, atualmente, existam cerca de duas mil espécies potencialmente comestíveis de cogumelos, porém apenas 25 delas são normalmente utilizadas na alimentação humana e um número ainda menor tem sido produzido comercialmente (Vilela, 2004). Entre as espécies de basidiomicetos produzidas comercialmente e utilizadas na culinária, pode-se destacar, *Agaricus bisporus*, que representa cerca de 40 % do volume total de cogumelos produzidos, as espécies do gênero *Pleurotus*, que representam cerca de 25 % do mercado, *Lentinula edodes* que é a terceira espécie mais comercializada, *Grifola frondosa*, *Pholiota nameko*, *Volvariella spp*, *Hypsizygus marmoreus*, *Flammulina velutipes* e *Auricularia aurícula* (Vilela, 2004). As espécies do gênero *Ganoderma* também se tem destacado, entretanto, estes cogumelos são utilizados para fins medicinais (Vilela, 2004).

Devido ao seu atraente sabor, textura, aroma e valor nutricional, os cogumelos comestíveis são muito utilizados e valorizados na culinária. O seu valor nutricional é devido ao alto conteúdo de proteínas, fibras, vitaminas, minerais e ao baixo teor de lipídeos (Bano e Rajarathnam, 1988; Manzi et al., 1999; Barros et al., 2008). A composição de aminoácidos das proteínas dos cogumelos é comparável às proteínas de origem animal (Flegg e Maw, 1997). Isso é importante, pois possibilita que os cogumelos sejam capazes de substituir as carnes, que são consideradas, em algumas culturas, indispensáveis na alimentação diária. O fato dos cogumelos serem alimentos de baixo valor energético deve facilitar a inclusão de cogumelos no hábito alimentar das pessoas.

O consumo de cogumelos também pode trazer benefícios para a saúde. O cogumelo da espécie *Agrocybe aegerita* possui algumas propriedades anti-tumor e anti-inflamatórias, portanto, sugere-se que o consumo prolongado do mesmo possa reduzir inflamações e combater o desenvolvimento de alguns tipos de câncer (Diyabalanage et al., 2008). Cogumelos de outras espécies do gênero *Agrocybe*, *Lentinula*, *Volvariella* e

Pleurotus também contém outros metabólitos bioativos, por exemplo, anti-oxidantes, anti-fúngicos e polissacarídeos com atividade hipoglicemiante (Tadashi et al., 1994; Kim et al., 1997; Cheung et al., 2003; Jose et al., 2004; Ngai et al., 2005; Wong e Chye, 2009). Atualmente, doenças cardiovasculares são uma das principais causas de mortes em vários países industrializados (Yusuf e Anand, 2010). Kaneda e Tokuda (1966) observaram que o consumo de cogumelos de diversas espécies de basidiomicetos, dentre elas, *Lentinula edodes*, tinha uma ação hipocolesterolêmica. Também existem estudos semelhantes com o cogumelo *Pleurotus ostreatus* (Bobek et al., 1991; Bobek et al., 1993; Bobek et al., 1994). Portanto, o consumo de cogumelos pode trazer benefícios para a saúde humana, tanto que alguns produtos provenientes de cogumelos ou micélio de fungos já são comercializados na forma de cápsulas e tabletes como suplementos dietéticos (Wasser et al., 2000).

Outra característica dos corpos de frutificação de basidiomicetos é a capacidade de absorver e acumular diferentes tipos de elementos, por exemplo, selênio, lítio, cobre, zinco, cádmio e urânio (Nakajima e Sakaguchi, 1993; Bayramoglu et al., 2002; de Assunção, 2010; Figlas et al., 2010; Silva et al., 2012). *P. ostreatus* é capaz de absorver selênio, visto que o enriquecimento do substrato de cultivo dos fungos com selenito de sódio provocou um aumento de até 7,5 vezes na concentração de selênio nos cogumelos (Silva et al., 2012). Diversos basidiomicetos, inclusive *P. ostreatus*, também são capazes de absorver e acumular lítio do meio (Widmer, 1999; Vetter, 2005; de Assunção, 2010). Entretanto, devido a escassez deste elemento no ambiente, as concentrações de lítio normalmente encontradas nos cogumelos são muito pequenas (Vetter, 2005). Widmer (1999) observou que adição de carbonato de lítio, cloreto de lítio, sulfato de lítio, acetato de lítio, citrato de lítio ou qualquer outro composto que contenha lítio e seja solúvel em água, no substrato, na água utilizada para irrigação, nas paredes e chão dos quartos de frutificação provocava aumento na concentração de lítio nos cogumelos de algumas espécies de fungos. Este mesmo autor também observou que a relação entre disponibilidade de lítio e absorção do mesmo é linear em algumas espécies de fungos, possibilitando o controle da quantidade de lítio a ser absorvida. O enriquecimento do substrato de cultivo de cogumelos de *P. ostreatus* com diferentes concentrações de cloreto de lítio mostrou que o acúmulo de lítio no corpo de frutificação foi diretamente proporcional às concentrações de cloreto de lítio adicionadas ao substrato sem afetar a eficiência biológica e as características

morfológicas dos cogumelos (de Assunção, 2010). Cogumelos da espécie *Agaricus bisporus* com concentrações de até 100 ppm de lítio já foram relatados na literatura (Widmer, 1999). Portanto, o enriquecimento do substrato, utilizado para o cultivo de cogumelos com lítio é capaz de aumentar a concentração de lítio em cogumelos.

O lítio presente em cogumelos pode estar coordenado com compostos orgânicos. de Assunção (2010) verificou que os compostos de lítio presentes em cogumelos podem ser mais biodisponíveis que os sais de lítio. Demonstrou, ainda, que o lítio presente nos cogumelos de *P. ostreatus* apresenta cerca de 70 % de fração solúvel em água e 30 % de fração reduzida e trocável. Esses compostos de lítio diferem completamente do sal de lítio, na forma de carbonato de lítio, que se encontra apenas na fração residual (Assunção, 2010). As frações trocáveis e reduzidas estão relacionadas com os processos de adesão física ou ligação de íons e moléculas na superfície de outras moléculas (Begonia et al., 2008). As formas minerais que pertencem às frações não residuais, que incluem a fração trocável, solúvel em água e fração reduzida, apresentam maior solubilidade se comparada à fração residual (Figlas et al., 2010). A solubilidade é um importante fator que afeta a biodisponibilidade desses minerais, podendo-se inferir que existe uma tendência dos minerais que se encontram nas frações não residuais serem mais biodisponíveis (Figlas et al., 2010). Entretanto, é importante frisar que para um elemento ser absorvido e utilizado pelo organismo necessariamente deverá estar em uma forma solúvel no fluído intestinal, na forma de íon ou ligado a outra molécula (Elless et al., 2000).

A identificação das moléculas, que estão interagindo com lítio nos fungos, é fundamental para posterior descrição e caracterização dos compostos de lítio. A caracterização e descrição destas moléculas possibilitará determinar quais compostos podem apresentar possíveis atividades terapêuticas, o que é importante antes do desenvolvimento de pesquisas farmacêuticas e estudos mais onerosos e demorados com os cogumelos e com os compostos que estão interagindo com o lítio, como por exemplo, estudos toxicológicos. A identificação possibilitará também estudar a localização, a síntese e entender como ocorrem os processos de regulação desses compostos nos fungos, o que é essencial para posteriores estudos de melhoramento genético.

2. Utilização de sais de lítio na medicina

Transtorno bipolar é uma doença relacionada com surtos de depressão que afeta, principalmente, indivíduos entre 15 e 25 anos (Blader e Carlson, 2007) e que requer tratamento adequado e contínuo. Recentemente, tem se observado um elevado aumento no número de crianças e adultos com esse transtorno (Blader e Carlson, 2007). Os principais problemas dessa doença são o elevado índice de mortalidade devido a suicídio (15 - 20%) (Rose et al., 2003), frequente necessidade de internação e elevada recorrência, de cerca de 50 % no período de um ano e 70 % durante quatro anos (Fink, 2001; Scott et al., 2006). Outro problema é a perda da qualidade de vida de toda a família do paciente, devido a alguns sintomas como o aumento de agressividade, agitação, insônia, aumento de alcoolismo e uso de entorpecentes, mudanças bruscas no temperamento, entre outros (Kasper e Hirschfeld, 2005). Diante desse cenário, é importante o tratamento correto da doença, tanto para melhorar a qualidade de vida do paciente e da família do mesmo, quanto para diminuir os custos do tratamento.

Fontes de lítio, carbonato de lítio (Li_2CO_3) e acetato de lítio (CH_3COOLi), começaram a ser amplamente utilizados nos tratamentos de transtornos psiquiátricos cerca de 60 anos atrás, principalmente no tratamento do transtorno bipolar. A principal característica terapêutica desses sais é o controle do humor dos pacientes e a redução do número de suicídios (Baldessarini et al., 1999). Há alguns anos, esses sais de lítio também são utilizados no tratamento de depressão (Malone et al., 2000). Um estudo realizado na década de 80 estimou que nos Estados Unidos houve uma economia de aproximadamente 4 bilhões de dólares (2,88 bilhões em diminuição de despesas com tratamentos e 1,28 bilhões em produtividade) após a implementação do lítio nos tratamentos psiquiátricos, devido a redução de gastos com os tratamentos e recuperação da produtividade (Reifman e Wyatt, 1980). Embora os mecanismos de atuação do lítio não sejam muito bem esclarecidos é consenso este elemento é importante nos tratamentos de transtornos psiquiátricos, sendo seus benefícios observados pela redução da agressividade tanto em adultos como em crianças (Malone et al., 2000), redução de mortalidade devido a problemas cardiovasculares, redução dos riscos de declínio cognitivo e, conseqüentemente, redução no aparecimento de demência e episódios de transtorno de humor, dentre outros (Ghaemi, 2010).

Entretanto, desde o começo de sua utilização para fins medicinais, médicos e profissionais da saúde alertam para toxicidade do lítio. Em 1949, sua utilização foi banida nos EUA e apenas em 1970 foi retomada após aprovação FDA (Food and Drug Administration) (Strobusch e Jefferson, 1980). A eficiência do tratamento depende da frequência de uso da medicação e das dosagens de lítio, que devem ser próximas das dosagens máximas recomendadas. A concentração de lítio no sangue dos pacientes é em torno de 10 mg L^{-1} e essa concentração já acarreta uma pequena intoxicação (Aral e Vecchio-Sadus, 2008). As dosagens altas são necessárias principalmente devido à baixa velocidade de deslocamento dos íons de lítio pela membrana plasmática (Aral e Vecchio-Sadus, 2008), o que pode interferir na capacidade de sua absorção, na distribuição do mesmo no corpo e na taxa de excreção. Alguns efeitos colaterais podem ser observados durante os tratamentos, como por exemplo, danos no sistema nervoso central (Kjølholt et al., 2003), aparecimento de hipotireoidismo, ganho de peso, danos durante o desenvolvimento embrionário, inibição de múltiplas enzimas, alteração na hematopoiese, dano nos rins, dentre outros. (Aral e Vecchio-Sadus, 2008; Ghaemi, 2010). Cerca de 90 % do lítio ingerido é excretado pelos rins (Arancibia et al., 1986). Devido a continua exposição dos pacientes a esse metal, alguns distúrbios renais como insuficiência renal crônica em cerca de 5 % dos pacientes (Hetmar et al., 1986) e redução da capacidade de concentração urinária são comuns (Ghaemi, 2010).

Deste modo, o consumo de cogumelos enriquecidos com lítio por pacientes que sofrem de transtorno bipolar pode ser uma estratégia interessante para aumentar a concentração de lítio no sangue dos mesmos e, talvez, diminuir a necessidade de medicação com sais de lítio.

Entretanto, na literatura consultada, não existem estudos sobre as formas e concentrações de lítio que afeta a morfologia dos fungos e também o seu desenvolvimento e produtividade. Além disso, existe a necessidade de verificar a capacidade de absorção de lítio pelos fungos e se o enriquecimento prejudica a produção de cogumelos.

Dessa forma, este trabalho foi realizado seguindo-se a seguinte sequência:

1. Determinar as espécies de cogumelos menos sensíveis a lítio;

2. Determinar as formas de lítio que menos prejudicam o desenvolvimento micelial dos fungos;
3. Determinar a concentração das formas de lítio que não prejudicam o desenvolvimento micelial;
4. Avaliar se o enriquecimento prejudica a eficiência biológica e altera as características morfológicas dos cogumelos;
5. Determinar as taxas de absorção de lítio pelos cogumelos e avaliar se existe influência do tempo de exposição o micélio às formas de lítio na taxa de absorção;
6. Determinar qual a melhor forma de lítio para ser utilizada para o enriquecimento dos cogumelos

3. Referências bibliográficas

- Aral, H. e Vecchio-Sadus, A. (2008). "Toxicity of lithium to humans and the environment--A literature review." **Ecotoxicology and Environmental Safety** 70: 349-356.
- Arancibia, A., Corvalan, F., Mella, F. e Concha, L. (1986). "Absorption and disposition kinetics of lithium carbonate following administration of conventional and controlled release formulations." **International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics** 24: 240-245.
- Assunção, L. S. (2010). "Enriquecimento de cogumelos de *Pleurotus ostreatus* com ferro, zinco e lítio. ". *Departamento de Microbiologia Agrícola*. Viçosa. Universidade Federal de Viçosa. **Tese de mestrado**.
- Baldessarini, R., Tondo, L. e Hennen, J. (1999). "Effects of lithium treatment and its discontinuation on suicidal behavior in bipolar manic-depressive disorders." **Journal Clinical Psychiatry** 60: 77-84
- Bano, Z. e Rajarathnam, S. (1988). "Pleurotus mushrooms. Part II. Chemical composition, nutritional value, post-harvest physiology, preservation, and role as human food." **Critical Reviews in Food Science and Nutrition** 27: 87-158.
- Barros, L., Cruz, T., Baptista, P., Estevinho, L. M. e Ferreira, I. C. F. R. (2008). "Wild and commercial mushrooms as source of nutrients and nutraceuticals." **Food and Chemical Toxicology** 46: 2742-2747.
- Bayramoglu, G., Denizli, A., Bektas, S. e Arica, M. Y. (2002). "Entrapment of *Lentinus sajor-caju* into Ca-alginate gel beads for removal of Cd(II) ions from aqueous solution: Preparation and biosorption kinetics analysis." **Microchemical Journal** 72: 63-76.
- Begonia, G., Miller, G., Begonia, M. e Ntoni, J. (2008). "Bioavailability and uptake of lead by coffeeweed (*Sesbania exaltata* Raf.)." **International Journal of Environmental Research and Public Health** 5: 436-440.
- Blader, J. C. e Carlson, G. A. (2007). "Increased rates of bipolar disorder diagnoses among U.S. child, adolescent, and adult Inpatients, 1996-2004." **Biological Psychiatry** 62: 107-114.
- Bobek, P., Ginter, E., Kuniak, L., Babala, J., Jurcovicova, M., Ozdín, L. e Cerven, J. (1991). "Effect of mushroom *Pleurotus ostreatus* and isolated fungal

polysaccharide on serum and liver lipids in Syrian hamsters with hyperlipoproteinemia." **Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)** 7: 105-108.

