

ARNALDO COLOZZI FILHO

DESINFESTAÇÃO SUPERFICIAL DE ESPOROS DE FUN-  
GOS MICORRÍZICOS VESÍCULO-ARBUSCULARES

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura de Lavras, como parte das exigências do Curso de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração Solos e Nutrição de Plantas, para obtenção do grau de "MESTRE".



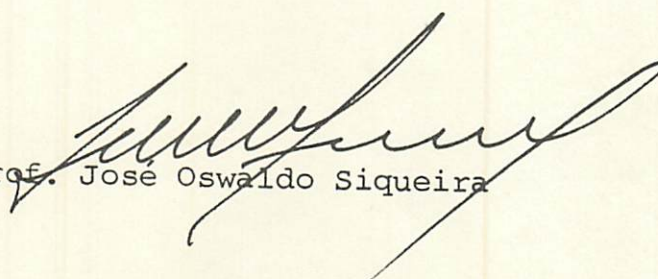
ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA DE LAVRAS

LAVRAS - MINAS GERAIS

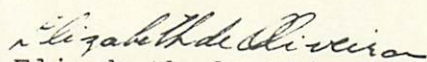
1988

DESINFESTAÇÃO SUPERFICIAL DE ESPOROS DE FUNGOS MICORRÍZICOS  
VESÍCULO-ARBUSCULARES

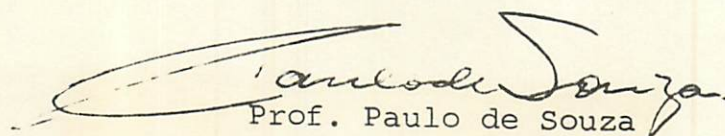
APROVADA:



Prof. José Oswaldo Siqueira



Elizabeth de Oliveira



Prof. Paulo de Souza

À memória de meu pai

Arnaldo

HOMENAGEM

À minha esposa

Vilma

DEDICO

## AGRADECIMENTOS

À Escola Superior de Agricultura de Lavras (ESAL), em especial ao Departamento de Ciência do Solo, pela acolhida e ensinamentos transmitidos durante a realização do curso.

À Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos, e à Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), pelo financiamento da pesquisa.

À Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Extensão (FAEPE) pela concessão das chapas tipográficas.

Ao professor e amigo José Oswaldo Siqueira pela orientação e estímulo.

À Elizabeth de Oliveira, pela orientação e amizade.

Ao laboratorista Manoel Aparecido da Silva, pela valiosa ajuda na execução dos trabalhos.

Aos colegas de curso e de trabalho, especialmente ao Mauro Augusto de Paula.

Aos meus amigos.

## BIOGRAFIA DO AUTOR

ARNALDO COLOZZI FILHO, filho de Arnaldo Colozzi e Conceição Aparecida Dramis Colozzi, natural de São Sebastião do Paraíso, estado de Minas Gerais, nascido aos 08 dias de abril de 1958.

Em janeiro de 1980 iniciou o curso de Engenharia Agrônômica na Escola Superior de Agricultura de Lavras, graduando-se em dezembro de 1984.

Em fevereiro de 1985 iniciou o curso de pós-graduação em Agronomia, área de concentração em Solos e Nutrição de Plantas, na Escola Superior de Agricultura de Lavras, concluído em 29 de dezembro de 1988.

## SUMÁRIO

	Página
LISTA DE QUADROS .....	viii
LISTA DE FIGURAS .....	x
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	3
2.1. Micorrizas vesículo-arbusculares (MVA) .....	3
2.2. Fungos micorrízicos vesículo-arbusculares (FMVA) .....	5
2.3. Germinação dos esporos de FMVA <u>in vitro</u> .....	10
2.4. Desinfestação de esporos dos FMVA .....	15
2.4.1. Agentes desinfestantes e antibióticos ...	15
2.4.2. Métodos de desinfestação de esporos de FMVA .....	22
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	26
3.1. Multiplicação e extração dos esporos .....	26
3.2. Tratamentos .....	27
3.3. Plaqueamento, condução e avaliação .....	32

	Página
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	34
4.1. Agentes desinfestantes .....	34
4.2. Antibióticos .....	40
4.3. Uso combinado de desinfestante e antibióticos ..	48
5. CONCLUSÕES .....	64
6. RESUMO .....	65
7. SUMMARY .....	67
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	69
ANEXO .....	79

## LISTA DE QUADROS

Quadros		Página
1	Agentes desinfestantes, antibióticos e respectivas concentrações e tempo de exposição estudados .....	28
2	Diferentes combinações de desinfestantes e antibióticos em respectivas concentrações testadas. Tempo de exposição variando de 10 a 20 min., dependendo do ensaio .....	30
3	Efeitos da lavagem com antibióticos em diferentes tempos de exposição, sobre a germinação e contaminação de esporos de <u>Gigaspora margarita</u> . .....	45
4	Efeitos do uso combinado de antibióticos na germinação e contaminação de esporos de <u>Gigaspora margarita</u> .....	47
5	Ação inibitória de antibióticos sobre o crescimento de bactérias isoladas de esporos de <u>G. margarita</u> . Antibiograma .....	49

## Quadros

## Página

6	Efeitos do uso combinado de agente desinfestante e antibióticos sobre a germinação e contaminação de esporos de <u>Gigaspora margarita</u> .....	50
7	Efeitos do uso combinado de agente desinfestante e antibiótico sobre a germinação e contaminação de esporos de FMVA .....	52
8	Efeitos do tempo de imersão dos esporos em soluções de antibióticos após pré-lavagem com hipoclorito de sódio 1% por 20 min., sobre a germinação e contaminação de esporos de <u>G. margarita</u> .....	54
9	Efeitos do uso combinado de agente desinfestante e antibióticos em lavagem ou imersão por diferentes tempos de exposição, sobre a germinação e contaminação de esporos de <u>G. margarita</u> .	56
10	Efeitos da pré-lavagem em hipoclorito de sódio 1% por 20 min., seguida da imersão em antibióticos por diferentes tempos sobre a germinação e contaminação de esporos de <u>G. margarita</u> ....	57
11	Taxas de contaminação (proporção de placas contaminadas) de esporos de FMVA em meio para crescimento de fungos (Martin) ou bactérias (MB <sub>1</sub> ), após desinfestação superficial pelo método tradicional, MOSSE (38), ou conforme procedimentos 1 e 2 .....	62

## LISTA DE FIGURAS

Figuras		Página
1	Efeitos da lavagem com cloramina-T e hipoclorito de sódio, em diferentes concentrações, sobre a germinação dos esporos de <u>G. margarita</u> .....	35
2	Efeitos do tempo de exposição durante a lavagem com agentes desinfestantes, em duas concentrações, na germinação e contaminação com fungos e bactérias em esporos de <u>G. margarita</u> .....	37
3	Efeitos da lavagem com formaldeído e cloreto de mercúrio por 20 min., em diferentes concentrações, na germinação e contaminação de esporos de <u>G. margarita</u> .....	39
4	Germinação e contaminação de esporos de <u>G. margarita</u> sob o efeito de formaldeído em diferentes concentrações e tempo de exposição .....	41

## Figuras

## Página

- 5 Efeitos de antibióticos aplicados em lavagem por 10 min., em diferentes concentrações, sobre a germinação de esporos de Gigaspora margarita e Scutellospora heterogama ..... 43
- 6 Taxas de germinação e contaminação de esporos, sem desinfestação, desinfestados pelo método de Mosse, MOSSE (38) ou outros procedimentos..... 60

## . INTRODUÇÃO

Os fungos micorrízicos vesículo-arbusculares (FMVA) apresentam grande potencial para utilização prática na agricultura devido a sua capacidade de promover o crescimento das plantas. Entretanto, a condição de "biotrófico obrigatório" impossibilita seu cultivo in vitro, o que dificulta a obtenção de inoculante de boa qualidade e em grande quantidade. A multiplicação destes fungos é feita em plantas, facilitando o desenvolvimento simultâneo de microrganismos contaminantes que comumente encontram-se associados aos esporos. Devido ao grande tamanho e irregularidades na parede externa, os esporos se encontram frequentemente parasitados ou associados aos mais diversos microrganismos, que podem atuar de diferentes maneiras na germinação e crescimento micelial destes fungos, quando em cultura pura in vitro. Portanto, tanto para multiplicação dos esporos in vivo quanto para estudos fisiológicos in vitro, a desinfestação dos esporos dos FMVA torna-se de grande importância. Vários estudos têm sido feitos utilizando-se agentes desinfestantes, na maioria oxidantes e antibióticos, para a desinfestação. Entretanto os resultados alcançados não são

satisfatórios, havendo necessidade do desenvolvimento de procedimento mais eficaz.

O objetivo do presente estudo foi selecionar agentes desinfestantes e antibióticos e avaliar a eficácia do uso combinado destes, como procedimento para a desinfestação superficial de esporos de FMVA.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Micorrizas vesículo-arbusculares (MVA)

Certas espécies de fungos vivem em simbiose com raízes da maioria dos vegetais terrestres formando as micorrizas, que distinguem-se em ectomicorrizas, ectendomicorrizas e endomicorrizas, de acordo com as espécies simbiontes (fungo e planta) e com a morfologia da associação, HARLEY (16). Nestas simbioses, os fungos beneficiam as plantas principalmente pela absorção mais eficiente de nutrientes e água do solo. A planta hospedeira, por sua vez, supre os fungos com fotossintatos essenciais ao seu crescimento (12, 17, 18).

Nas micorrizas do tipo vesículo-arbusculares (MVA), os fungos crescem no parênquima cortical das raízes, com penetração inter e intra-celular, e formam hifas extra-radiculares que se ramificam no solo. No córtex das raízes os fungos formam estruturas típicas denominadas pelotões, arbúsculos e vesículas. Os pelotões caracterizam-se por enovelamentos das hifas no interior das células corticais. Já os arbúsculos caracterizam-se pela rami

ficação dicotômica das hifas fúngicas formando filamentos finos que são circundados por invaginações da membrana plasmática das células hospedeiras. Nesta região de contacto existente entre as células da raiz do hospedeiro e o micélio fúngico acontecem as trocas de nutrientes e ou metabólitos entre os simbiotes. As vesículas, estruturas predominantemente intercelulares, são dilatações globosas de hifas que provavelmente atuam como estruturas de armazenamento dos fungos. Os esporos destinados à dispersão do fungo, geralmente formam-se nas hifas extraradiculares, embora em algumas espécies possam ser formados no interior das raízes, SCHENCK & PEREZ (48).

No solo, as hifas fúngicas ultrapassam a zona de esgotamento que se desenvolve ao redor das raízes, delimitada pelos pêlos absorventes, aumentando sua área de absorção, SANDERS & TINKER (45). Em consequência, um maior volume de solo é explorado, e a absorção de nutrientes de baixa mobilidade como P, Zn e Cu é aumentada, TINKER (60). Além do aumento na absorção de nutrientes, podem ocorrer aumentos na nodulação e capacidade de fixação de N<sub>2</sub> atmosférico, alterações nas relações planta-patógeno e água-solo-planta, aumentos na produção de fitohormônios, modificações de ordem anatômica e fisiológica nos hospedeiros além de melhor adaptabilidade da planta às condições adversas de solo e clima, ZAMBOLIM & SIQUEIRA (69). Em decorrência destes benefícios, muitas espécies vegetais apresentam maiores produções de matéria seca e maiores teores de nutrientes quando micorrizadas, em comparação com plantas sem micorrizas, MENGE et alii (32). Esses efeitos, entretanto, dependem da espécie de fungo, da planta, das condições e

dáficas e do ambiente, MOSSE (39). O tipo e magnitude das respostas encontradas nestes experimentos são bastante variadas, sendo relatados aumentos de crescimento de até 7750% em condições controladas, SCHULTZ et alii (49) e de 300% em condições de campo, HAYMAN (18). A interdependência dos fatores envolvidos na simbiose (planta-fungo-ambiente), e as variações inerentes a cada um diicultam as previsões de respostas e a determinação de estratégias a serem seguidas em programas de utilização prática das MVA na agricultura.

Mesmo diante dos esforços de grande número de pesquisadores, a condição de simbiotróficos obrigatórios dos fungos que formam as MVA, MOSSE (34) ainda não foi vencida. Isto limita a produção em massa de inoculante de boa qualidade e constitui o principal obstáculo para testes de inoculação em grande escala, além de dificultar os estudos relacionados com a taxonomia, ecologia, fisiologia e relação fungo-hospedeiro, SIQUEIRA (51).

## 2.2. Fungos micorrízicos vesículo-arbusculares (FMVA)

Os FMVA apresentam hifas hialinas, geralmente asseptadas, com diâmetro variável e com ramificações no solo. As paredes das hifas e dos esporos dos FMVA são constituídas basicamente por quitina, sendo os esporos e vesículas ricos em lipídeos, e reproduzem-se assexuadamente através de esporos do tipo clamidosporos e azigosporos, GERDEMANN & TRAPPE (13). Os clamidosporos são

formados na extremidade de hifas, isoladamente ou em grupos denominados esporocarpos. Os esporocarpos podem apresentar-se sem ordenação dos esporos, em forma de "cachos", ou ordenados em torno de um plexo central como no caso do gênero *Sclerocystis*. Quando os clamidosporos separam-se da hifa de origem, parte desta permanece ligadas aos esporos, sendo denominadas hifas de sustentação. Os clamidosporos apresentam-se em forma globosa, ovalada ou elíptica. Sua coloração varia com a espécie podendo ser hialina, subhialina, ou em tons de amarelo, marrom ou preto. Possuem parede espessa e quando são rompidos podem separar-se em apenas um ou vários grupos de parede. Apresentam dimensões que variam de 15 a 305  $\mu\text{m}$  (13, 48, 64).