Bobek, P., Kuniak, L. e Ozdin, L. (1993). "The mushroom *Pleurotus ostreatus* reduces secretion and accelerates the fractional turnover rate of very-low-density lipoproteins in the rat." **Annals of Nutrition and Metabolism** 37: 142-145.

Bobek, P., Ozdin, L. e Kuniak, L. (1994). "Mechanism of hypocholesterolemic effect of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) in rats: Reduction of cholesterol absorption and increase of plasma cholesterol removal." **Zeitschrift fur Ernahrungswissenschaft** 33: 44-50.

Cheung, L. M., Cheung, P. C. K. e Ooi, V. E. C. (2003). "Antioxidant activity and total phenolics of edible mushroom extracts." **Food Chemistry** 81: 249-255.

Diyabalanage, T., Mulabagal, V., Mills, G., DeWitt, D. L. e Nair, M. G. (2008). "Health-beneficial qualities of the edible mushroom, *Agrocybe aegerita*." **Food Chemistry** 108: 97-102.

Elless, M. P., Blaylock, M. J., Huang, J. W. e Gussman, C. D. (2000). "Plants as a natural source of concentrated mineral nutritional supplements." **Food Chemistry** 71: 181-188.

FAOSTAT (2010). Food and Agriculture Organization of The United Nations.

Figlas, D., Oddera, M. e Curvetto, N. (2010). "Bioaccumulation and bioavailability of copper and zinc on mineral-enriched mycelium of *Grifola frondosa*." **Journal of Medicinal Food** 13: 469-475.

Fink, M. (2001). "ECT has much to offer our patients: It should won't be ignored." **World Journal of Biological Psychiatry** 2: 1-8.

Flegg, P. B. e Maw, G. (1997). "Mushrooms and their possible contribution to world protein needs." **Mushroom Journal** 48: 395-403.

Ghaemi, S. N. (2010). "From BALANCE to DSM-5: taking lithium seriously." **Bipolar Disorders** 12: 673-677.

Hetmar, O., Bolwig, T. G., Brun, C., Ladefoged, J., Larsen, S. e Rafaelsen, O. J. (1986). "Lithium: long-term effects on the kidney I. Renal function in retrospect." **Acta Psychiatrica Scandinavica** 73: 574-581.

- Jose, N., Ajith, T. A. e Janardhanan, K. K. (2004). "Methanol extract of the oyster mushroom, *Pleurotus florida*, inhibits inflammation and platelet aggregation." **Phytotherapy Research** 18: 43-46.
- Kaneda, T. e Tokuda, S. (1966). "Effect of various mushroom preparations on cholesterol levels in rats." **Journal of Nutrition** 90: 371-376.
- Kasper, S. e Hirschfeld, R. M. A. (2005). "HandBook of bipolar disorder: Diagnosis and therapeutic approaches", **Informa Healthcare; 1 edition.**
- Kim, W. G., Lee, I. K., Kim, J. P., Ryoo, I. J., Koshino, H. e Yoo, I. D. (1997). "New indole derivatives with free radical scavenging activity from *Agrocybe cylindracea*." **Journal of Natural Products** 60: 721-723.
- Kjølholt, J., Stuer-Lauridsen, F., Mogensen, A. S. e Havelund, S. (2003) The elements in the second rank - an environmental problem now or in the future? **The Danish Environmental Protection Agency**
- Malone, R. P., Delaney, M. A., Luebbert, J. F., Cater, J. e Campbell, M. (2000). "A double-blind placebo-controlled study of lithium in hospitalized aggressive children and adolescents with conduct disorder." **Archives of General Psychiatry** 57: 649-654.
- Manzi, P., Gambelli, L., Marconi, S., Vivanti, V. e Pizzoferrato, L. (1999). "Nutrients in edible mushrooms: an inter-species comparative study." **Food Chemistry** 65: 477-482.
- Nakajima, A. e Sakaguchi, T. (1993). "Accumulation of uranium by basidiomycetes." **Applied Microbiology and Biotechnology** 38: 574-578.
- Ngai, P. H. K., Zhao, Z. e Ng, T. B. (2005). "Agrocybin, an antifungal peptide from the edible mushroom *Agrocybe cylindracea*." **Peptides** 26: 191-196.
- Reifman, A. e Wyatt, R. J. (1980). "Lithium: A brake in the rising cost of mental illness." **Archives of General Psychiatry** 37: 385-388.
- Rose, D., Fleischmann, P., Wykes, T., Leese, M. e Bindman, J. (2003). "Patients' perspectives on electroconvulsive therapy: systematic review." **British Medical Journal** 326: 1363.

- Scott, J., Paykel, E., Morriss, R., Bentall, R., Kinderman, P., Johnson, T., Abbott, R. e Hayhurst, H. (2006). "Cognitive-behavioural therapy for severe and recurrent bipolar disorders: Randomised controlled trial." **The British Journal of Psychiatry** 188: 313-320.
- Silva, M. C. S., Naozuka, J., da Luz, J. M. R., de Assunção, L. S., Oliveira, P. V., Vanetti, M. C. D., Bazzolli, D. M. S. e Kasuya, M. C. M. (2012). "Enrichment of *Pleurotus ostreatus* mushrooms with selenium in coffee husks." **Food Chemistry** 131: 558-563.
- Strobusch, A. e Jefferson, J. (1980). "The checkered history of lithium in medicine." **Pharmacy in History** 22: 72-76.
- Tadashi, K., Sobue, S. e Ukai, S. (1994). "Polysaccharides in fungi XXXI, structural features of and hypoglycemic activity of two polysachcharides from hot water extracts of *Agrocybe cylindrica*." **Carbohydrate Research** 251: 81-87.
- Vetter, J. (2005). "Lithium content of some common edible wild-growing mushrooms." **Food Chemistry** 90: 31-37.
- Vilela, P. S. (2004). "Cogumelos - mercado e comercialização." Acessado 31/12, 2010, de www.faemg.org.br
- Wasser, S. P., Nevo, E., Sokolov, D., Reshetnikov, S. e Timot-Tismenetsky, M. (2000). "Dietary supplements from medicinal mushrooms: diversity of types and variety of regulations." **International Journal of Medicinal Mushrooms** 2: 1-9.
- Widmer, C. (1999). "Lithium Anreicherung von Pilze". *Eidgenossisches institut fur geistiges eingentum*. **CH 694 263 A5**. Germany
- Wong, J. Y. e Chye, F. Y. (2009). "Antioxidant properties of selected tropical wild edible mushrooms." **Journal of Food Composition and Analysis** 22: 269-277.
- Yusuf, S. e Anand, S. (2010). "Deciphering the causes of cardiovascular and other complex diseases in populations: Achievements, challenges, opportunities, and approaches." **Progress in Cardiovascular Diseases** 53: 62-67.

CAPÍTULO 1: Efeito de diferentes formas e concentrações de lítio no desenvolvimento de basidiomicetos

RESUMO

O enriquecimento de cogumelos com lítio pode ser uma estratégia para fornecer formas de lítio mais solúveis e biodisponíveis para tratamento de algumas doenças, como o transtorno bipolar. Entretanto, ainda não existem estudos que determinam quais espécies de basidiomicetos absorvem o lítio, e quais as formas e concentrações que os fungos toleram sem afetar a fase lag, a velocidade de crescimento, a produção de biomassa e a morfologia das hifas e das colônias. Os fungos *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus ostreatusroseus* e *Pholiota nameko* foram os isolados que cresceram nos meios de cultura com as maiores concentrações de lítio, sendo *P. ostreatusroseus* o que apresentou os melhores resultados. O enriquecimento com Li_2SO_4 prejudicou menos o desenvolvimento micelial dos fungos se comparado com as outras formas de lítio utilizadas. Nossos resultados indicam que o Li_2SO_4 é a forma mais indicada para o enriquecimento de cogumelos, e a espécie *P. ostreatusroseus* apresenta maior potencial para ser utilizada na produção de cogumelos enriquecidos com lítio.

ABSTRACT

The enrichment of mushrooms with lithium may be a strategy to provide forms of lithium more soluble and bioavailable for treatment of some diseases such as bipolar disorder. However, there are no studies that determine which species of basidiomycetes absorb lithium, and what forms and concentration that fungi can tolerate without affecting the lag phase, growth rate, biomass production and hyphal and colonies morphology. The fungi *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus ostreatusroseus* and *Pholiota nameko* were the isolates that grown in culture media with higher concentrations of lithium. *Pleurotus ostreatusroseus* showed the best results. The enrichment with Li_2SO_4 less impaired the development of fungi compared to other forms of lithium. Our results indicate that the form of lithium and species Li_2SO_4 , *Pleurotus ostreatusroseus* are recommended to be used in the production of mushrooms enriched with lithium.

INTRODUÇÃO

O consumo de cogumelos está muito relacionado com fatores culturais e a China e os Estados Unidos são os maiores produtores de cogumelos do mundo (FAOSTAT, 2010). Dentre as espécies cultivadas pode-se citar *Agaricus bisporus*, *Lentinula edodes*, *Grifola frondosa*, *Hericium herinaceum*, *Pholiota nameko*, *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus ostreatusroseus*, dentre outros. Algumas espécies de basidiomicetos são capazes de absorver e acumular elementos do meio em seus corpos de frutificação como o selênio e lítio, quando cultivados em substratos com alta concentração desses elementos, sendo que concentrações de até 100 ppm de lítio já foram encontradas em cogumelos (Widmer, 1999; Bayramoglu et al., 2002; Figlas et al., 2010; Assunção, 2010; Silva et al., 2012). Portanto, se os cogumelos absorvem quantidades elevadas de lítio, o consumo dos mesmos pode ser uma estratégia interessante para aumentar a ingestão humana diária de lítio.

Dependendo da concentração, o lítio pode ser tóxico para animais, plantas e microrganismos (Aral e Vecchio-Sadus, 2008). Wildman (1991) observou que o enriquecimento do meio de cultura com 6 g L⁻¹ de LiCl inibia o crescimento de algumas espécies de *Trichoderma*. Entretanto, as concentrações inibitórias de LiCl variam muito entre microrganismos, por exemplo, para inibir o crescimento de *Listeria monocytogenes* é necessário adicionar de 30 g L⁻¹ de LiCl no meio de cultura enquanto a adição de 3 g L⁻¹ é suficiente para inibir desenvolvimento de *Enterococcus faecalis* (Cox et al., 1990). Além de inibir o crescimento microbiano, o lítio provoca outros efeitos negativos como indução precoce da esporulação em *Bacillus subtilis* (Warburg et al., 1985) e inibição da glicólise e piruvato kinase em *Escherichia coli* (Umeda et al., 1984). Portanto, é importante determinar qual concentração de LiCl que inibe ou prejudica o crescimento micelial de espécies de cogumelos comestíveis, visto que, o desenvolvimento micelial é fundamental para a produção de cogumelos.

A adição de carbonato de lítio, cloreto de lítio, sulfato de lítio, acetato de lítio, citrato de lítio ou qualquer outro composto que contenha lítio, e seja solúvel em água no substrato de cultivo dos cogumelos, provoca aumento de lítio nos corpos de frutificação (Widmer, 1999). Mas, como a composição química destas formas de lítio é diferente, a influência das mesmas no crescimento dos fungos não deve ser igual. Por exemplo, acetato é um ácido orgânico fraco que inibe o crescimento de alguns microrganismos

(Cheung et al., 2010) e cloro é utilizado como agente desinfetante (Tyrrell et al., 1995). Portanto, o desenvolvimento de fungos em substratos contendo lítio deve ser influenciado pelas formas de lítio adicionadas ao substrato.

Deste modo, existe a necessidade de se conhecer quais espécies de basidiomicetos acumulam o lítio e quais as formas e concentrações desse elemento que podem ser utilizadas para produção de cogumelos enriquecidos sem afetar o crescimento e a morfologia dos fungos.

O objetivo deste trabalho foi determinar quais as espécies de basidiomicetos que não são muito sensíveis a lítio e qual as formas de lítio que não prejudica o desenvolvimento micelial dos fungos.

2- MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Microrganismos

Foram utilizados os isolados de *Pleurotus ostreatus* (PLO 6) e *Pleurotus ostreatusroseus* (PLO 13), *Pleurotus citrinopiliatus* (PLO A), *Grifolla* sp. (GF), *Grifolla* sp. (GF-JP), *Ganoderma* sp. (GR 117), *Pleurotus erynki* (PLE 04), *Hericiium herinaceum* (He 01), *Pholiota nameko* (PH 01), *Lyophillum shimeji* (Ly 01) e *Lentinula edodes* (UFV 73), pertencentes à coleção de fungos do Laboratório de Associações Micorrízicas do Departamento de Microbiologia da UFV/BIOAGRO. Para reativação das culturas, amostras de micélio dos isolados fúngicos foram transferidas para o centro de uma placa de Petri contendo BDA (Batata Dextrose Agar), até a colonização completa da placa de Petri..

2.2. Meios de cultura e condições de cultivo

Para avaliar o crescimento das culturas na presença de lítio foi utilizado o meio de cultura BDA contendo as seguintes concentrações de cloreto de lítio (Sigma), em mg L⁻¹: a) 0,0 b) 50 c) 100 d) 150 e) 200 f) 270. Os meios foram autoclavados a 121 °C durante 20 min. discos de Agar contendo micélio dos isolados foram transferidos para o centro de placas de Petri contendo os meios enriquecidos, ou não, e incubadas em estufas tipo BOD, com temperatura controlada a 22,5 ± 1 °C.

Após determinação das concentrações mínimas de inibição do LiCl que permitiram o crescimento de cada fungo, outro experimento foi realizado utilizando as seguintes formas de lítio: sulfato de lítio (Li₂SO₄), fluoreto de lítio (LiF), hidreto de lítio (LiH), carbonato de lítio (Li₂CO₃) e acetato de lítio (CH₃COOLi), e o meio BDA contendo os seguintes fungos e concentrações de lítio a) PLO 13 e PLO 6 com 270 mg L⁻¹ de lítio b) PLO A, GR 117, GF, GF-JP e PLE 04 com 200 mg L⁻¹ de lítio c) UFV 73, He 01 e Ly 01 com 100 mg L⁻¹ de lítio. Amostras de micélio dos isolados foram transferidas para o centro de placas de Petri contendo os meios enriquecidos, os quais foram incubados em câmaras de crescimento (BOD) a 22,5 ± 1 °C.

2.3. Determinação do pH e do potencial redox (E_h) dos meios de cultura

Para determinação do pH e do potencial redox, amostras do meio de cultura foram mantidas aquecidas a 45 °C, em banho-maria, para evitar solidificação do meio. As amostras foram submetidas à leitura direta no aparelho ORION 5 STAR, Thermo Electron Corporation, depois da calibração do mesmo. Devido ao fato de apenas o PLO 13 ter desenvolvido em meio BDA enriquecido com LiH, apenas neste meio foram realizadas leituras do meio de cultura, sem o fungo, no início e no final do experimento.