Os azigosporos são morfologicamente semelhantes aos zigosporos, entretanto, são formados assexuadamente. Possuem um ou mais grupos de parede que podem apresentar ornamentações distintas. Como os clamidosporos, também possuem cores variadas, sendo geralmente globosos ou subglobosos, com dimensões de 20 a 812  $\mu\text{m}$ . São conhecidos dois tipos de azigosporos; um séssil formado lateralmente ou no interior de uma hifa terminal inflada e outro com uma célula suspensora tipo "bulbosa", que conecta o esporo e a hifa que o produziu (13, 48, 64).

Esses fungos pertencem à família Endogonaceae (Zigomycotina-Zigomycetos-Endogonales). São classificados nos gêneros Glomus, Sclerocystis, Gigaspora, Acaulospora, Entrophospora e Scutellospora, de acordo com variações no processo de formação dos esporos que infere-se de sua morfologia e diferenças no número de grupos de parede e processo de germinação. São conhecidos atual -

mente mais de 140 espécies cuja separação é feita, principalmente, baseando-se em diferenças estruturais quanto ao número de grupos de parede dos esporos, espessura e ornamentação destas, além de variações em cor e diâmetro, SCHENCK & PEREZ (48). A germinação dos esporos ocorre por diferentes mecanismos. Através da formação de tubo germinativo que emerge diretamente através da parede celular em esporos dos gêneros Acaulospora, conforme descrito por MOSSE (37) para Acaulospora laevis. A formação de placas de germinação foi observada nos zigosporos de Gigaspora margarita, SWARD (58) e SIQUEIRA (52). O crescimento da hifa de sustentação ocorre em clamidosporos do gênero Glomus, MOSSE (36). Os esporos do gênero Scuttelospora possuem uma câmara de germinação semelhante a um escutelo, de onde emerge o tubo germinativo, WALKER & SANDERS (67). O mecanismo que dispara o processo germinativo ainda é desconhecido, mas segundo SIQUEIRA (54), os esporos não requerem fatores nutricionais exógenos para iniciarem o processo de germinação, que requer grande quantidade de energia para a formação e emergência do tubo germinativo.

Esses fungos são simbiotes obrigatórios, MOSSE (34) e ainda não foram multiplicados na ausência de raízes fisiologicamente ativas, SIQUEIRA (51). Esta inabilidade de se multiplicarem em meios de cultivo artificiais impossibilita sua multiplicação in vitro, sendo isto feito em plantas hospedeiras crescendo em substratos desinfestados. Vários fatores podem influenciar a produção de esporos de FMVA em vasos de cultivo, FERGUSON & WOODHEAD (11). As condições de solo e ambiente (luz e temperatura) mais adequadas para o crescimento das plantas são as mais favoráveis ao de-

desenvolvimento do fungo, embora o ótimo para germinação e crescimento seja diferente para cada espécie. A deficiência hídrica que induz a senescência das plantas pode resultar em esporulação precoce desses fungos. Por outro lado, altas temperaturas, luminosidade e umidade do solo podem favorecer o desenvolvimento de hiperparasitas destes fungos, SCHENCK et alii (46). A temperatura ótima do solo para o desenvolvimento dos FMVA pode ser variável de acordo com as espécies adaptadas a ambientes específicos, TOMMERUP (62). Em geral, altas temperaturas favorecem a colonização radicular e a esporulação. Além disto, condições de luminosidade que favorecem a taxa fotossintética das plantas contribuem para melhor esporulação. Como altos níveis de fósforo disponível no substrato podem reduzir a colonização micorrízica, SIQUEIRA & COLOZZI-FILHO (53), níveis baixos ou moderados deste nutriente favorecem a colonização e esporulação.

Segundo MENGE (31), os maiores problemas associados com a produção de inoculante em sistemas in vivo estão relacionados com a infectividade e pureza do inóculo, pois estes fungos apresentam elevada variabilidade na sua eficiência simbiótica, estando isto relacionado com a maior ou menor capacidade de colonização e esporulação, tamanho do esporo e produção de micélio externo. Durante a multiplicação do fungo in vivo, é comum a contaminação com microrganismos fitopatogênicos, com parasitas destes fungos e com antagonistas que podem comprometer a eficiência do inoculante. Fungos do gênero Peziza, Pyronema, Trichoderma, várias espécies de actinomicetos e bactérias, SECÍLIA & BAGYARAJ (50), patógenos do gênero Fusarium, Pythium, Alternaria e Papulospora e

nematóides parasíticos, normalmente ocorrem em inoculantes produzidos in vivo, constituindo um sério problema para sua produção e comercialização em larga escala, MENGE (30) e CARDOSO & SANHUEZA (6). Embora seja possível a desinfestação superficial das sementes e dos propágulos do fungo, MOSSE (38), e a esterilização do substrato por autoclavagem, pasteurização ou radiação, LIEGEL (27), a manutenção da esterilidade do sistema torna-se difícil pelos prolongados períodos de tempo (4-5 meses) requeridos para que a esporulação ocorra. Técnicas alternativas buscando o crescimento asséptico destes fungos têm sido propostas, utilizando-se culturas hidropônicas, MACDONALD (28) ou filme de nutrientes, MOSSE & THOMPSON (40). Entretanto a baixa esporulação do fungo nestes sistemas compromete sua viabilidade operacional. Outras técnicas têm sido adaptadas e infecções típicas podem ser obtidas em plantas crescendo em meio de cultura, ALLEN et alii (1) e HEPPEL (20) e sistemas hidropônicos, MACDONALD (28).

Estudos mais recentes usam técnicas de cultivo in vitro de plantas, de órgãos como cultura de raízes transformadas, MUGNIER & MOSSE (41) e BECARD & FORTIN (4) ou adição de suspensão de células no meio de germinação ou cultivo, PAULA (42) e CARR et alii (8) para o crescimento dos FMVA. Entretanto, estes métodos não têm se ajustado às exigências nutricionais dos fungos, e embora alguma colonização ou desenvolvimento de micélio externo e interno tenha sido conseguida, nenhum foi suficiente para sustentar a esporulação. Além disso, a manutenção da esterilidade dos meios de cultivos é difícil, uma vez que vários microrganismos encontram-se associados aos esporos, e crescem como contaminantes afe-

tando a germinação e/ou crescimento dos FMVA.

Desse modo, a definição de métodos ou sistemas mais eficientes para a produção de inóculo de FMVA envolve manipulações do fungo, substrato de crescimento e planta hospedeira, e conforme comentado por MENGE (31) "isto parece mais uma arte do que uma ciência verdadeira", necessitando de melhoramentos para que estes sistemas possam ser utilizados em larga escala com fins de pesquisa ou aplicação comercial.

### 2.3. Germinação dos esporos de FMVA in vitro

Os esporos destes fungos, pelo menos aqueles das espécies mais estudadas, não requerem fatores nutricionais exógenos para germinar porque possuem os fatores biológicos necessários para a germinação, e podem fazê-la tanto em meios de cultura quanto no solo, sem a presença de raízes vivas, SIQUEIRA (51). Entretanto, vários fatores de natureza abiótica ou biótica podem afetar a velocidade e a taxa de germinação. Os principais fatores de natureza abiótica são: pH, temperatura, aeração, elementos orgânicos ou inorgânicos presentes no meio. Segundo SIQUEIRA (52), o pH afeta tanto a germinação quanto o crescimento micelial, sendo a interação pH x composição do meio de germinação fundamental para o cultivo destes fungos, devendo o pH do meio ser ajustado para próximo de 6,0 para a germinação da maioria das espécies. Os FMVA exibem elevada adaptação fisiológica à temperatura, SCHENCK et

alii (46). Segundo TOMMERUP & KIDBY (63), a temperatura letal para os esporos é em torno de  $60^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos. LE TACON et alii (26) estudando o efeito da concentração de  $\text{O}_2$  e  $\text{CO}_2$  sobre os esporos concluiu que os FMVA têm menor tolerância a altas tensões de  $\text{CO}_2$  e mais alto requerimento de  $\text{O}_2$  que outros fungos. A germinação dos esporos é muito sensível à presença de íons inorgânicos, e em meios contendo ágar pode ser reduzida por Mn, Zn, Cu, Ca e Al em concentrações iguais aquelas comumente encontradas na solução do solo (21, 22, 56, 57). Entretanto, pequenas quantidades de alguns elementos minerais favorecem a germinação in vitro, SIQUEIRA et alii (52). Estes autores relatam que centenas de substratos orgânicos definidos e indefinidos têm sido estudados, e efeitos de inibição sobre a germinação são mais frequentes que aqueles estimulantes.

Os principais fatores de natureza biótica que afetam a germinação dos esporos dos FMVA são dormência e a ocorrência de microrganismos associados. O fenômeno da dormência foi confirmado para algumas espécies de FMVA por TOMMERUP (61). Segundo este autor, esporos armazenados em geladeira por algum tempo germinam melhor que aqueles recém formados. Por outro lado, a armazenagem por tempo prolongado pode reduzir a viabilidade dos esporos, KOSKE (24). Esta perda de viabilidade é devido a processos de envelhecimento natural dos esporos. Quanto aos microrganismos, diversos deles podem ocorrer associados aos esporos, devido ao seu tamanho, às ornamentações, cavidades e rugosidades que apresentam na parede externa, constituindo um excelente habitat que permite o aporte físico, sobrevivência e proliferação de uma comunidade

microbiana diversificada. Plantas micorrizadas apresentam intensa exudação nas raízes, e isto influencia de modo qualitativo e quantitativo a microbiota da rizosfera, HAYMAN (18). Os esporos de FMVA formados nesta região de intensa atividade microbiana, estão expostos a estes microrganismos, e podem estabelecer relações diversas de natureza antagonista, parasítica ou mutualista, além de poderem atuar como disseminadores de fitopatógenos, SYLVIA & SCHENCK (59) e vetores de espiroplasmas, TZEAN et alii (66) e possivelmente vírus.

Os microrganismos que ocorrem associados aos esporos dos FMVA têm significado especial tanto para a produção de inóculo in vivo quanto para estudos fisiológicos in vitro, uma vez que, em ambos os casos podem atuar sobre a germinação dos esporos ROSS & RUTTENCUTER (44) e SYLVIA & SCHENCK (59), e crescimento do tubo germinativo dos FMVA, AZCON-AGUILAR et alii (3) depreciando a qualidade do inóculo produzido via multiplicação in vivo ou dificultando a obtenção de resultados nos estudos fisiológicos in vitro. Vários estudos mostram que estes microrganismos proliferam quando os esporos dos FMVA são plaqueados em meios de cultura, mesmo quando são desinfestados superficialmente (3, 46, 59). A forma com que os microrganismos atuam sobre os esporos de FMVA, depende das espécies de microrganismos e FMVA envolvidos. GODFREY (14) observou espessamentos irregulares e projeções de parede para o interior dos esporos de Endogone microcarpa, decorrentes da penetração por hiperparasitas. SCHENCK & NICOLSON (47) observaram esporângios esféricos de Rhizidiomycopsis stomatosa circundando completamente a superfície de azigosporos de Gigaspora margarita, e

ocasionalmente esporângios foram observados internamente aos esporos. Este hiperparasita foi isolado de esporos de Gigaspora margarita multiplicados em vaso de cultivo, e posteriormente utilizados para inoculação em outras espécies de Gigaspora, Glomus e Acaulospora, sendo que apenas os esporos de Glomus não foram hiperparasitados. SYLVIA & SCHENCK (59), estudando o efeito dos microrganismos associados aos esporos de FMVA relatam efeito depressivo destes sobre a germinação de Glomus etunicatum. O mesmo efeito não foi observado para Glomus macrocarpum. DANIELS & MENGE(10) isolaram de Glomus epigaeum e Glomus fasciculatum os fungos Anquilospora pseudolongissima e Humicola fuscoatra, além de microrganismo tipo quitridio, identificado como Phlyctochytrium sp. Ao serem testados em diferentes espécies de FMVA os autores concluíram que existe uma resistência diferenciada dos FMVA a estes contaminantes, sendo esta resistência associada ao teor de melanina presente na parede do esporo. Esporos de Glomus constrictum, que são escuros, são resistentes ao hiperparasitismo enquanto os de G. margarita, de coloração clara, têm se mostrado bastante susceptíveis.

Além de relações de parasitismo, podem ocorrer outras relações antagonistas como competição e antibiose. SIQUEIRA et alii (55) isolaram de esporos de G. margarita o fungo Stachybotrys chartarum que mostrou elevado efeito depressivo na germinação desses esporos. O mesmo autor mostrou mais tarde se tratar de um poderoso hiperparasita. Segundo SYLVIA & SCHENCK (59), muitos dos fungos associados aos esporos de FMVA são saprófitas comumente encontrados no solo, mas que podem produzir metabólitos antim

crobianos capazes de inibir a germinação desses esporos. Por outro lado, diversos autores têm relatado aumentos na germinação, crescimento de hifas e produção de esporos vegetativos de FMVA infestados com fungos ou bactérias isolados da rizosfera de plantas micorrizadas ou diretamente de esporos. AZCON-AGUILAR et alii (3) citam que em outros trabalhos dos mesmos autores, a presença de alguns microrganismos no meio foi capaz de estimular o crescimento não simbiótico de Glomus mosseae. Os mesmos autores estudando o efeito de microrganismos do solo na germinação de esporos e crescimento de G. mosseae relatam que a germinação deste foi aumentada pela presença de fungos saprofíticos de vida livre, que também estimularam o crescimento das hifas. A formação de esporos vegetativos somente foi estimulada em micélio originado de esporos crescendo na presença destes microrganismos. MAYO et alii(30) estudando a germinação de Glomus versiforme associado com bactérias isoladas dos próprios esporos, observaram que esporos superficialmente desinfestados germinaram mais quando reinoculados com as bactérias. Hifas emergidas de esporos na presença de bactérias são mais vigorosas, com vesículas mais desenvolvidas, e são substancialmente mais longas e mais ramificadas que aquelas de esporos superficialmente desinfestados e sem bactérias.