2.4. Determinação da fase lag

Após a inoculação dos fungos as placas de Petri foram observadas diariamente para conferir o início do crescimento micelial.

2.5. Taxa de crescimento

O crescimento dos fungos foi determinado pela medição de dois diâmetros da colônia, perpendiculares entre si. As medições foram realizadas a cada 48 h para os fungos com crescimento mais rápido PLO 6, PLO 13, PLO A, PLE 04, PH 01, GR 117, e a cada 72 h para os fungos com menores taxas de crescimento GF, GF-JP, UFV 73, He 01 e Ly 01.

2.6. Caracterizações culturais e morfológicas das colônias

As características culturais das colônias foram avaliadas de forma qualitativa utilizando o seguinte critério: a) modificação na coloração do meio de cultura; b) modificação na coloração das colônias; c) modificação na espessura das colônias; d) modificação no aspecto de crescimento da colônia (uniforme ou desigual).

2.7. Distância entre os septos e diâmetro das hifas

Para a determinação da distância entre os septos e o diâmetro das hifas amostras do micélio de cada fungo foram coradas em lâminas de microscopia, por 3 min, com 20 μL de solução de calcoflúor a $1\mu\text{g mL}^{-1}$. As lâminas foram observadas em microscópio com acessórios de epifluorescência Y-FL, usando-se a faixa de comprimento de onda de

excitação de 450 - 520_{nm}. As imagens foram capturadas com uma câmera digital FUJIX HC-300Z e processadas com o software Image Pro Plus. Essa determinação é importante, visto que algumas espécies de fungos apresentam alterações morfológicas das hifas quando submetidos a condições ambientais inadequadas.

2.8. Determinação da biomassa

Para a determinação da biomassa micelial, todo o micélio presente nas placas de Petri juntamente com o meio de cultura, foram transferidos para frascos com 500 mL de água deionizada tipo I e aquecidos até todo o meio de cultura ser dissolvido. A solução foi filtrada e o micélio retido no filtro foi levado à estufa a 80 °C, até massa constante, em recipiente de papel alumínio com massa conhecida, para determinação da biomassa micelial final.

2.9. Análises estatísticas

O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado com sete repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância e, posteriormente, as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

3- RESULTADOS

3.1. pH e potencial redox (E_h) dos meios de cultura

O CH_3COOLi , Li_2CO_3 e LiH afetaram tanto o pH como o E_h dos meios de culturas (Tabelas 1 e 2). O LiCl , Li_2SO_4 e LiF não alteraram o pH e E_h em nenhuma das concentrações testadas. O LiH e Li_2CO_3 promoveram o maior aumento do pH, chegando a 9,2 na concentração de 270 mg L^{-1} de lítio (Tabela 1). Esses mesmos compostos também causaram a maior diminuição do E_h , chegando a valores menores que -200 mV (Tabela 2).

Tabela 1: pH inicial dos meios de cultura enriquecidos com diferentes concentrações e formas de lítio.

Tratamentos	Lítio (mg L^{-1})				
	50	100	150	200	270
Controle			5,5		
Li_2SO_4	5,6	5,6	5,8	5,8	5,8
LiCl	5,5	5,6	5,7	5,7	5,8
CH_3COOLi	5,7	5,8	6,1	6,2	6,4
LiH	6,0	6,6	7,7	8,5	9,2
Li_2CO_3	6,2	7,0	8,0	9,1	9,2
LiF	5,5	5,6	5,7	5,6	5,7

Tabela 2: Potencial redox inicial (mV) dos meios de cultura enriquecidos com diferentes concentrações e formas de lítio.

Tratamentos	Lítio (mg L ⁻¹)				
	50	100	150	200	270
Controle			358,2		
Li ₂ SO ₄	352,7	353,1	356,0	355,3	342,7
LiCl	357,7	351,6	350,8	338,1	348,8
CH ₃ COOLi	360,2	3322,3	307,7	279,7	267,5
LiH	356,4	316,4	190,8	-225,1	-224,7
Li ₂ CO ₃	315,3	254,1	192,1	-134,3	-241,0
LiF	361,3	352,9	356,8	376,5	338,9

3.2. Fase lag

O aumento na concentração de LiCl e a adição de diferentes formas de lítio aumentaram a fase lag das espécies testadas, com exceção dos isolados PH 01 e UFV 73 (Tabela 3 e 4). Os isolados PLO A, PLO 13, GR 117 e PLE 04 não foram afetadas pelo LiCl, entretanto, foram afetadas por outras formas de lítio, principalmente pelo CH₃COOLi. A maior fase lag foi observada quando o GR 117 foi cultivado em meio BDA contendo hidreto de lítio, de 26,6 d (Tabela 4).

O He 01 e Ly 01 destacaram-se por terem a fase lag prolongada por aproximadamente 5 vezes utilizando apenas 50 mg L⁻¹ de lítio (LiCl) (Tabela 3).

Tabela 3: Fase lag, taxa de crescimento (cm dia⁻¹), massa seca, número de repetições (N) e alterações nas características culturais das colônias dos fungos de 11 espécies de basidiomicetos em meios de cultura adicionados com diferentes concentrações de LiCl (valores expressos como média ± desvio padrão).

Isolado	Lítio (mg L ⁻¹)	Fase lag (dias)	Taxa de crescimento (cm dia ⁻¹)	Massa seca (g)	N	Alterações nas características culturais			
PH 01	Controle	2,6 ± 0,245	0,409 ± 0,042	0,1906 ± 0,0359	a	5	-		
	50	2,667 ± 0,557	0,363 ± 0,031	0,1253 ± 0,0217	ab	4	Perda da coloração das colônias		
	100	2,667 ± 0,516	0,395 ± 0,024	0,1575 ± 0,0510	a	6	Perda da coloração e colônias finas		
	150	2,8 ± 0,447	0,383 ± 0,022	0,1186 ± 0,0470	ab	5	Perda da coloração e maior frequência de colônias finas		
	200	2,833 ± 0,408	0,339 ± 0,069	0,0566 ± 0,0334	b	6	Perda da coloração e colônias muito finas		
	270	3,167 ± 0,408	0,376 ± 0,016	0,0183 ± 0,0046	c	6	Perda da coloração e colônias muito finas		
PLO 06	Controle	1,571 ± 0,535	b	0,795 ± 0,074	a	0,5120 ± 0,0599	a	7	-
	50	1,600 ± 0,548	b	0,599 ± 0,034	b	0,4000 ± 0,0516	ab	5	sm
	100	2	b	0,460 ± 0,033	c	0,3730 ± 0,1102	b	4	Colônias amareladas
	150	2,167 ± 0,408	b	0,407 ± 0,018	c	0,3055 ± 0,0888	bc	6	Colônias amareladas e hifas aéreas
	200	2,250 ± 0,500	ab	0,251 ± 0,020	d	0,1935 ± 0,0291	c	4	Colônias com coloração modificada e pouco densas
	270	3	a	0,027 ± 0,007	e	0,0881 ± 0,0177	d	6	Colônias muito densas, com coloração modificada e modificação coloração do meio

Tabela 3: Continuação

Isolado	Lítio (mg L ⁻¹)	Fase lag (dias)	Taxa de crescimento (cm dia ⁻¹)	Massa seca (g)	N	Alterações nas características culturais
PLO 13	Controle	1,571 ± 0,535	0,636 ± 0,037	0,2054 ± 0,0398	7	-
	50	1,571 ± 0,535	0,632 ± 0,042	0,1996 ± 0,0505	7	sm
	100	1,667 ± 0,516	0,644 ± 0,034	0,2235 ± 0,0338	6	sm
	150	1,714 ± 0,488	0,640 ± 0,021	0,1916 ± 0,0640	7	sm
	200	1,833 ± 0,408	0,604 ± 0,071	0,1712 ± 0,0473	6	sm
	270	2,167 ± 0,408	0,604 ± 0,104	0,1422 ± 0,0417	6	sm
GR 117	Controle	1,714 ± 0,488	0,549 ± 0,069	a 0,2596 ± 0,0349	a 7	
	50	1,857 ± 0,378	0,512 ± 0,033	a 0,2894 ± 0,0498	a 7	sm
	150	2,571 ± 0,535	0,187 ± 0,039	b 0,0330 ± 0,0142	b 6	sm
	200*	-	-	-		-
PLO A	Controle	1,667 ± 0,516	0,571 ± 0,064	a 0,306 ± 0,0702	a 6	-
	50	2 ± 0,00	0,565 ± 0,060	a 0,3618 ± 0,1053	a 6	sm
	100	2,4 ± 0,548	0,640 ± 0,119	a 0,1530 ± 0,0357	b 5	Colônias com coloração modificada
	150	2,5 ± 0,577	0,083 ± 0,041	b 0,0838 ± 0,0543	c 4	Colônias com coloração modificada
	200*	-	-	-		-

Tabela 3: Continuação

Isolado	Lítio (mg L ⁻¹)	Fase lag (dias)	Taxa de crescimento (cm dia ⁻¹)	Massa seca (g)	N	Alterações nas características culturais			
UFV 73	Controle	1,750 ± 0,500	0,392 ± 0,014	a	0,0715 ± 0,0034	a	5	-	
	50	2,500 ± 0,548	0,205 ± 0,026	b	0,0383 ± 0,0017	b	6	sm	
	100*	-	-	-	-	-	-	-	
He 01	Controle	4,167 ± 0,753	b	0,680 ± 0,128	a	0,1187 ± 0,0311	a	6	-
	50	20,333 ± 1,033	a	0,028 ± 0,002	b	0,0148 ± 0,0066	b	5	sm
	100*	-	-	-	-	-	-	-	
Ly 01	Controle	4,333 ± 0,516	b	0,587 ± 0,071	a	0,1653 ± 0,0338	a	6	-
	50	19,5 ± 0,548	a	0,100 ± 0,044	b	0,0350 ± 0,0219	b	5	Colônias bem finas
	100*	-	-	-	-	-	-	-	
GF	Controle	4,333 ± 0,516	b	0,227 ± 0,015	a	0,1522 ± 0,0622	a	6	-
	50	5 ± 0,632	b	0,211 ± 0,031	a	0,1713 ± 0,0452	a	6	sm
	100	12,5 ± 2,52	a	0,079 ± 0,024	b	0,0600 ± 0,0197	b	4	sm
	150*	-	-	-	-	-	-	-	

Tabela 3: Continuação

Isolado	Lítio (mg L ⁻¹)	Fase lag (dias)	Taxa de crescimento (cm dia ⁻¹)	Massa seca (g)	N	Alterações nas características culturais			
GF-JP	Controle	2,5 ± 0,548	b	0,281 ± 0,045	a	0,0671 ± 0,0144	a	6	-
	50	2,333 ± 0,516	b	0,244 ± 0,027	a	0,0715 ± 0,0066	a	6	sm
	100	4,5 ± 1,291	a	0,139 ± 0,018	b	0,0232 ± 0,0091	b	5	sm
	150*	-	-	-	-	-	-	-	-
PLE 04	Controle	1,8 ± 0,447		0,578 ± 0,047	a	0,2250 ± 0,0519	a	5	-
	50	1,833 ± 0,408		0,451 ± 0,031	b	0,1892 ± 0,0367	a	6	sm
	100	2 ± 0,00		0,443 ± 0,022	b	0,1038 ± 0,0162	b	5	Modificação na coloração do meio
	150	2 ± 0,00		0,238 ± 0,010	c	0,0362 ± 0,0115	c	5	Modificação na coloração do meio
	200*	-	-	-	-	-	-	-	-

Médias seguidas de letras iguais, para cada estirpe, não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), *Pleurotus ostreatus* (PLO 6) e *Pleurotus ostreatusroseus* (PLO 13), *Pleurotus citrinopiliatus* (PLO A), *Grifolla* sp. (GF), *Grifolla* sp. (GF-JP), *Ganoderma* sp. (GR 117), *Pleurotus erynki* (PLE 04), *Hericium herinaceum* (He 01), *Pholiota nameko* (PH 01), *Lyophilium shimeji* (Ly 01) e *Lentinula edodes* (UFV 73). sm- sem modificação

* Concentração mínima de lítio capaz de inibir o desenvolvimento micelial.

Tabela 4: pH, potencial redox (mV), fase lag, taxa de crescimento (cm dia⁻¹), massa seca, número de repetições (N) e alterações nas características culturais das colônias de 5 espécies de basidiomicetos que conseguiram crescer em meios de cultura adicionados com diferentes formas de lítio (valores expressos como média ± desvio padrão).

Isolado	Lítio (mg L ⁻¹)	Tipo de lítio	pH	mV	Fase lag (dias)		Taxa de crescimento (cm dias ⁻¹)		Massa seca (g)	N	Alterações nas características culturais
PLO 06	Controle	-	5.5	360,8	1,571 ± 0,535	c	0,795 ± 0,074	a	0,5120 ± 0,0599	a 7	-
	270	LiCl	5.8	348,8	3 ± 0,00	b	0,027 ± 0,007	c	0,0881 ± 0,0177	c 6	sm
	270	CH ₃ COOLi	6.4	267,5	13,20 ± 0,837	a	0,037 ± 0,009	c	0,0092 ± 0,0011	d 5	*
	270	LiSO ₄	5.8	342,7	1,6 ± 0,548	c	0,067 ± 0,010	b	0,1355 ± 0,0427	b 5	Colônias muito densas, com coloração modificada e modificação coloração do meio
PLO 13	Controle	-	5.5	360,8	1,571 ± 0,535	c	0,636 ± 0,037	a	0,2054 ± 0,0398	a 7	-
	270	LiCl	5.8	348,8	2,167 ± 0,408	b	0,604 ± 0,104	a	0,1427 ± 0,0411	a 6	sm
	270	CH ₃ COOLi	6.4	267,5	4,0 ± 1,871	a	0,392 ± 0,048	b	0,2118 ± 0,0610	a 5	Colônias com coloração modificada
	270	LiSO ₄	5.8	342,7	1,20 ± 0,447	c	0,360 ± 0,029	b	0,2714 ± 0,1218	a 5	sm
	270	LiF	5.7	338,9	3,25 ± 1,5	ab	0,109 ± 0,046	c	0,075 ± 0,0417	b 4	Colônias com coloração modificada
	270	LiH	9.2	-225	1,20 ± 0,447	c	0,423 ± 0,018	b	0,1596 ± 0,0514	a 5	sm

Tabela 4: Continuação

Isolado	Lítio (mg L ⁻¹)	Tipo de lítio	pH	mV	Fase lag (dias)		Taxa de crescimento (cm dias ⁻¹)		Massa seca (g)	N	Alterações nas características culturais
GR 117	Controle	-	5.5	360,8	1,714 ± 0,488	c	0,549 ± 0,069	a	0,2596 ± 0,0349	a 7	-
	200	LiCl	5.8	338,1	-		-		-	6	sm
	200	CH ₃ COOLi	6.2	279,7	4,400 ± 0,548	b	0,038 ± 0,010	b	0,003 ± 0,001	d 5	sm
	200	LiSO ₄	5.8	355,3	4,000 ± 0,632	b	0,061 ± 0,013	b	0,0233 ± 0,006	b 6	Colônias com coloração modificada
	200	LiH	8.5	-225	26,600 ± 2,410	a	0,052 ± 0,024	b	0,060 ± 0,017	c 5	sm
PLO A	Controle	-	5.5	360,8	1,667 ± 0,516	b	0,571 ± 0,064	a	0,306 ± 0,0702	a 6	-
	200	LiCl	5.8	338,1	-		-		-	6	sm
	200	CH ₃ COOLi	6.2	279,7	6,8 ± 3,42	a	0,021 ± 0,012	c	0,058 ± 0,0183	c 5	*
	200	LiSO ₄	5.8	355,3	1,4 ± 0,548	b	0,207 ± 0,021	b	0,0107 ± 0,0031	b 5	Colônias com coloração modificada e muito finas
PLE 04	Controle	-	5.5	360,8	1,8 ± 0,447	b	0,578 ± 0,047	a	0,2250 ± 0,0519	a 5	-
	200	LiCl	5.8	338,1	-		-		-	5	sm
	200	LiSO ₄	5.8	355,3	3,66 ± 0,577	a	0,197 ± 0,054	b	0,0189 ± 0,0069	b 3	sm

Médias seguidas de letras iguais, para cada estirpe, não diferem significativamente pelo teste de Tukey (p<0,05). *Pleurotus ostreatus* (PLO 6) e *Pleurotus ostreatusroseus* (PLO 13), *Pleurotus citrinopiliatus*(PLO A), *Ganoderma* sp. (GR 117) e *Pleurotus erynki* (PLE 04)

* Tamanho da colônia muito pequeno, inviabilizando a determinação de mudanças morfológicas. (sm) sem modificação (-) sem crescimento

** Tipos de lítio não demonstrados inibiram o desenvolvimento micelial

3.3. Velocidade de crescimento

Com exceção do PH 01, a adição das formas de lítio no meio reduziu a velocidade de crescimento de todos os fungos, de tal maneira, que os fungos Ly 01, UFV 73, He 01, GF, GF-JP tiveram o seu crescimento inibido por LiF, Li_2SO_4 , LiH, Li_2CO_3 e CH_3COOLi . O Li_2CO_3 inibiu o crescimento de todos os fungos testados e apenas o PLO 13 cresceu na presença de LiF (Tabela 4).

O crescimento da maioria dos fungos avaliados reduziu a partir de 100 mg L^{-1} de lítio (LiCl) (Tabela 3). As menores taxas de crescimento foram observadas com a adição de 200 mg L^{-1} de lítio (CH_3COOLi), contudo, outras formas de lítio nessa concentração já inibiram o crescimento dos fungos (Tabela 4).

3.4. Produção de biomassa fúngica

A produção de biomassa micelial pelos fungos avaliados diminuiu à medida que se aumentou a concentração de LiCl no meio de cultura (Tabela 3) e na presença de 200 e 270 mg L^{-1} de diferentes compostos contendo lítio (Tabela 4). Exceção foi observada quando *P. ostreatusroseus* (PLO 13) e *P. nameko* (PH 01) foram cultivados na presença de LiCl e a produção de biomassa manteve-se inalterada (Tabela 3).

3.5. Distância entre os septos

A influência da concentração e das formas de lítio na distância entre septos variou entre os fungos estudados (Tabela 5 e 6). Porém, a maioria não foi afetada. A modificação na concentração de LiCl demonstrou ser mais relevante que as diferentes formas de lítio para alterar a distância entre os septos.

3.6. Diâmetro das hifas

Para a maioria dos fungos testados a concentração de lítio e as formas de lítio afetaram o diâmetro das hifas (Tabela 5 e 6). Entre os fungos que conseguiram crescer em outras fontes de lítio, o enriquecimento com Li_2SO_4 foi o que mais provocou alteração no diâmetro das hifas (Tabela 6).

Tabela 5: Distância entre septos e diâmetro das hifas de 11 espécies de basidiomicetos em meios de cultura adicionados com diferentes concentrações de LiCl (valores expressos como média \pm desvio padrão).

Isolado	Lítio (mg L ⁻¹)	Distância entre septos (μ m)		Diâmetro das hifas (μ m)	
PH 01	0	61,77 \pm 10,68	b	1,952 \pm 0,3709	b
	50**	62,80 \pm 15,57	b	2,1967 \pm 0,3399	b
	100	63,12 \pm 10,73	b	2,0818 \pm 0,408	b
	150	72,51 \pm 25,08	ab	2,326 \pm 0,589	b
	200	81,32 \pm 29,67	a	3,569 \pm 0,800	a
	270	68,47 \pm 22,71	ab	3,672 \pm 0,565	a
PLO 06	0	65,44 \pm 16,85	ab	3,348 \pm 0,892	a
	50	57,89 \pm 15,90	b	2,793 \pm 0,395	b
	100	66,13 \pm 17,65	ab	2,651 \pm 0,877	bc
	150	62,96 \pm 17,51	ab	2,607 \pm 0,711	bc
	200	60,34 \pm 18,05	b	2,191 \pm 0,585	c
	270	76,59 \pm 32,72	a	2,963 \pm 0,3953	ab
PLO 13	0	69,96 \pm 28,44		4,527 \pm 1,637	a
	50	59,97 \pm 23,25		3,449 \pm 1,007	b
	100	64,91 \pm 29,58		3,147 \pm 0,612	b
	150	66,77 \pm 33,64		3,068 \pm 1,131	b
	200	67,52 \pm 31,93		3,362 \pm 0,988	b
	270	66,18 \pm 23,16		3,546 \pm 0,929	b
GR 117	0	64,64 \pm 13,97	b	3,456 \pm 1,013	
	50	60,15 \pm 19,24	b	3,121 \pm 0,773	
	150	77,04 \pm 20,48	a	3,111 \pm 0,566	
	200*	-		-	
PLO A	0	68,26 \pm 29,81		3,968 \pm 1,305	a
	50	59,46 \pm 21,85		3,646 \pm 1,624	ab
	100	65,84 \pm 17,74		3,282 \pm 0,543	ab
	150**	67,58 \pm 16,73		2,8162 \pm 0,382	b
	200*	-		-	
UFV 73	0	85,64 \pm 23,70		2,1604 \pm 0,3148	
	50	96,90 \pm 28,32		2,2382 \pm 0,5283	
	100*	-		-	
He 01	0	77,46 \pm 29,81	a	2,978 \pm 0,710	
	50	58,08 \pm 15,96	b	2,710 \pm 0,659	
	100*	-		-	

Tabela 5: Continuação

Isolado	Lítio (mg L ⁻¹)	Distância entre septos (µm)		Diâmetro das hifas (µm)	
Ly 01	0	93,02 ± 30,98		2,941 ± 0,790	
	50	98,03 ± 33,59		2,636 ± 0,590	
	100*	-		-	
GF	0	101,15 ± 29,81	a	2,5864 ± 0,3947	
	50	90,10 ± 23,77	ab	2,783 ± 0,581	
	100	81,72 ± 21,73	b	2,782 ± 0,640	
	150*	-		-	
GF-JP	0	79,14 ± 22,84		3,446 ± 0,688	a
	50	90,03 ± 21,92		2,849 ± 0,555	b
	100	90,48 ± 26,60		2,8804 ± 0,4833	b
	150*	-		-	
PLE 04	0	86,56 ± 21,55	b	1,9721 ± 0,3991	
	50	83,93 ± 30,43	b	2,496 ± 0,770	
	100	110,07 ± 25,71	a	2,663 ± 0,680	
	150	86,50 ± 29,01	b	3,458 ± 0,855	
	200*	-		-	

Médias seguidas de letras iguais, para cada estirpe, não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). *Pleurotus ostreatus* (PLO 6) e *Pleurotus ostreatusroseus* (PLO 13), *Pleurotus citrinopiliatus* (PLO A), *Grifolla* sp. (GF), *Grifolla* sp. (GF-JP), *Ganoderma* sp. (GR 117), *Pleurotus erynki* (PLE 04), *Hericiium herinaceum* (He 01), *Pholiota nameko* (PH 01), *Lyophyllum shimeji* (Ly 01) e *Lentinula edodes* (UFV 73)

n= 28

* Concentração mínima de lítio capaz de inibir o desenvolvimento micelial.

** n= 21

Tabela 6: Distância entre septos e diâmetro das hifas de 5 espécies de basidiomicetos que conseguiram crescer em meios de cultura adicionados com diferentes formas de lítio (valores expressos como média \pm desvio padrão).

Isolado	Lítio (mg L ⁻¹)	Tratamento***	Distância entre septos (μ m)		Diâmetro das hifas (μ m)	
PLO 06	0	-	65,44 \pm 16,85	ab	3,348 \pm 0,892	a
	270	LiCl	76,59 \pm 32,72	ab	2,963 \pm 0,395	ab
	270	CH ₃ COOLi	82,43 \pm 30,94	a	3,403 \pm 0,626	a
	270	LiSO ₄	60,40 \pm 12,57	b	2,856 \pm 0,532	b
PLO 13	0	-	69,96 \pm 28,44		4,527 \pm 1,637	a
	270	LiCl	66,18 \pm 23,16		3,546 \pm 0,929	b
	270	CH ₃ COOLi	70,23 \pm 23,33		3,534 \pm 0,927	b
	270	LiSO ₄	57,54 \pm 16,57		2,565 \pm 0,415	c
	270	LiH	68,09 \pm 19,94		2,394 \pm 0,395	c
	270	LiF	67,76 \pm 25,68		3,014 \pm 0,512	bc
GR 117	0	-	64,64 \pm 13,97		3,456 \pm 1,013	bc
	200**	LiCl	-		-	
	200	CH ₃ COOLi	63,90 \pm 15,20		4,581 \pm 1,026	a
	200	LiSO ₄	64,85 \pm 24,34		2,991 \pm 0,566	c
	200	LiH	77,40 \pm 31,73		3,65 \pm 0,734	b
PLO A	0	-	68,26 \pm 29,81		3,968 \pm 1,305	a
	200**	LiCl	-		-	
	200	CH ₃ COOLi	71,52 \pm 21,06		3,499 \pm 0,602	a
	200	LiSO ₄	84,94 \pm 27,70		2,8 \pm 0,819	b
PLE 04	0	-	86,56 \pm 21,55	a	1,9721 \pm 0,3991	b
	200**	LiCl	-		-	
	200 *	LiSO ₄	58,49 \pm 17,30	b	2,87 \pm 0,623	a

Médias seguidas de letras iguais, para cada estirpe, não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). *Pleurotus ostreatus* (PLO 6) e *Pleurotus ostreatusroseus* (PLO 13), *Pleurotus citrinopiliatus* (PLO A), *Ganoderma* sp. (GR 117) e *Pleurotus erynki* (PLE 04) n = 28,

* n= 21,

** sem crescimento

*** Tipos de lítio não demonstrados inibiram o desenvolvimento micelial

3.7. Morfologia

Os fungos PH 01, PLO 6, PLO A, Ly 01, PLE 04, GR 117 e PLO 13 apresentaram alterações em uma ou mais características morfológicas avaliadas (Figuras 1, 2 e 3). Os fungos que não apresentaram alterações tiveram o crescimento inibido a partir da adição de 100 mg L^{-1} de Li (LiCl) no meio de cultura. Dentre as alterações, as mais comuns foram modificações na coloração e na espessura das colônias.

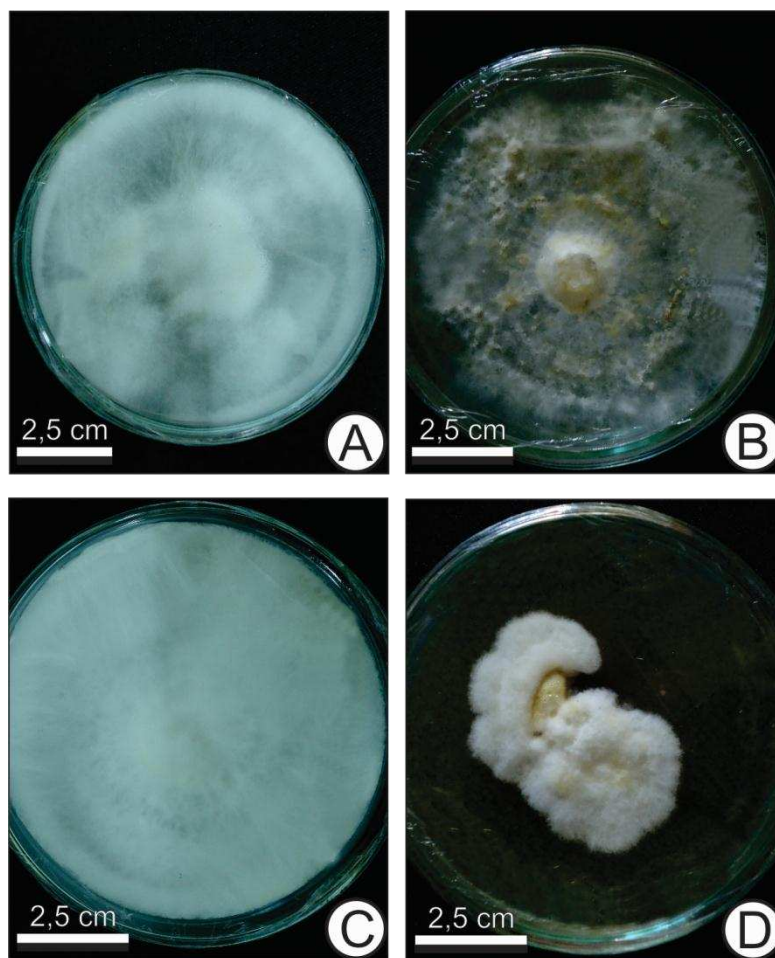


Figura 1: Características culturais e morfológicas de colônias dos isolados fúngicos submetidos a diferentes concentrações de LiCl em meio de cultura BDA: (A) *P. citrinopiliatus* em meio sem lítio, (B) *P. citrinopiliatus* em meio enriquecidos com 150 mg L^{-1} de Li; (C) *P. ostreatus* em meio sem lítio, (D) *P. ostreatus* em meio enriquecido com 270 mg L^{-1} de Li,