Estudos conduzidos no Laboratório de Microbiologia do solo da ESAL por J.O. Siqueira e colaboradores (dados não publicados), mostraram que a re-infestação dos esporos de G. margarita com bactérias isoladas do próprio esporo não tiveram efeito sobre a germinação. Por outro lado, MOSSE (35) relata que fungos MVA somente colonizaram raízes crescendo em meio de cultivo ,

quando em presença de bactérias do gênero Pseudomonas sp, isoladas do próprio sistema. Portanto, o fato de serem encontrados na rizosfera de plantas micorrizadas sugere relações diversas entre estes microrganismos e os FMVA.

As relações entre os microrganismos que ocorrem associados e os esporos dos FMVA são amplamente reconhecidas, porém ainda pouco conhecidas, especialmente os espiroplasmas observados por TZEAN et alii (66), ou organismos aparentemente não patogênicos semelhantes a bactérias observados no citoplasma de diversas espécies de Glomus, MACDONALD & CHANDLER (29). Estes relatos sugerem a existência de uma microbiota interna aos esporos, que pode ter relações com a germinação ou mesmo crescimento destes fungos, e abre novas e intrigantes perspectivas para a desinfestação e o estudo dos FMVA in vitro.

Portanto, a desinfestação de esporos dos FMVA é passo decisivo nos estudos fisiológicos in vitro e estabelecimento de cultura monoxênica com estes fungos, pois a diversidade de microrganismos que podem ocorrer associados, e as relações existentes entre eles dificultam a obtenção de dados ou mesmo a interpretação dos resultados obtidos.

#### 2.4. Desinfestação de esporos dos FMVA

##### 2.4.1. Agentes desinfestantes e antibióticos

O termo desinfestante é de difícil definição, considerando-se que uma mesma substância pode ter ação microbiostática quando em baixa concentração, e microbiocida, quando em concentrações mais elevadas. A intensidade do efeito total (esterilizante) ou parcial (desinfestante), é função direta da intensidade do agente empregado. Assim, por exemplo, o calor em baixa temperatura (50°C por 30 min.), tem antes ação desinfestante, por eliminar parte dos microrganismos contaminantes, porém não é suficiente para destruir formas de resistência como esporos de bactérias. Por outro lado, uma substância química, dependendo da concentração em que é usada e do tempo durante o qual se deixa atuar, poderá agir como esterilizante ou tão somente como microbiostático. Segundo BIER (5), desinfestantes são todas as substâncias capazes de evitar a proliferação de microrganismos por inativação ou destruição. Neste estudo o termo desinfestante refere-se àquele que causa diminuição da infestação ou eliminação dos microrganismos situados na parede externa, de esporos FMVA, independente de suas relações com os mesmos.

Segundo COLLINS (9) os desinfestantes são divididos em ácidos, álcalis, sais de metais pesados, halogêneos e fenóis ou compostos afins. A adição de ácidos e o conseqüente aumento na concentração hidrogeniônica aumenta a taxa de mortalidade dos microrganismos embora algumas bactérias acidófilas cresçam bem em concentrações hidrogeniônicas altas. Os principais desinfestantes componentes deste grupo são os ácidos bórico, benzóico, salicílico, sulfuroso e fórmico. A alcalinidade elevada (alta concentração de hidroxilas) característica do hidróxido sódico e hidróxido

de cálcio exerce também ação exterminadora sobre os microrganismos. Sais de prata, cobre, zinco, arsênico e mercúrio são conhecidos por seu valor microbiocida, sendo cloreto de mercúrio o mais empregado por sua toxicidade e ação corrosiva. O fenol puro ou misturado com álcool ou glicerina são eficazes microbiocidas, destruindo as bactérias, mesmo em presença de matéria orgânica. Os halogêneos e os variados compostos que se obtêm ao misturá-los com outros produtos químicos, são os desinfestantes mais empregados, embora percam em eficácia quando em presença de matéria orgânica, o que torna seu uso limitado. O mais empregado de todo o grupo dos halogêneos é o cloro. O cloro gasoso e seus derivados como o hipoclorito de sódio, tem efeito microbiocida pela ação oxidante que resulta da união do cloro com o hidrogênio da água. Entre estes produtos encontra-se a cloramina-T. O formaldeído é também desinfestante microbiocida eficaz, e não se emprega somente para destruir bactérias e fungos, mas também outros microrganismos de diversas espécies.

Segundo PELCZAR et alii (43) os fatores que atuam na desinfestação química estão relacionados com características do próprio desinfestante, como sua natureza e estrutura química, constante de ionização, solubilidade, afinidade pelo protoplasma celular e modo de ação; e daquelas relacionadas com os microrganismos como a espécie, fase de crescimento, composição química, produção de estruturas especiais de resistência, número na amostra e diferenças na susceptibilidade aos produtos. Além disso, fatores como temperatura, pH, fenômenos de superfície (adsorção, tensão superficial), presença de substâncias orgânicas e inorgânicas,

pressão e tempo, que podem atuar tanto sobre o desinfestante quanto sobre os microrganismos, são de grande importância.

Do ponto de vista prático, estes fatores podem ser resumidos na concentração de microrganismos ou carga microbiológica, na concentração do desinfestante e no tempo de exposição ao agente desinfestante. Tal como ocorre na fase logarítmica de crescimento, a morte das bactérias sob a ação dos desinfestantes ocorre em progressão geométrica, à medida em que o tempo aumenta em progressão aritmética, e este controle é tanto mais demorado quanto maior a concentração inicial de microrganismos. O tempo necessário para a desinfestação e a concentração do desinfestante guardam entre si uma relação exponencial. Para um sublimado (cloreto de mercúrio) quando se dobra a concentração, o tempo se reduz à metade, COLLINS (9).

Como tantos fatores influem sobre a ação e eficácia dos desinfestantes, é difícil escolher o melhor produto e conseguir condições ideais para sua eficácia máxima. É pouco provável que exista um desinfestante com formulação ideal, nem tampouco é necessário que haja esta substância. Para obter estes efeitos deve-se escolher diferentes produtos químicos, sendo que um pode ser vantajoso em uma situação em que outro possa ser totalmente inaplicável. Os desinfestantes, em sua maioria, só são capazes de atuar eficazmente contra microrganismos em concentrações que também lesam as células, e a utilização conjunta com antibióticos pode auxiliar na desinfestação permitindo o uso de desinfestantes em concentrações menores. Segundo LACAZ (25), antibiótico foi definido por Waksman como sendo "substâncias antimicrobianas elabo-