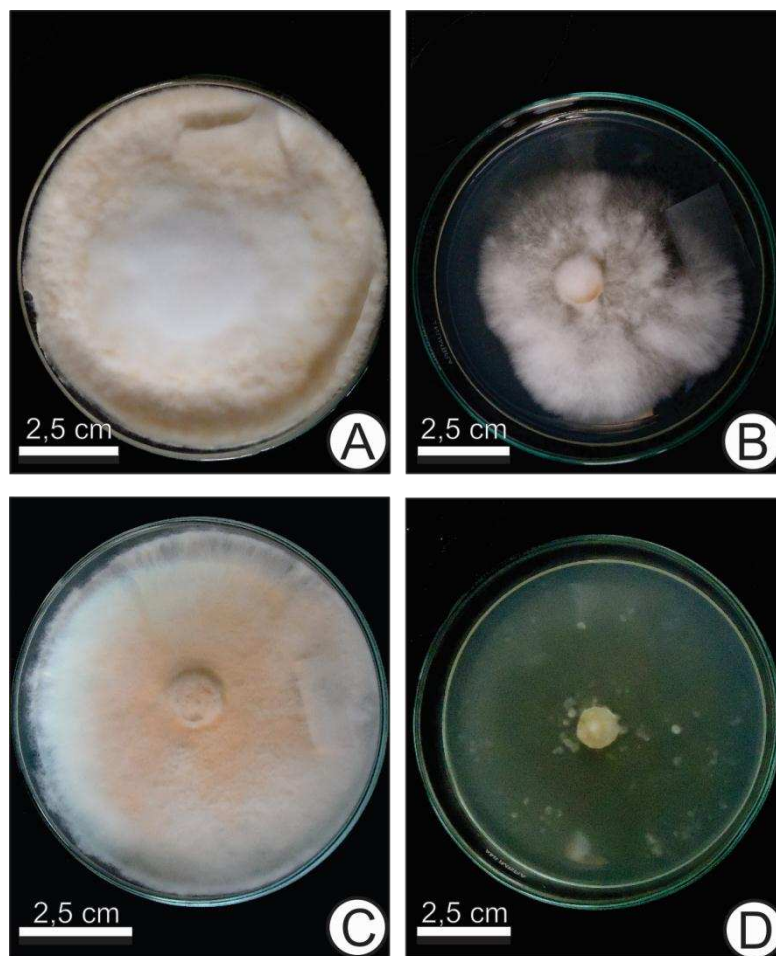


Figura 2: Características culturais e morfológicas de colônias dos isolados fúngicos submetidos a diferentes concentrações de LiCl em meio de cultura BDA: (A) *Lyophillum shimeji* em meio sem lítio, (B) *Lyophillum shimeji* em meio enriquecido com 50 mg L^{-1} de Li, (C) *Pholiota nameko* em meio sem lítio, (D) *Pholiota nameko* em meio enriquecido com 270 mg L^{-1} de Li.

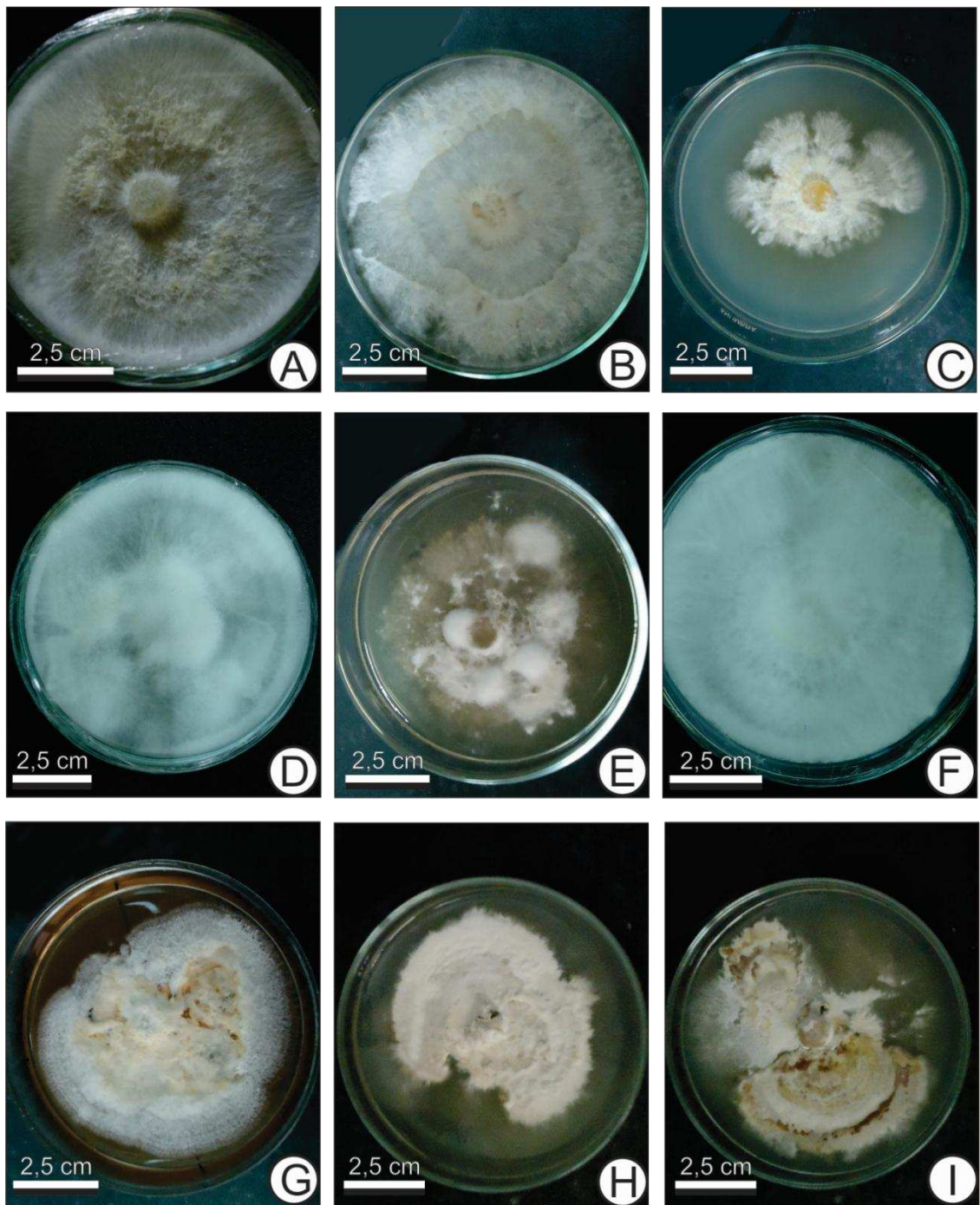


Figura 3: Morfologia das colônias de basidiomicetos submetidos a diferentes concentrações e formas de lítio: (A) *P. ostreatusroseus* em meio sem lítio, (B) *P. ostreatusroseus* em meio enriquecido com 270 mg L^{-1} de Li (CH_3COOLi), (C) *P. ostreatusroseus* em meio enriquecido com 270 mg L^{-1} de Li (LiF), (D) *P. citrinopiliatus* em meio sem lítio, (E) *P. citrinopiliatus* em meio enriquecido com 200 mg L^{-1} de Li (Li_2SO_4), (F) *P. ostreatus* em meio sem lítio, (G) *P. ostreatus* em meio enriquecido com 270 mg L^{-1} de Li (Li_2SO_4), (H) *Ganoderma* sp em meio sem lítio, (I) *Ganoderma* sp em meio enriquecido com 200 mg L^{-1} de Li (Li_2SO_4).

4- DISCUSSÃO

4.1. pH e potencial redox (E_h) dos meios de cultura

Devido ao fato do pH mais favorável para o desenvolvimento da maioria dos fungos esteja entre 5 e 7, o aumento do pH extracelular pode inibir o crescimento dos mesmos (Madigan et al., 2008). Em nosso estudo, as formas de lítio que promoveram os maiores aumentos do pH do meio de cultura foram LiH e Li_2CO_3 , sendo que estas formas foram as que mais inibiram o crescimento dos fungos. Nenhum fungo foi capaz de crescer na presença de Li_2CO_3 e apenas o PLO 13 cresceu na presença de LiH. Yamanaka (2003) observou que alguns fungos são capazes de diminuir o pH do meio de cultura durante o crescimento. Por exemplo, *Pleurotus tuber-regium* foi capaz de reduzir o pH do seu meio de cultura de 6,2 para 4,0 (Jonathan et al., 2008). Um mecanismo que explicaria essas observações é a extrusão de ácidos orgânicos por fungos (Scervino et al., 2011). Também existem alguns mecanismos que eucariotos utilizam para acidificar o pH citoplasmático quando ocorre perda de H^+ para o meio externo, sendo que isto pode acontecer quando o pH externo está mais alto que o interno (Casey et al., 2010). Posteriores estudos devem ser realizados para determinar quais mecanismos o PLO 13 utiliza para sustentar o crescimento no meio de cultura enriquecido com LiH.

O potencial redox (E_h) do meio é um dos parâmetros que afeta o crescimento de microrganismos. Entretanto, quando existe fornecimento constante de oxigênio, alguns microrganismos aeróbios são capazes de crescer em E_h adversos (Tabatabai e Walker, 1970). Por exemplo, *Pseudomonas fluorescens* é capaz de crescer em meio de cultura com E_h inicial de -40 mV em baixas tensões de oxigênio (Tabatabai e Walker, 1970). Em nosso estudo apenas o PLO 13 foi capaz de crescer em meio de cultura enriquecido com formas de lítio com E_h inicial menor que -200 mV. Provavelmente, este isolado apresenta alguma característica metabólica que permite seu desenvolvimento neste tipo de ambiente. É importante ressaltar que o sistema de cultivo em placas de Petri utilizado em nosso estudo permite constante fornecimento de oxigênio. O oxigênio é capaz de oxidar o meio de cultura e, conseqüentemente, elevar o (E_h) do meio. Neste estudo o oxigênio atmosférico foi capaz de elevar o (E_h) do meio de cultura enriquecido

com LiH de -224,7 mV para 52,9 mV. Portanto, constata-se que o *P. ostreatusroseus* é uma espécie de fungo capaz de crescer em ambientes com baixo (E_h) quando existe fornecimento constante de oxigênio.

Neste contexto, temos duas conclusões distintas. Primeiro, as formas de lítio que foram capazes de aumentar o pH e reduzir muito o (E_h) do meio de cultura não são aconselháveis para serem utilizadas no enriquecimento de cogumelos. Segundo, a espécie *P. ostreatusroseus* apresenta parâmetros de crescimento de pH e (E_h) mais flexíveis que outras espécies de basidiomicetos, portanto, deve ser um fungo adequado para produção de cogumelos enriquecidos com lítio utilizando-se várias formas de lítio.

4.2. Fase lag

Aumento da fase lag é comum quando microrganismos estão submetidos a condições de estresse (Swinnen et al., 2004; Yates e Smotzer, 2007). Neste estudo, o enriquecimento do meio de cultura com diferentes formas e concentrações de lítio provocou o aumento da fase lag na maioria dos fungos. Apesar da fase lag do UFV 73 não ter sido alterada, este fungo cresceu apenas na menor concentração de LiCl testada e não cresceu em nenhum dos meios de cultura enriquecidos com outras formas de lítio, o que demonstra a alta sensibilidade desse fungo ao lítio. O acetato de lítio aumentou a fase lag de todos os fungos que cresceram em meio enriquecido com essa forma de lítio. Como esta forma de lítio é um ácido orgânico, ela é capaz de transpor a membrana citoplasmática e alterar o pH interno das células dos fungos e, conseqüentemente, prejudicar diversas vias metabólicas (Cheung et al., 2010). Dessa forma, temos duas conclusões. Primeiro, as concentrações e formas de lítio que provocaram aumento elevado na fase lag não devem ser utilizadas para enriquecimento de cogumelos. Segundo, alguns fungos são sensíveis a lítio, por exemplo, Ly 01 e He 01, e não devem ser usados para produção de cogumelos enriquecidos com lítio.

4.3. Velocidade de crescimento e biomassa

Diferentes concentrações e formas de lítio afetam a velocidade de crescimento de basidiomicetos. Demonstramos que concentrações maiores que 100 mg L^{-1} de lítio (LiCl) prejudicam o crescimento de quase todos os basidiomicetos testados. Além disso, verificou-se que o CH_3COOLi , Li_2CO_3 e LiF inibiram ou reduziram muito a taxa de crescimento da maioria dos fungos. Estas informações têm importantes implicações para produção de cogumelos enriquecidos com lítio. A colonização do substrato pela biomassa micelial é uma etapa importante na produção de cogumelos. Altas taxas de crescimento micelial permitem colonização mais rápida do substrato e, portanto, diminuem a possibilidade de contaminação por outros microrganismos, visto que o desenvolvimento de contaminantes, que reduzem a produtividade, ocorre nos locais do substrato que não foram colonizados pelo micélio do fungo. A colonização mais rápida do substrato também permite a redução no tempo de incubação do substrato o que reduz a duração do ciclo de produção dos cogumelos. Portanto, o enriquecimento do substrato com concentrações maiores que 100 mg g^{-1} de lítio e com as formas de lítio CH_3COOLi , Li_2CO_3 e LiF , provavelmente, deve prejudicar a produtividade de cogumelos da maioria dos fungos testados neste estudo.

4.4. Alterações culturais e morfológicas das colônias e das hifas

Nosso estudo revelou que o enriquecimento com lítio afeta a morfologia de algumas espécies de basidiomicetos. Espécies do gênero *Pleurotus* são capazes, quando submetidas a diferentes condições de estresse, de alterar a morfologia das hifas e das colônias (Zhang e Cheung, 2011). Uma observação interessante foi o fato das alterações morfológicas só aparecerem após as reduções nas taxas de crescimento micelial. Portanto, modificações nas hifas e colônias só devem ocorrer quando os fungos forem submetidos a formas e concentrações estressoras de lítio. É importante ressaltar que a sensibilidade dos basidiomicetos às formas de lítio varia entre os fungos. Assim sendo, as concentrações e as formas de lítio que provocaram alterações nas hifas e nas colônias, para cada

fungo, não são aconselháveis para serem utilizadas para enriquecimento de cogumelos, pois provavelmente prejudicarão a produtividade de cogumelos.

Os fungos que suportaram as maiores concentrações de lítio foram o PLO 6, PLO 13 e PH 01. Entretanto, o PLO 6 apresentou reduções mais acentuadas nas taxas de crescimento e modificação na morfologia das hifas em concentrações mais baixas de LiCl quando comparado com as outras duas estirpes. O PLO 13 foi o fungo que teve as menores modificações morfológicas e conseguiu crescer em um maior número de meios enriquecidos com as diferentes formas de lítio, indicando que seja o fungo menos susceptível as formas de lítio e mais aconselhável para ser utilizado na produção de cogumelos enriquecidos com lítio.

O Li_2SO_4 e CH_3COOLi foram as formas de lítio que menos inibiram o crescimento das espécies basidiomicetos testadas. Entretanto, o enriquecimento com CH_3COOLi prejudicou mais o desenvolvimento dos fungos. Logo, o Li_2SO_4 é a forma de lítio mais aconselhável para ser utilizada no enriquecimento de cogumelos com lítio.