radas por seres vivos e capazes de agir em pequenas concentrações". Foi primeiramente isolado de um fungo identificado como Penicillium sp, por Alexander Fleming em 1929. A partir de então, e notadamente à partir de 1940, milhares de substâncias antibióticas têm sido isoladas e identificadas. Muitas delas não têm importância prática até o momento, mas algumas são de amplo uso quimioterapêutico. A popularidade dos antibióticos é devida à sua capacidade em destruir muitos tipos de microrganismos, e as suas propriedades relativamente atóxicas. Algumas vezes é vantajoso o uso combinado de dois ou mais antibióticos para a eliminação de microrganismos patogênicos que não são susceptíveis à ação de um único antibiótico. Tais combinações devem ser escolhidas com cuidado, já que, às vezes podem ocorrer antagonismos e ou anulamento dos efeitos particulares de cada antibiótico. Segundo PELCZAR et alii (43), os antibióticos podem inibir ou destruir os microrganismos por diversos modos: a) através da inibição da formação da parede celular. As penicilinas e cefalosporinas têm este tipo de ação e consistentemente atuam apenas sobre bactérias em crescimento. As células sensíveis que se desenvolvem na presença destes antibióticos são normalmente grandes e têm formas inusitadas. b) através do enfraquecimento da membrana citoplasmática que permite o vazamento do conteúdo celular. O antibiótico se combina com a membrana citoplasmática, causando alteração nos constituintes lipoprotéicos e dificultando o funcionamento da membrana. c) interferindo na síntese de proteínas celulares, provavelmente devido à inibição de algumas reações básicas envolvendo aminoácidos, bases púricas ou pirimídicas, nucleotídeos ou o transporte na membrana,

com efeito de bloqueio total da síntese protéica. A estreptomici-  
na e a gentamicina combinam-se com os ribossomos das bactérias  
sensíveis, rompendo o código genético e induzindo a produção de  
mutantes. O cloranfenicol inibe a síntese de proteínas. d) inter-  
ferindo no metabolismo dos ácidos nucléicos. Todos os antibióti-  
cos que têm este modo de atuação são tóxicos para as células hos-  
edeiras, em face da semelhança deste metabolismo nos microrganis-  
mos patogênicos e nas células infestadas. De uma maneira geral,  
os agentes que lesam a parede celular ou a membrana citoplasmáti-  
ca são bactericidas. Já os que interferem com as funções enzimáti-  
cas são bacteriostáticos, sendo que em alguns casos esta ação po-  
de ser reversível.

A eficácia de um antibiótico depende de vários fato-  
res, como: a) acesso aos sítios onde se localizam os microrganis-  
mos. Alguns antibióticos, quando em presença de hidróxido de alu-  
mínio, formam quelatos, reduzindo sua atividade. A presença de ma-  
téria orgânica (proteínas) no meio também pode diminuir a ação de  
diversos antibióticos, por ligações com estes. b) concentração e  
tempo de exposição: deve-se considerar na determinação destes fa-  
tores o tipo de ação exercida pelo antibiótico, a susceptibilida-  
de relativa dos microrganismos e a possibilidade de se promover  
concentração útil no local desejado.

Quando se faz uso de antibióticos deve-se levar em  
consideração a interferência na elaboração de agentes antimicrobi-  
anos pelos microrganismos componentes da própria microbiota que  
se quer eliminar. Além disso, microrganismos não susceptíveis ao  
antibiótico podem crescer com maior agressividade, devido à falta

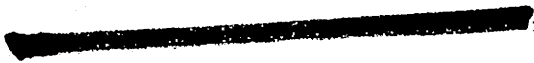
de competição pelo substrato ou mesmo por ausência de reações antimicrobianas que podem ocorrer, rompendo o equilíbrio microbiológico do sistema.

Dentre os diversos antibióticos utilizados, tem se difundido o uso da estreptomicina por seus efeitos sobre os microrganismos gram-negativos e alguns gram-positivos. É sintetizada pelo Streptomyces griseus, e tem efeito bactericida quando empregado em altas concentrações. A sua atuação é estritamente através do contato, atuando no ciclo de Krebs da célula. A gentamicina sintetizada por bactérias do gênero Micromonospora, tem o modo de atuação bastante semelhante à estreptomicina. Devido a sua ação específica contra bactérias gram-negativas, ela é também um antibiótico bastante utilizado. As cefalosporinas, com ação sobre as bactérias gram-positivas e gram-negativas têm propiciado o desenvolvimento em laboratórios de vários outros antibióticos, enquadrados no grupo das cefalosporinas. Originalmente obtidos do fungo Cephalosporium sp., agem como bactericidas interferindo na síntese da membrana celular. Cloranfenicol, o primeiro antibiótico produzido em laboratório, em escala industrial, foi inicialmente obtido de Streptomyces venezuelae, sendo um dos característicos antibióticos de largo espectro, de atividade antimicrobiana ampla. Inibe a síntese protéica nos microrganismos susceptíveis, tendo efeito essencialmente bacteriostático. Os antibióticos não possuem ação apenas contra bactérias. As pimaracinas, por exemplo, obtidas de Streptomyces natalensis, são antibióticos de ação antifúngica. Atuam principalmente na permeabilidade da membrana celular, sendo o grau deste efeito (fungistático ou fungicida), depen

dente das espécies envolvidas.

#### 2.4.2. Métodos de desinfestação de esporos de FMVA

O primeiro método para desinfestação superficial de esporos de FMVA foi relatado por Barbara Mosse em 1959, MOSSE(38), e consiste na imersão dos esporos por 20 min. em uma solução contendo cloramina-T a 2% e 200 ppm de estreptomicina. O método foi originalmente proposto para a desinfestação de esporos de G. mosseae, e através do plaqueamento dos esporos desinfestados em meios utilizados para detecção de bactérias e fungos, observou-se apenas 4% de contaminação. À partir de então, este tem sido o método mais utilizado, como pode ser visto em trabalhos recentes(2, 7, 19, 41). Dificuldades surgiram à partir da constatação de comportamento diferenciado entre espécies de FMVA quanto à diversidade de microrganismos associados e susceptibilidade às substâncias desinfestantes, DANIELS & MENGE (10). Quando este método foi usado para desinfestação superficial de Gigaspora margarita, obteve-se somente de 32 a 68% de esporos assépticos, MERTZ et alii(33). Os mesmos autores propuseram uma pré-lavagem com o surfactante Tween 80 a 0,05% seguido da aplicação de cloramina-T 2% sob vácuo de 600 mg Hg. Após o tratamento, os esporos foram estocados em solução de estreptomicina a 200 ppm e gentamicina a 100 ppm por 1 semana a 4°C, e antes de serem plaqueados foram submetidos a cloramina-T por 20 min. Este tratamento desinfestou completamente os



esporos e não teve nenhum efeito detrimental sobre sua viabilidade. Entretanto, Siqueira (dados não publicados), citado por SIQUEIRA et alii (57) relata efeito depressivo sobre a germinação de esporos de G. margarita após desinfestação conforme método proposto por MERTZ et alii (33). A busca de maior eficácia na desinfestação dos esporos, tem levado ao uso de modificações do método utilizado por MOSSE (38), uma vez que este tem mostrado baixa eficácia, SYLVIA & SCHENCK (59).

Como procedimento alternativo para a desinfestação superficial dos esporos tem sido usada a exposição destes a soluções diluídas de hipoclorito de sódio (1, 10, 46, 66, 68), entretanto, a ação oxidativa do hipoclorito pode modificar a permeabilidade da parede do esporo, reduzindo sua germinação ou até inviabilizando os esporos, DANIELS & MENGE (10).

TOMMERUP & KIDBY (63) estudaram os efeitos de cloramina-T, hipoclorito de sódio e antibióticos, em diferentes concentrações sobre a desinfestação superficial de diferentes FMVA isolados de vasos de cultivo ou de vegetação de pastagens naturais. Eles recomendaram o uso de cloramina-T 5%. Nesta concentração, 90% de esterelidade pode ser obtida com esporos provenientes de vasos de cultivo. Tratamentos mais prolongados foram necessários quando os esporos foram isolados de pastagens. Para esporos de Acaulospora laevis, aqueles provenientes dos vasos de cultivo podem ser adequadamente desinfestados após 40 min. de tratamento com cloramina-T. Esporos da mesma espécie provenientes do campo nunca foram efetivamente desinfestados. Cloranfenicol pode ser usado no meio de germinação, em concentrações de 100 a 200 ppm, para supri

mir o crescimento de bactérias sem causar nenhuma mudança na germinação dos esporos. Pimaracina, que pode ajudar a eliminar o crescimento de fungos contaminantes, inibiu a germinação dos esporos de Glomus caledonium mesmo a 10 ppm. KLOPFENSTEIN (23) observou que os antibióticos cloranfenicol, gentamicina, penicilina e estreptomicina atuam negativamente sobre Gigaspora rosea e Glomus etunicatum, mas estes efeitos dependem do antibiótico, da sua concentração, do modo de aplicação (em solução ou incorporados ao meio de germinação), e da espécie de FMVA. Resultados semelhantes foram encontrados por Siqueira, J.O. (dados não publicados).

O uso combinado de agentes desinfestantes e antibióticos para a desinfestação superficial de esporos de FMVA tem sido proposto (38, 63, 68). Segundo TOMMERUP & KIDBY (63), o crescimento de bactérias sobreviventes ao tratamento com agentes desinfestantes pode ser inibido pela adição de antibióticos ao meio de germinação. Entretanto, a eliminação completa dos contaminantes somente ocorreu quando os esporos foram lavados por pelo menos 40 minutos em solução de cloramina-T 5%, evidenciando as vantagens do uso combinado. O uso combinado de agentes desinfestantes e antibióticos pode permitir que se use concentrações menores destes produtos, sem diminuição na sua eficiência. Segundo WATRUD (68), tratamentos com cloramina-T mais estreptomicina e gentamicina têm sido utilizados na desinfestação de esporos de Gigaspora e Glomus. MAYO et alii (30) utilizaram penicilina e estreptomicina após lavagem com agente desinfestante para descontaminar esporos de Glomus versiforme. Embora a desinfestação tenha sido eficaz, os autores observaram redução na taxa de germinação dos esporos.

Portanto, a escolha de um método de desinfestação depende da espécie de FMVA, seu local de origem e da natureza, concentração e tempo de exposição dos produtos empregados. Deve - se observar também que a desinfestação pode atuar sobre os proces sos metabólicos dos esporos, interferindo na germinação ou no crescimento subsequente das hifas.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Multiplicação e extração dos esporos

Os esporos dos FMVA Gigaspora margarita (Becker & Hall), Scutellospora heterogama (Nicol & Gerd) Walker & Sanders, Gigaspora gigantea (Nicol & Gerd) Gerd & Trappe e Glomus clarum (Nicol & Schenck) utilizados nos diversos experimentos, foram multiplicados em vasos de cultivo com Brachiaria decumbens em solo misturado com vermiculita na proporção 3:1, fumigado com Bromex (260 cc/m<sup>3</sup> de substrato) e mantidos em casa-de-vegetação durante pelo menos 4 meses. O solo e raízes foram retirados dos vasos, secos ao ar e armazenados em câmara fria entre 4 e 6°C até serem utilizados. Os esporos de S. heterogama e G. clarum utilizados foram obtidos diretamente de vasos de multiplicação mantidos em casa-de-vegetação. Os esporos foram extraídos por peneiramento úmido, em peneiras com malha de 0,720 e 0,105 mm de abertura, centrifugados em água a 3000 rpm durante 3 minutos e em sacarose 45% a 2000 rpm por 2 minutos, seguindo-se lavagens com forte jato de água. Após a extração os esporos foram selecionados pela aparência

e uniformidade, utilizando-se microscópio estereoscópico, sob aumento de 40 vezes e submetidos aos tratamentos de desinfestação conforme apresentados a seguir.

### 3.2. Tratamentos

A primeira fase do trabalho destinou-se à seleção de agentes desinfestantes para descontaminação dos esporos de G. margarita, sendo testados vários produtos, concentrações e tempo de exposição conforme apresentado no Quadro 1. As soluções desinfestantes foram preparadas a partir da diluição dos produtos em água destilada autoclavada, e aplicadas aos esporos com auxílio de seringas de vidro com capacidade para 20 ml, acopladas a unidades de filtração por membrana. Como tratamento controle utilizou-se a lavagem dos esporos em água destilada autoclavada, pelo maior tempo de exposição aplicado em cada ensaio. Após a aplicação dos tratamentos, os esporos foram submetidos a lavagens sucessivas com água destilada estéril e plaqueados em meio ágar-água 1% para germinação.

Na segunda fase, estudou-se os efeitos de vários antibióticos em diferentes concentrações e tempo de exposição, conforme Quadro 1, sobre a germinação e descontaminação de esporos de FMVA. O preparo das soluções de antibióticos e sua aplicação aos esporos, foram feitos da mesma maneira como descrito para a seleção de agentes desinfestantes. Como tratamento controle proce

QUADRO 1 - Agentes desinfestantes, antibióticos e respectivas concentrações e tempo de exposição estudados.

Produtos	Concentração	Tempo de Exposição, min.
————— Agentes desinfestantes —————		
. Hipoclorito de sódio solução P.A. contendo 5% cloro livre, Reagen	0,5 a 4,0% V/V	3 a 24
. Cloramina-T P.A., Riedel de-Häen	1 a 8 % P/V	3 a 24
. Cloreto de mercúrio P.A., Merck	0,025 a 0,2% P/V	20
. Formaldeído em solução 35% P.A. Merck	0,25 a 20% V/V	10 a 20
————— Antibióticos —————		
. Estreptomicina (Sulfato de estreptomicina) Fontoura-Wyeth	50 a 400 ppm	2,5 a 20
. Gentamicina (Garamicina injetável 80 mg) Schering	25 a 200 ppm	2,5 a 20
. Cloranfenicol (Quemicetina injetável) Schering	25 a 200 ppm	2,5 a 20
. Pimaracina (Pimaracin) suspensão 1,5%, Sigma	2,5 a 20 ppm	2,5 a 20
. Cefalosporina (Rocefin injetável) Roche	25 a 200 ppm	2,5 a 20

deu-se à lavagem dos esporos com água destilada autoclavada, pelo maior tempo de exposição, correspondente à lavagem com antibióticos em cada ensaio. Com exceção do antibiótico cefalosporina, todos os outros foram também testados por seus efeitos na desinfestação de S. heterogama. Após a aplicação dos tratamentos, os esporos foram plaqueados em meio ágar-água.