As concentrações de lítio que não prejudicaram o desenvolvimento dos fungos variam entre as estirpes. Mas, como o PLO 6, PLO 13 e PH 01 foram as espécies que suportaram maiores concentrações de LiCl, definiremos a faixa de concentração aconselhável para enriquecimento para essas três estirpes. O PLO 6 é o mais sensível a lítio entre as estirpes destacadas e deve suportar sem prejudicar o desenvolvimento micelial enriquecimento com 1 a 100 mg g^{-1} de lítio. O PH 01 deve suportar enriquecimento com 1 a 200 mg g^{-1} de lítio. O PLO 13, novamente, foi o fungo que teve o maior destaque e deve suportar enriquecimento com 1 a 270 mg g^{-1} de lítio sem afetar o desenvolvimento micelial.

Portanto, o Li_2SO_4 é a forma de lítio que menos prejudicou o desenvolvimento micelial e *P. ostreatusroseus* o fungo menos sensível às concentrações e formas de lítio testadas.

5- CONCLUSÕES

- As espécies *P. ostreatusroseus*, *P. ostreatus* e *P. nameko* são, dentre os basidiomicetos testados, os menos sensíveis ao lítio.
- O Li_2SO_4 é a forma de lítio menos prejudicial ao desenvolvimento micelial.
- A concentração de lítio que não prejudicam o desenvolvimento micelial é de até 100 mg g^{-1} de lítio para *P. ostreatus*, 200 mg g^{-1} de lítio para *P. nameko* e de 270 mg g^{-1} de lítio para *P. ostreatusroseus*.

6- REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- Aral, H. e Vecchio-Sadus, A. (2008). "Toxicity of lithium to humans and the environment--A literature review." **Ecotoxicology and Environmental Safety** 70: 349-356.
- Assunção, L. S. (2010). "Enriquecimento de cogumelos de *Pleurotus ostreatus* com ferro, zinco e lítio. ". *Departamento de Microbiologia Agrícola*. Viçosa. Universidade Federal de Viçosa. **Tese de mestrado**.
- Bayramoglu, G., Denizli, A., Bektas, S. e Arica, M. Y. (2002). "Entrapment of *Lentinus sajor-caju* into Ca-alginate gel beads for removal of Cd(II) ions from aqueous solution: Preparation and biosorption kinetics analysis." **Microchemical Journal** 72: 63-76.
- Casey, J. R., Grinstein, S. e Orlowski, J. (2010). "Sensors and regulators of intracellular pH." **Nature Review Molecular Cell Biology** 11: 50-61.
- Cheung, H. N. B., Huang, G. H. e Yu, H. (2010). "Microbial-growth inhibition during composting of food waste: Effects of organic acids." **Bioresource Technology** 101: 5925-5934.
- Cox, L. J., Dooley, D. e Beumer, R. (1990). "Effect of lithium chloride and other inhibitors on the growth of *Listeria* spp." **Food Microbiology** 7: 311-325.
- FAOSTAT (2010). Food and Agriculture Organization of The United Nations.
- Figlas, D., Oddera, M. e Curvetto, N. (2010). "Bioaccumulation and bioavailability of copper and zinc on mineral-enriched mycelium of *Grifola frondosa*." **Journal of Medicinal Food** 13: 469-475.
- Jonathan, S. G., Fasidi, I. O., Ajayi, A. O. e Adegeye, O. (2008). "Biodegradation of Nigerian wood wastes by *Pleurotus tuber-regium* (Fries) Singer." **Bioresource Technology** 99: 807-811.
- Madigan, M. T., M., M. J. e J., P. (2008). "Brock - Biology of Microorganisms". *12th Edition*
- Scervino, J. M., Papinutti, V. L., Godoy, M. S., Rodriguez, M. A., Della Monica, I., Recchi, M., Pettinari, M. J. e Godeas, A. M. (2011). "Medium pH, carbon and nitrogen concentrations modulate the phosphate solubilization

efficiency of *Penicillium purpurogenum* through organic acid production." **Journal of Applied Microbiology** 110: 1215-1223.

Silva, M. C. S., Naozuka, J., da Luz, J. M. R., de Assunção, L. S., Oliveira, P. V., Vanetti, M. C. D., Bazzolli, D. M. S. e Kasuya, M. C. M. (2012). "Enrichment of *Pleurotus ostreatus* mushrooms with selenium in coffee husks." **Food Chemistry** 131: 558-563.

Swinnen, I. A. M., Bernaerts, K., Dens, E. J. J., Geeraerd, A. H. e Van Impe, J. F. (2004). "Predictive modelling of the microbial lag phase: a review." **International Journal of Food Microbiology** 94: 137-159.

Tabatabai, L. B. e Walker, H. W. (1970). "Oxidation-reduction and growth of *Clostridium perfringens* and *Pseudomonas fluorescens*." **Applied and Environmental Microbiology** 20: 441-446.

Tyrrell, S. A., Rippey, S. R. e Watkins, W. D. (1995). "Inactivation of bacterial and viral indicators in secondary sewage effluents, using chlorine and ozone." **Water Research** 29: 2483-2490.

Umeda, K., Shiota, S., Futai, M. e Tsuchiya, T. (1984). "Inhibitory effect of Li⁺ on cell growth and pyruvate kinase activity of *Escherichia coli*." **Journal of Bacteriology** 160: 812-814.

Warburg, R. J., Moir, A. e Smith, D. A. (1985). "Influence of Alkali Metal Cations on the Germination of Spores of Wild-type and D Mutants of *Bacillus subtilis*." **Journal of General Microbiology** 131: 221-230.

Widmer, C. (1999). "Lithium Anreicherung von Pilze". *Eidgenossisches institut fur geistiges eingentum*. **CH 694 263 A5**. Germany

Wildman, H. G. (1991). "Lithium chloride as a selective inhibitor of *Trichoderma* species on soil isolation plates." **Mycological Research** 95: 1364-1368.

Yamanaka, T. (2003). "The effect of pH on the growth of saprotrophic and ectomycorrhizal ammonia fungi in vitro." **Mycologia** 95: 584-589.

Yates, G. T. e Smotzer, T. (2007). "On the lag phase and initial decline of microbial growth curves." **Journal of Theoretical Biology** 244: 511-517.

Zhang, B.-B. e Cheung, P. C. K. (2011). "A mechanistic study of the enhancing effect of Tween 80 on the mycelial growth and exopolysaccharide

production by *Pleurotus tuber-regium*." **Bioresource Technology** 102:
8323-8326.

CAPÍTULO 2: Enriquecimento de cogumelos com diferentes formas de lítio

RESUMO

O enriquecimento de cogumelos com lítio pode ser uma estratégia para aumentar o consumo humano diário desse elemento. Desenvolvimento de técnicas, procedimentos e metodologias que melhorem a eficiência do enriquecimento podem elevar o consumo cotidiano de lítio ou diminuir a quantidade necessária de ingestão habitual de cogumelos para alcançar o requerimento mínimo diário de lítio. Ficou demonstrado que a utilização de diferentes formas de lítio (Li_2SO_4 , LiCl , LiH , CH_3COOLi , LiF e Li_2CO_3) e um maior tempo de interação do micélio com esses compostos não altera a absorção de lítio pelo *P. ostreatus*. Entretanto, melhora a acumulação de Li em cogumelos de *P. ostreatusroseus*. Para ambos, o enriquecimento não prejudica a morfologia dos cogumelos e a produtividade. Nossos resultados indicam que mudanças nas características do substrato utilizado para produção de cogumelos (composição e parâmetros químicos) e no tempo de incubação dos substratos após colonização pelo fungo podem melhorar a eficiência do enriquecimento com lítio em algumas espécies de basidiomicetos.

ABSTRACT

The enrichment of mushrooms with lithium may be a strategy to increase the daily human consumption of this element. Development of techniques, procedures and methods that improve the efficiency of the enrichment can increase the daily intake of lithium or decrease the necessary amount of habitual intake of mushrooms to achieve the minimum daily requirement of lithium. We demonstrated that the use of different forms of lithium (Li_2SO_4 , LiCl , LiH , CH_3COOLi , LiF and Li_2CO_3) and a longer interaction of these compounds with the mycelium did not alter the absorption of lithium by *P. ostreatus*. However, this improved the Li accumulation in mushrooms of *P. ostreatusroseus*. For both, the enrichment did not impair the morphology and yield of mushrooms. Our results indicate that changes in the characteristics of the substrate used for mushroom production (composition and chemical parameters) and the incubation time of the substrates after colonization by the fungus can improve the efficiency of enrichment of lithium in some species of basidiomycetes.

1- INTRODUÇÃO

Os corpos de frutificação de basidiomicetos são capazes de absorverem e acumularem diversos metais que se encontram no ambiente, como, por exemplo, cobre, zinco e cádmio (Bayramoglu et al., 2002; Figlas et al., 2010). Devido à escassez de lítio, as concentrações que são encontradas desse metal em cogumelos são muito baixas, tanto que a variação encontrada na Hungria no gênero *Pleurotus* foi de apenas 0,044 a 0,208 ppm (Vetter, 2005). Logo, a quantidade necessária de consumo diário de cogumelos *Pleurotus* sp para suprir a necessidade humana diária de lítio seria enorme, o que obriga a busca e consumo de outros alimentos que contenham quantidades maiores de lítio na sua composição.

A concentração de lítio no meio influencia a concentração final deste elemento nos corpos de frutificação de diversas espécies, incluindo o gênero *Pleurotus* (Vetter 2005). O enriquecimento do substrato de cultivo de cogumelos de *P. ostreatus* com diferentes doses de cloreto de lítio mostrou que o acúmulo de lítio no corpo de frutificação foi diretamente proporcional as concentrações de cloreto de lítio adicionadas ao substrato (Assunção, 2010). A absorção de lítio pelos cogumelos enriquecidos foi até cinco vezes maiores se comparado com os cogumelos não enriquecidos, sem qualquer alteração na eficiência biológica (EB) e nas características morfológicas dos cogumelos (Assunção, 2010).

Fatores como tempo, concentração, composição e características químicas do meio influenciam na absorção de metais pelos fungos (Dey et al., 1995; Cihangir e Saglam, 1999; Gabriel et al., 2001; Figlas et al., 2010). Demostramos que o tempo de incubação e diferentes formas de lítio influenciam a absorção de lítio pelo *P. ostreatusroseus*, que as formas de lítio, nas concentrações testadas, não afetam a EB e a morfologia dos cogumelos e que o *P. ostreatusroseus* absorve maior quantidade de lítio que o *P. ostreatus*. A concentração de lítio no cogumelo enriquecido de *P. ostreatus* e *P. ostreatusroseus* foi até 107 e 121 vezes, respectivamente, maior que os cogumelos não enriquecidos.

Compostos de lítio são utilizados na medicina há muitos anos como “estabilizador de humor”. O principal benefício do lítio é a capacidade de controlar o humor de pessoas que sofrem de transtornos psiquiátricos (Baldessarini et al., 1999). Estudos relacionam que estas pessoas são mais

propensas a realizarem atos violentos, por exemplo, homicídios (Asnis et al., 1997; Sturup et al., 2011). Schrauzer e Shrestha (1990) observaram que a ocorrência de suicídios, homicídios e estupro eram maiores em países que continham pouco ou nenhum lítio nos suprimentos de água potável. Severo (2009) constatou que a concentração de lítio no sangue afeta o número de episódios depressivos de pacientes que sofrem de transtorno bipolar. Portanto, a ingestão de alimentos que contenham concentração elevadas de lítio deve auxiliar no tratamento de transtornos psiquiátricos, principalmente o transtorno bipolar, porém deve-se atentar que o consumo de lítio em grandes quantidades pode ser tóxico.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a absorção de lítio nos cogumelos quando cultivados em substratos enriquecidos com diferentes formas de lítio em diferentes tempo de interação entre o micélio e o substrato .

2- MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Micro-organismos e condições de cultivo

Foram utilizados os isolados de *P. ostreatus* (PLO 6) e *P. ostreatusroseus* (PLO 13), pertencentes à coleção de fungos do Laboratório de Associações Micorrízicas do Departamento de Microbiologia da UFV/BIOAGRO. O fungo *Pholiota nameko* não foi utilizado devido à falta de infraestrutura adequada para induzir a frutificação. Para reativação das culturas, amostras de micélio de ambos os isolados foram transferidos para o centro de uma placa de Petri contendo BDA (Batata Dextrose Agar). Após sete dias, os fungos foram transferidos para substratos à base de grãos de arroz, previamente cozidos e autoclavados a 121 °C por 70 min. Após colonização total dos grãos de arroz os mesmos foram utilizados como inóculo.

2.2. Substratos e condições de enriquecimento com lítio

O substrato utilizado para o enriquecimento com lítio foi uma mistura contendo 67,5 % de serragem, 12 % de farelo de soja, 3,5% de carbonato de cálcio, 17 % de folhas de bananeira. Amostras de 400 g de substrato foram acondicionadas em sacos de polipropileno contendo filtro para trocas gasosas, acrescidas de 50 mL das seguintes soluções aquosas, de forma que a concentração de lítio no substrato de todas as unidades experimentais fosse 62,5 mg kg⁻¹: a) água de torneira b) 1179,24 mg L⁻¹ de sulfato de lítio (Li₂SO₄, Sigma) c) 910,74 mg L⁻¹ de cloreto de lítio (LiCl, Sigma) d) 2186,58 mg L⁻¹ de acetato de lítio (CH₃COOLi, Sigma) e) 903,61 mg L⁻¹ de hidreto de lítio (LiH, Vetec) f) 557,20 mg L⁻¹ de fluoreto de lítio (LiF, Vetec) g) 793,23 mg L⁻¹ de carbonato de lítio (Li₂CO₃, Vetec) e autoclavadas a 121 °C durante 70 min. Após resfriamento, cada saco foi inoculado com 20 g de inóculo de PLO 6 ou PLO 13 e incubados a 25 °C até colonização completa do substrato. Após a finalização da colonização, os pacotes foram transferidos para a sala de frutificação, com temperatura de 22 °C ± 2°C e umidade de 90 %, para induzir a formação de corpos de frutificação.

Foram realizadas três colheitas. Durante a primeira frutificação foram retiradas fotografias para análise das características morfológicas. Na primeira e

na terceira colheita foram retiradas amostras do substrato para quantificação do teor de lítio.

Após cada colheita foi determinada a massa fresca de cogumelos para avaliação da eficiência biológica (EB) pela seguinte fórmula:

$$EB = (\text{massa fresca dos cogumelos} / \text{massa seca do substrato}) \times 100$$

Posteriormente, as amostras dos cogumelos e dos substratos foram desidratadas em estufa a 60 °C até massa constante e moídos em moinhos, para posterior determinação do teor de lítio.

As taxas de absorção de lítio foram calculadas pela seguinte fórmula:

$$\text{Taxa} = (\text{concentração de lítio no cogumelo} / \text{concentração de lítio no substrato}) \times 100$$

2.3. Determinação das alterações morfológicas

As características morfológicas dos cogumelos analisadas foram: a) modificação no tamanho dos cogumelos b) modificação na coloração dos cogumelos c) modificação na espessura do píleo.

2.4. Quantificação do teor de lítio nos cogumelos

Para a determinação dos teores de lítio nos cogumelos, utilizou-se a metodologia de digestão em solução nitroperclórica (Tedesco et al., 1995). Amostras de 300 mg do cogumelo ou substrato, seco e moído, foram colocadas em tubo digestor e adicionadas com 10 mL de solução nitroperclórica na relação 3:1 (HNO₃ 65 %: HClO₄ 72 %). Em seguida, o tubo digestor foi inserido no bloco digestor, sendo aquecido gradualmente para evitar e/ou reduzir a formação de espuma, até que a temperatura atingisse 200 °C. A digestão foi mantida até que se obtivesse fumos brancos de HClO₄. Após resfriamento, o conteúdo dos tubos foi transferido para balão volumétrico de 10 mL contendo o volume completado com água (Milli-Q Millipore 18.2 MΩ cm⁻¹).

A determinação da concentração de lítio foi realizada no espectrofotômetro de absorção atômica Perkin-Elmer, M 1100B Atomic Absorption Spectrometer versão 6.1 (AAS). A curva padrão foi preparada com padrão de LiCl (High-Purity Standards, Charleston SC) de acordo com as

recomendações contidas no manual do espectrofotômetro de absorção atômica. As amostras foram analisadas no modo de absorção atômica, utilizando o comprimento de onda de 670,8 nm, chama Ar-Acetileno, sistema de injeção “Impactbead”, em duplicatas e com tempo de integração de 15 s.

2.5. Análise estatísticas

O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado com seis repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância e, posteriormente, as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

3- RESULTADOS

3.1. Eficiência biológica

Somente o sulfato de lítio adicionado ao substrato de cultivo do *P. ostreatusroseus* (PLO 13) teve efeito sobre a EB, proporcionando um aumento de aproximadamente 35 % (Tabelas 1 e 2).

3.2. Alterações morfológicas

O enriquecimento do substrato com diferentes formas de lítio não provocou alterações na coloração, tamanho e espessura do píleo nos cogumelos dos isolados estudados (Figuras 1).

3.3. Absorção de lítio

O enriquecimento com lítio, independente da fonte de lítio utilizado e do tempo de colheita, foi eficiente (Tabelas 3 e 4). A utilização de diferentes formas de lítio e o aumento do tempo de exposição do fungo PLO 6 a esses compostos não influenciaram a absorção de lítio pelos cogumelos (Tabela 3). No entanto, a absorção de lítio pelo fungo PLO 13 foi influenciada tanto pelo tempo de exposição como pelas formas de lítio utilizadas (Tabela 4). Foram encontradas diferenças na absorção das formas de lítio apenas na segunda frutificação, quando também foi observada as maiores taxas de absorção. O PLO 13 foi mais eficiente na absorção do lítio que o PLO 6 a partir da segunda frutificação (Tabelas 3 e 4).

A distribuição de lítio no substrato, independentemente das formas de lítio utilizadas, foi homogênea (Tabelas 5 e 6). Também foi possível certificar que durante todo o experimento houve disponibilidade de lítio para os fungos, porém dependendo do composto de lítio utilizado para o enriquecimento do substrato foi observado decréscimo da concentração durante o tempo (Tabela 6).

Tabela 1: Eficiência biológica em três frutificações consecutivas, e total, do fungo *Pleurotus ostreatusroseus* (PLO 13) em substratos adicionados com diferentes formas de lítio e o número de repetições contaminadas (valores expressos como média \pm desvio padrão).

Tratamentos	Produção de cogumelos (g)			Total (g)		Unidades experimentais contaminadas
	Primeira	Segunda	Terceira			
Controle	49,01 \pm 10,70	13,90 \pm 1,10	5,94 \pm 3,49	67,87 \pm 12,50	b	0
CH ₃ COOLi	57,05 \pm 2,61	21,54 \pm 10,21	5,07 \pm 1,97	83,66 \pm 7,46	b	0
Li ₂ CO ₃	55,03 \pm 7,98	21,87 \pm 8,31	6,91**	78,28 \pm 10,72	b	1*
LiF	54,09 \pm 5,46	16,89 \pm 6,30	7,19 \pm 3,94	75,77 \pm 15,45	b	0
LiH	46,90 \pm 8,05	21,71 \pm 7,67	9,84 \pm 4,32	76,48 \pm 14,98	b	1*
LiCl	56,25 \pm 17,64	19,57 \pm 7,18	7,87 \pm 1,83	82,40 \pm 26,10	b	0
Li ₂ SO ₄	69,68 \pm 12,01	24,87 \pm 5,44	10,23 \pm 3,32	104,79 \pm 6,10	a	3

N= 6

* Formaram cogumelos, porém menos que 10 g (considerando todas as frutificações).

** Apenas uma unidade experimental produziu cogumelos na terceira frutificação.

Tabela 2: Eficiência biológica em três frutificações consecutivas, e total, do fungo *Pleurotus ostreatus* (PLO 06) em substratos adicionados com diferentes formas de lítio e o número de repetições contaminadas (valores expressos como média \pm desvio padrão).

Tratamentos	Produção de cogumelos (g)			Total	Unidades experimentais contaminadas
	Primeira	Segunda	Terceira		
Controle	48,34 \pm 16,39	26,93 \pm 5,41	18,71 \pm 9,85	93,98 \pm 15,83	0
CH ₃ COOLi	59,55 \pm 7,20	27,89 \pm 12,40	13,99 \pm 7,67	101,43 \pm 11,21	0
Li ₂ CO ₃	63,30 \pm 21,63	29,32 \pm 17,37	25,34 \pm 9,20	113,74 \pm 14,88	0
LiF	64,15 \pm 9,59	17,46 \pm 13,58	18,83 \pm 11,72	97,30 \pm 19,96	0
LiH	65,52 \pm 2,271	27,23 \pm 4,16	13,46 \pm 5,41	106,21 \pm 5,34	0
LiCl	68,59 \pm 14,92	26,73 \pm 6,29	15,46 \pm 7,20	110,77 \pm 16,05	0
Li ₂ SO ₄	68,03 \pm 9,25	27,40 \pm 9,47	18,42 \pm 6,70	113,86 \pm 10,59	0

N=6

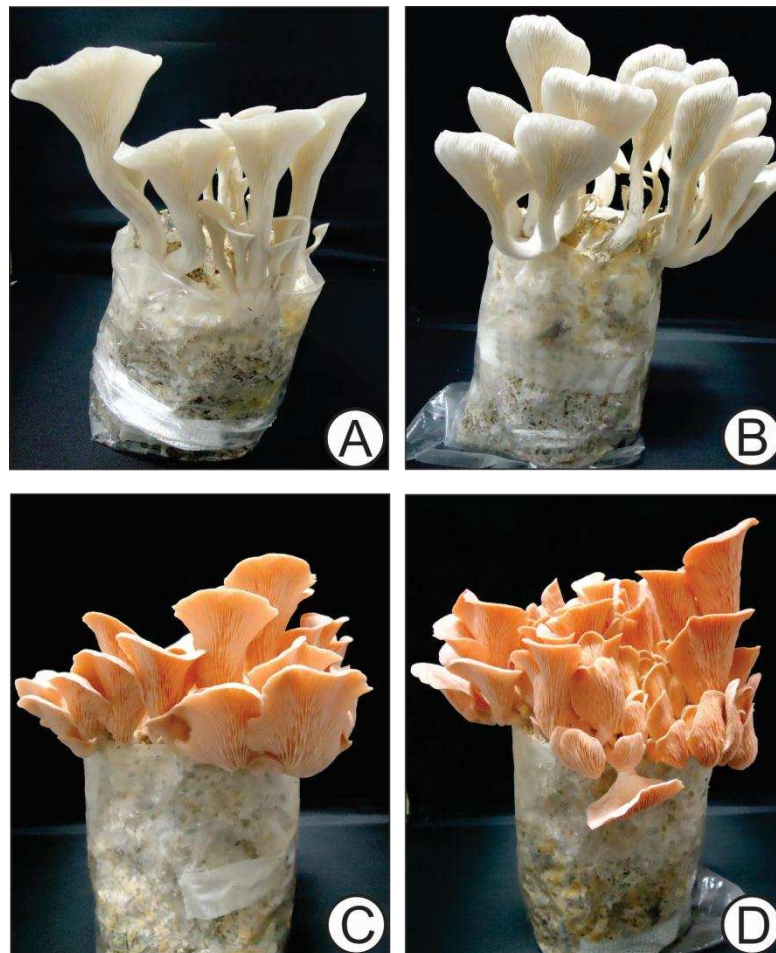


Figura 1: Cogumelos de *P. ostreatus* (PLO 6) e *P. ostreatusroseus* (PLO 13) em substratos sem lítio (A e C) e com $62,5 \text{ mg kg}^{-1}$ de lítio (B e D) adicionados na forma de LiCl.

Tabela 3: Concentração de lítio nos cogumelos de *P. ostreatus* (PLO 6) enriquecidos com diferentes formas de lítio durante as três primeiras frutificações e a porcentagem de lítio absorvido média das 3 frutificações (valores expressos como média \pm desvio padrão).

Tratamentos	Frutificação						Taxa de absorção (%) [*]
	1º		2º		3º		
	Concentração de lítio ($\mu\text{g g}^{-1}$)						
Controle	0,11 \pm 0,10	bB	0,20 \pm 0,15	bAB	0,39 \pm 7,55	bA	-
CH ₃ COOLi	5,89 \pm 1,90	a	7,70 \pm 3,67	a	9,33 \pm 3,82	a	15,87 \pm 8,17
Li ₂ CO ₃	4,59 \pm 1,28	a	4,35 \pm 2,30	a	5,35 \pm 2,18	a	10,10 \pm 4,88
LiF	4,13 \pm 2,10	a	3,86 \pm 1,96	a	5,35 \pm 1,70	a	11,03 \pm 6,13
LiH	6,31 \pm 3,77	a	8,86 \pm 1,20	a	11,82 \pm 5,93	a	17,39 \pm 10,85
LiCl	4,64 \pm 2,12	a	8,44 \pm 1,64	a	8,14 \pm 3,45	a	18,73 \pm 7,45
Li ₂ SO ₄	4,79 \pm 1,94	a	8,68 \pm 3,36	a	7,69 \pm 4,76	a	16,49 \pm 9,72

* (concentração de lítio no cogumelo/concentração de lítio no substrato) x 100

Médias seguidas de letras iguais minúsculas, nas colunas, e maiúsculas, nas linhas, não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). N= 6

Tabela 4: Concentração de lítio nos cogumelos de *P. ostreatusroseus* (PLO 13) enriquecidos com diferentes formas de lítio durante as três primeiras frutificações e a porcentagem de lítio absorvido (valores expressos como média \pm desvio padrão).

Tratamentos	Frutificação						Frutificação					
	1°		2°		3°		1°		2°		3°	
	Concentração de lítio ($\mu\text{g g}^{-1}$)						Taxa de absorção (%)					
Controle	0,33 \pm 0,33	b	0,44 \pm 0,30	c	0,48 \pm 0,28	b	-	-	-	-	-	-
CH ₃ COOLi	7,68 \pm 3,18	a	28,20 \pm 15,58	ab	29,07 \pm 20,77	a	14,41 \pm 8,28	a	63,00 \pm 43,52	bc	66,82 \pm 54,28	a
Li ₂ CO ₃	6,80 \pm 4,01	aB	39,99 \pm 5,84	aA	13,20 \pm 3,33	aB	16,04 \pm 11,79	a	94,19 \pm 43,37	a	31,09 \pm 15,58	b
LiF	8,35 \pm 4,75	aB	22,51 \pm 3,60	abA	16,64 \pm 2,18	aA	20,00 \pm 15,37	a	63,84 \pm 23,29	bc	47,19 \pm 16,72	ab
LiH	7,00 \pm 5,63	aB	26,17 \pm 9,69	abA	12,41 \pm 2,31	aB	14,00 \pm 12,28	a	87,79 \pm 49,61	ab	58,97 \pm 14,98	ab
LiCl	4,94 \pm 1,24	aB	25,14 \pm 10,25	abA	11,12 \pm 8,45	aB	18,36 \pm 15,11	a	86,02 \pm 67	ab	38,14 \pm 39,81	b
Li ₂ SO ₄	4,79 \pm 1,68	aB	16,72 \pm 5,17	bA	10,23 \pm 1,60	aAB	16,04 \pm 6,42	a	57,02 \pm 21,66	c	35,24 \pm 10,38	b

* (concentração de lítio no cogumelo/concentração de lítio no substrato) x 100

Médias seguidas de letras iguais minúsculas, nas colunas, e maiúsculas, nas linhas, não diferem significativamente pelo teste de Tukey (p<0,05).

N=6

Tabela 5: Concentração de lítio no substrato enriquecido com diferentes formas de lítio utilizado para crescimento do *P. ostreatus* (PLO 6) no início e no final do experimento (valores expressos como média \pm desvio padrão).

Tratamentos	Concentração de lítio ($\mu\text{g g}^{-1}$)	
	Início	Final
Controle	0,39 \pm 0,29 b	0,50 \pm 0,13 b
CH ₃ COOLi	58,30 \pm 21,01 a	44,45 \pm 8,45 a
Li ₂ CO ₃	56,21 \pm 15,08 a	40,42 \pm 16,11 a
LiF	44,18 \pm 12,72 a	33,86 \pm 4,54 a
LiH	64,56 \pm 18,71 aA	43,15 \pm 7,08 aB
LiCl	43,97 \pm 5,91 a	38,62 \pm 6,63 a
Li ₂ SO ₄	47,41 \pm 3,54 aA	40,92 \pm 5,36 aB

Médias seguidas de letras iguais minúsculas, nas colunas, e maiúsculas, nas linhas, não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Tabela 6: Concentração de lítio no substrato enriquecido com diferentes formas de lítio utilizado para crescimento do *P. ostreatusroseus* (PLO 13) no início e no final do experimento (valores expressos como média \pm desvio padrão).

Tratamentos	Concentração de lítio ($\mu\text{g g}^{-1}$)	
	Início	Final
Controle	0,93 \pm 0,67 b	0,51 \pm 0,11 b
CH ₃ COOLi	59,37 \pm 17,08 aA	33,63 \pm 10,55 aB
Li ₂ CO ₃	60,23 \pm 15,28 a	36,49 \pm 15,41 a
LiF	50,61 \pm 20,94 a	28,17 \pm 2,39 a
LiH	47,35 \pm 12,45 aA	21,72 \pm 4,32 aB
LiCl	32,26 \pm 21,77 a	41,79 \pm 13,45 a
Li ₂ SO ₄	32,10 \pm 9,82 a	30,73 \pm 6,22 a

Médias seguidas de letras iguais minúsculas, nas colunas, e maiúsculas, nas linhas, não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

4- DISCUSSÃO

4.1. Eficiência biológica

Compostos tóxicos podem alterar a morfologia de fungos (Verween et al., 2009). Entretanto, neste estudo, geralmente o enriquecimento de cogumelos com diferentes formas de lítio não afetou a EB, sendo que os valores encontrados em nosso estudo variaram de 67% a 113 %. Esses valores estão de acordo com o encontrado na literatura, onde se observa valores de EB variando de 18,9 a 115 % (Özçelik e Peksen, 2007; Loss et al., 2009; Jafarpour et al., 2010; Moonmoon et al., 2010).

O selênio, o lítio, o flúor e o cloro dependendo de suas concentrações podem ser tóxicos para animais, plantas, humanos e microrganismos (Lyons et al., 2005; Aral e Vecchio-Sadus, 2008; Verween et al., 2009; Fordyce, 2011). Silva et al (2012) ao enriquecerem *P.ostreatus* com diferentes concentrações de selenito de sódio observaram que o aumento de selênio no substrato afeta a EB. O cloreto de lítio, entretanto, não interferiu na EB (Assunção, 2010). Contudo é importante ressaltar que as concentrações utilizadas para enriquecimento foram bem menores se comparadas com a concentração utilizada neste estudo. A concentração de 62,5 mg g⁻¹ de lítio no substrato, a partir de diferentes formas de lítio, não afetou a EB, porém o enriquecimento com concentrações maiores desses compostos pode afetar a EB.

O enriquecimento com sulfato de lítio resultou em um aumento da EB do *P. ostreatusroseus*. Entretanto, este foi o tratamento que mais contaminou e que apresentou menores taxas de absorção. Dessa forma, o enriquecimento com sulfato de lítio, dependendo da concentração, não deve apresentar vantagens quando comparado com outras formas de lítio. Assim sendo, o enriquecimento de cogumelos com lítio, dependendo das concentrações utilizadas, pode ser realizado com compostos de lítio menos tóxicos, mais acessíveis ou mais baratos sem prejudicar a EB.

4.2 Alterações morfológicas

Chama atenção o fato do lítio, nas concentrações utilizadas neste trabalho, não ter alterado as características morfológicas do cogumelo, pois metais, metais pesados e compostos tóxicos são capazes, dependendo de sua concentração, de causar mudanças morfológicas nas estruturas reprodutivas dos basidiomicetos (Petr, 2003). Os cogumelos de *P. ostreatus* quando cultivados em substrato enriquecido com 12,8 mg kg⁻¹ ou quantidades maiores de selenito de sódio apresentaram alongação da estipe e diminuição do capsídeo (Silva et al., 2012). Apesar da concentração de 62,5 mg kg⁻¹ de lítio no substrato, a partir de diferentes formas de lítio, não ter sido suficiente para provocar alterações no cogumelos, devido ao caráter tóxico de algumas formas de lítio testadas, talvez o enriquecimento do substrato com concentrações maiores destes compostos podem modificar algumas características morfológicas dos cogumelos.

Deste modo, o enriquecimento do substrato para cultivo do fungo com as formas de lítio na concentração de até 62,50 mg kg⁻¹ de lítio pode ser recomendado, sem afetar a produtividade e a morfologia dos cogumelos.

4.3. Absorção de lítio

As concentrações de lítio encontradas nos cogumelos não enriquecidos estão de acordo com a literatura (Vetter, 2005). O tempo de exposição do micélio ao lítio e a adição de diferentes formas de lítio ao substrato afetam diferentemente a absorção desse elemento pelas espécies de *Pleurotus*, sugerindo que a capacidade de absorção de lítio deve variar em basidiomicetos. O fungo do gênero *Pleurotus* e outras espécies de basidiomicetos são capazes de absorver metais pesados e outros elementos, como por exemplo, cobre, cádmio, chumbo, cromo, níquel e até mesmo urânio (Nakajima e Sakaguchi, 1993; Dey et al., 1995; Cihangir e Saglam, 1999; Gabriel et al., 2001; Bayramoglu et al., 2002; Figlas et al., 2010). Esses trabalhos atentam para o fato de que fatores como temperatura, pH, tempo e composição do meio podem influenciar a absorção de elementos.

O tempo necessário para cada fungo atingir sua capacidade máxima de absorção de diversos metais varia muito, o que explica o fato do PLO 13 ter

apresentando variações nas taxas de absorção de lítio entre as frutificações e o PLO 6 não. Outro fator que pode ter influenciado as taxas de absorção do PLO 13 é a diminuição da disponibilidade de lítio durante o experimento. Dessa forma, um experimento com suplementação contínua de lítio deve ser realizado para determinar se a segunda frutificação é o tempo no qual ocorre a absorção máxima ou se taxas de absorção maior poderiam ser encontradas a partir da terceira frutificação.

A composição do meio é um dos fatores que influencia na absorção de vários elementos por basidiomicetos (Gabriel et al., 2001). As estruturas da parede celular têm influência na ligação do fungo com alguns elementos, como por exemplo, metais (Gabriel et al., 2001). Como a composição da parede celular é dependente da composição do meio, a adição de formas de lítio com diferentes grupamentos aniônicos pode ter afetado diretamente a composição da parede ou influenciado os processos que o fungo utiliza para captar o lítio, beneficiando ou prejudicando a absorção de lítio.

A biodisponibilidade dos metais é fundamental para absorção dos mesmos por microrganismos (Hund-Rinke e Kördel, 2003). Um dos fatores que pode afetar a biodisponibilidade de um metal é a modificação da força iônica ou composição do meio (Maria, 2000). Como as quantidades e os grupamentos aniônicos das formas de lítio utilizados para enriquecimento são diferentes, os mesmos afetam de forma distinta a força iônica e a composição do substrato. Logo a interação entre o lítio e o substrato pode ser maior ou menor o que afeta diretamente a absorção do lítio pelo micélio.

Mudanças no pH do meio ou substrato no qual se encontra o micro-organismo podem influenciar na absorção de elementos (Gabriel et al., 2001). O CH_3COOLi , LiH e Li_2CO_3 têm a capacidade de modificar o pH de soluções e substratos (Tabela 1, Capítulo 1), portanto a adição dos mesmos pode ter influenciado a absorção do lítio.

Portanto, o enriquecimento do substrato com até $62,50 \text{ mg kg}^{-1}$ de lítio, independente do composto de lítio usado, foi eficiente, possibilitando a produção de cogumelos de PLO 6 e PLO 13 com até $11,82 \text{ mg kg}^{-1}$ e $39,99 \text{ mg kg}^{-1}$ de lítio, respectivamente.

5- CONCLUSÕES

- A utilização de diferentes formas de lítio para enriquecimento do substrato com lítio na concentração de 62,5 mg kg⁻¹ influencia a absorção de lítio pelo *P. ostreatusroseus*, mas não influencia a absorção pelo *P. ostreatus*.
- Enriquecimento do substrato com lítio, independente do composto de lítio utilizado na concentração de 62,5 mg kg⁻¹ não influencia a eficiência biológica, nem alteram as características morfológicas dos cogumelos dos *P. ostreatus* e *P. ostreatusroseus*.
- O tempo de exposição do fungo *P. ostreatusroseus* às formas de lítio influencia a absorção de lítio.
- O fungo *P. ostreatusroseus* é um fungo com grande potencial para produção de cogumelos enriquecidos com lítio, visto que o mesmo acumulou até 39,99 mg kg⁻¹ de lítio no cogumelo.

6 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

Basidiomicetos são capazes de absorver e acumular diversos elementos do meio no qual se encontram, como por exemplo, o lítio. Recentes estudos vêm demonstrando que esta acumulação é diretamente proporcional à quantidade de lítio no meio. Entretanto, não existiam estudos sobre quais espécies de basidiomicetos eram mais sensíveis ao lítio. Por isto, realizamos estudos para determinar a concentração mínima inibitória de lítio para algumas espécies de cogumelos que são produzidas em escala industrial. Neste estudo *Pleurotus ostreatusroseus* foi o fungo de maior destaque sendo capaz de crescer em meio de cultura com concentrações de até 270 mg L⁻¹ de lítio sem prejudicar muito o seu desenvolvimento. Também determinamos que, dentre as diferentes formas de lítio testadas, o Li₂SO₄ foi a que menos prejudicou os fungos.

As espécies de basidiomicetos foram capazes de acumular grandes quantidades de lítio em seus corpos de frutificação sem prejudicar a eficiência biológica e características morfológicas dos mesmos. A quantidade acumulada é afetada pelo tempo de interação entre o micélio e o substrato enriquecido e o *Pleurotus ostreatusroseus* foi a espécie que acumulou a maior quantidade de lítio.

Futuros estudos devem ser realizados com o intuito de elucidar o local de acúmulo de lítio nos cogumelos, quais as vias metabólicas estão relacionadas com esta acumulação, quais são as moléculas responsáveis pela incorporação do lítio, dentre outros.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aral, H. e Vecchio-Sadus, A. (2008). "Toxicity of lithium to humans and the environment--A literature review." **Ecotoxicology and Environmental Safety** 70: 349-356.
- Asnis, G. M., Kaplan, M. L., Hundorfean, G. e Saeed, W. (1997). "Violence and homicidal behavior in psychiatric disorders " **Psychiatric Clinics of North America** 20: 405-425.
- Assunção, L. S. (2010). "Enriquecimento de cogumelos de *Pleurotus ostreatus* com ferro, zinco e lítio. ". *Departamento de Microbiologia Agrícola*. Viçosa. Universidade Federal de Viçosa. **Tese de mestrado**.
- Baldessarini, R., Tondo, L. e Hennen, J. (1999). "Effects of lithium treatment and its discontinuation on suicidal behavior in bipolar manic-depressive disorders." **Journal Clinical Psychiatry** 60: 77-84
- Bayramoglu, G., Denizli, A., Bektas, S. e Arica, M. Y. (2002). "Entrapment of *Lentinus sajor-caju* into Ca-alginate gel beads for removal of Cd(II) ions from aqueous solution: Preparation and biosorption kinetics analysis." **Microchemical Journal** 72: 63-76.
- Cihangir, N. e Saglam, N. (1999). "Removal of cadmium by *Pleurotus sajor-caju* basidiomycetes." **Acta Biotechnologica** 19: 171-177.
- Dey, S., Rao, P. R. N., Bhattacharyya, B. C. e Bandyopadhyay, M. (1995). "Sorption of heavy metals by four Basidiomycetous fungi." **Bioprocess Engineering** 12: 273-277.
- Figlas, D., Oddera, M. e Curvetto, N. (2010). "Bioaccumulation and bioavailability of copper and zinc on mineral-enriched mycelium of *Grifola frondosa*." **Journal of Medicinal Food** 13: 469-475.
- Fordyce, F. (2011). "Fluorine: Human Health Risks". Encyclopedia of Environmental Health. O. Nriagu Editor-in-Chief: Jerome. Burlington, **Elsevier**: 776-785.
- Gabriel, J., Baldrian, P., Hladíková, K. e Háková, M. (2001). "Copper sorption by native and modified pellets of wood-rotting basidiomycetes." **Letters in Applied Microbiology** 32: 194-198.

- Hund-Rinke, K. e Kördel, W. (2003). "Underlying issues in bioaccessibility and bioavailability:: experimental methods." **Ecotoxicology and Environmental Safety** 56: 52-62.
- Jafarpour, M., Zand, A. J., Dehdashtizadeh, B. e Eghbalsaied, S. (2010). "Evaluation of agricultural wastes and food supplements usage on growth characteristics of *Pleurotus ostreatus* " **African Journal of Agricultural Research** 5: 3291-3296.
- Loss, E., Royer, A. R., Barreto-Rodrigues, M. e Barana, A. C. (2009). "Use of maize wastewater for the cultivation of the *Pleurotus* spp. mushroom and optimization of its biological efficiency." **Journal of Hazardous Materials** 166: 1522-1525.
- Lyons, G. H., Stangoulis, J. C. R. e Graham, R. D. (2005). "Tolerance of wheat (*Triticum aestivum*) to high soil and solution selenium levels." **Plant and Soil** 270: 179-188.
- Maria, L. (2000). "Accumulation of metals by microorganisms — processes and importance for soil systems." **Earth-Science Reviews** 51: 1-31.
- Moonmoon, M., Shelly, N. J., Khan, M. A., Uddin, M. N., Hossain, K., Tania, M. e Ahmed, S. (2010). "Effects of different levels of wheat bran, rice bran and maize powder supplementation with saw dust on the production of shiitake mushroom (*Lentinus edodes* (Berk.) Singer)." **Saudi Journal of Biological Sciences In Press, Corrected Proof**.
- Nakajima, A. e Sakaguchi, T. (1993). "Accumulation of uranium by basidiomycetes." **Applied Microbiology and Biotechnology** 38: 574-578.
- Özçelik, E. e Peksen, A. (2007). "Hazelnut husk as a substrate for the cultivation of shiitake mushroom (*Lentinula edodes*)." **Bioresource Technology** 98: 2652-2658.
- Petr, B. (2003). "Interactions of heavy metals with white-rot fungi." **Enzyme and Microbial Technology** 32: 78-91.
- Schrauzer, G. e Shrestha, K. (1990). "Lithium in drinking water and the incidences of crimes, suicides, and arrests related to drug addictions." **Biological Trace Element Research** 25: 105-113.

- Severus, W. E., Kleindienst, N., Evoniuk, G., Bowden, C., Möller, H. J., Bohus, M., Frangou, S., Greil, W. e Calabrese, J. R. (2009). "Is the polarity of relapse/recurrence in bipolar-I disorder patients related to serum lithium levels? Results from an empirical study." **Journal of Affective Disorders** 115: 466-470.
- Silva, M. C. S., Naozuka, J., da Luz, J. M. R., de Assunção, L. S., Oliveira, P. V., Vanetti, M. C. D., Bazzoli, D. M. S. e Kasuya, M. C. M. (2012). "Enrichment of *Pleurotus ostreatus* mushrooms with selenium in coffee husks." **Food Chemistry** 131: 558-563.
- Sturup, J., Kristiansson, M. e Lindqvist, P. (2011). "Violent behaviour by general psychiatric patients in Sweden – validation of Classification of Violence Risk (COVR) software." **Psychiatry Research** 188: 161-165.
- Tedesco, M. J., Gianello, C., Bissani, C. A., Bohnen, H. e Volkweiss, S. J. (1995). "Análises de solo, plantas e outros materiais", **Departamento de Solos, UFRGS**
- Verween, A., Vincx, M. e Degraer, S. (2009). "Comparative toxicity of chlorine and peracetic acid in the biofouling control of *Mytilopsis leucophaeata* and *Dreissena polymorpha* embryos (Mollusca, Bivalvia)." **International Biodeterioration & Biodegradation** 63: 523-528.
- Vetter, J. (2005). "Lithium content of some common edible wild-growing mushrooms." **Food Chemistry** 90: 31-37.