Para facilitar a seleção dos antibióticos mais eficazes na desinfestação, foram feitos antibiogramas, utilizando-se suspensões de bactérias isoladas de esporos de G. margarita. Para isto, discos de papel estéril contendo os antibióticos em concentrações variando de 2,5 a 200 ppm, foram colocados em placas contendo meio MB<sub>1</sub> (TUIITE, 65) inoculado com as bactérias, e incubados por 72 horas, na ausência de luz e com temperatura de 25 a 28°C. As placas foram avaliadas quanto à formação de halo de inibição do crescimento bacteriano sendo estes considerados ausentes (sem inibição), pequeno, médio e grande em função do seu diâmetro.

Na tentativa de melhorar a eficácia dos antibióticos, estudaram-se na terceira fase, várias combinações destes em lavagem dos esporos e incorporação ao meio de germinação, separadamente ou combinados com os desinfestantes, conforme descrito no Quadro 2. Os agentes desinfestantes e antibióticos selecionados nos experimentos anteriores (Quadro 1) foram estudados por seus e feitos combinados, ambos aplicados aos esporos em pré-lavagem ou os desinfestantes aplicados em pré-lavagem e os antibióticos incorporados ao meio em concentrações e tempo de exposição diversos conforme Quadro 2. O tratamento controle constou da lavagem dos esporos em água, e plaqueamento em meio de germinação (ágar-água)

QUADRO 2 - Diferentes combinações de desinfestantes e antibióticos em respectivas concentrações testadas. Tempo de exposição variando de 10 a 20 minutos, dependendo do ensaio.

Uso em Pré-lavagem	Uso incorporado ao meio	Concentração utilizada			
		HS %	CL, ppm	ES, ppm	GE, ppm
Cloranfenicol = CL	Estreptomicina = ES	-	25 e 50	25 e 50	-
CL + ES	-	-	25 e 50	25 e 50	-
CL	Gentamicina = GE	-	25 e 50	-	25 e 50
CL + GE	-	-	25 e 50	-	25 e 50
Hipoclorito de sódio = HS	ES	1 e 5	-	25 ; 50 e 100	-
HS + ES	-	1 e 5	-	25 e 50	-
HS	GE	1 e 5	-	-	25 e 50
HS + GE	-	1 e 5	-	-	25 e 50

sem antibióticos. O método tradicional relatado por MOSSE (38), que consta da lavagem dos esporos por 20 min. em solução contendo cloramina-T 2% e 200 ppm de estreptomicina, foi também comparado nestes experimentos. Todas as soluções foram preparadas e aplicadas como descrito nos experimentos anteriores, sendo a incorporação do antibiótico ao meio da germinação feita após a autoclavagem do ágar, quando a temperatura deste se encontrava próxima ao ponto de solidificação.

Os produtos mais promissores, nas concentrações pré selecionadas foram testados combinando-se o uso de agente desinfestante em pré-lavagem dos esporos, seguido da imersão dos mesmos nas soluções de antibióticos ou de agentes desinfestantes mais antibióticos, aplicados em diversos tempos. Esporos pré-lavados em hipoclorito de sódio a 1% por 20 min. foram submetidos à imersão em 100 ppm de estreptomicina ou 50 ppm de gentamicina por 0 min. a 48 hs ou em 100 ppm de estreptomicina mais 50 ppm de gentamicina por 20 min. a 48 hs, ou hipoclorito de sódio 1% mais 100 ppm de estreptomicina ou 50 ppm de gentamicina por 3 a 12 hs. No tratamento controle, os esporos foram pré-lavados e imersos em água, nos diferentes tempos utilizados. O método tradicional de desinfestação, MOSSE (38) também foi avaliado. As soluções e aplicação dos tratamentos foram feitos como descrito anteriormente. Nos experimentos finais, utilizaram-se esporos de G. margarita, G. gigantea e G. clarum.

Para testar a eficácia da desinfestação, esporos visivelmente assépticos, foram retirados das placas contendo meio de germinação e transferidos, com o auxílio de pinça, para placas

contendo meios para crescimento de fungos (Martin) e de bactérias ( $MB_1$ ), conforme TUIITE (65). Após incubação por 3 e 12 dias, para bactérias e fungos respectivamente, à temperatura de  $25^{\circ}C$ , a presença de crescimento fúngico ou bacteriano, indicativos de contaminação, foi avaliada.

### 3.3. Plaqueamento, condução e avaliação

Após a aplicação dos diversos tratamentos nos diferentes experimentos, grupos de 10 esporos foram transferidos para placas de vidro de 60 mm de diâmetro contendo meio de germinação (ágar-água 1%) com o auxílio de micropipeta, ou transferidos individualmente com o auxílio de pinça de ponta fina. Todo o plaqueamento foi realizado com o auxílio de microscópio estereoscópico montado em câmara asséptica de fluxo laminar. Após a transferência dos esporos as placas foram envolvidas com filme plástico para evitar a desidratação, e incubadas na ausência de luz, à temperatura de 25 a  $28^{\circ}C$  por 14 dias. Após período de incubação, a taxa de germinação dos esporos e a incidência de contaminantes (fungos e/ou bactérias) foram avaliados com o uso de microscópio estereoscópico. Considerou-se como germinados os esporos que emitiram pelo menos um tubo germinativo, e contaminados, aqueles que apresentaram quaisquer sinais de crescimento de fungos e/ou bactérias. Este mesmo critério foi utilizado para a contaminação dos esporos assépticos transferidos para meios de crescimento para

fungos e bactérias. Nos primeiros experimentos (seleção de agentes desinfestantes e antibióticos) a contaminação por bactérias foi avaliada considerando-se apenas o número de placas contaminadas, pois os esporos foram transferidos em grupos, e a proximidade entre eles possibilitava o crescimento de colônias sobre todos, dificultando a avaliação individual, como pôde ser realizada quando os esporos passaram a ser transferidos individualmente para o meio de germinação. Todos os ensaios foram montados com 5 repetições e foram repetidos por pelo menos duas vezes. O erro padrão da média foi calculado segundo PIMENTEL GOMES (15), dividindo-se o desvio padrão pela raiz quadrada do número de repetições de cada tratamento.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Agentes desinfestantes

Os efeitos do hipoclorito de sódio e cloramina-T em diferentes concentrações aplicadas aos esporos de G. margarita em lavagem por 5 e 10 minutos, respectivamente, são apresentados na Figura 1. Tanto a cloramina-T, quanto o hipoclorito de sódio atuaram negativamente sobre a germinação dos esporos. Entretanto, para a cloramina-T, aumentos na concentração não corresponderam a diminuições acentuadas na germinação como ocorreu com o hipoclorito de sódio, que inviabilizou os esporos quando em concentrações acima de 2%. Segundo PELCZAR et alii (43), os desinfestantes do grupo dos halogênios são agentes oxidantes enérgicos, que agem sobre os constituintes celulares provocando a morte dos microrganismos. A inviabilização causada pelo cloro se deve, em parte, à combinação deste com proteínas da membrana citoplasmática e enzimas. DANIELS & MENGE (10) observaram diminuição na pigmentação de esporos de Glomus epigaeum após exposição ao hipoclorito de sódio. Este efeito foi atribuído a processos de oxidação do agente desin-

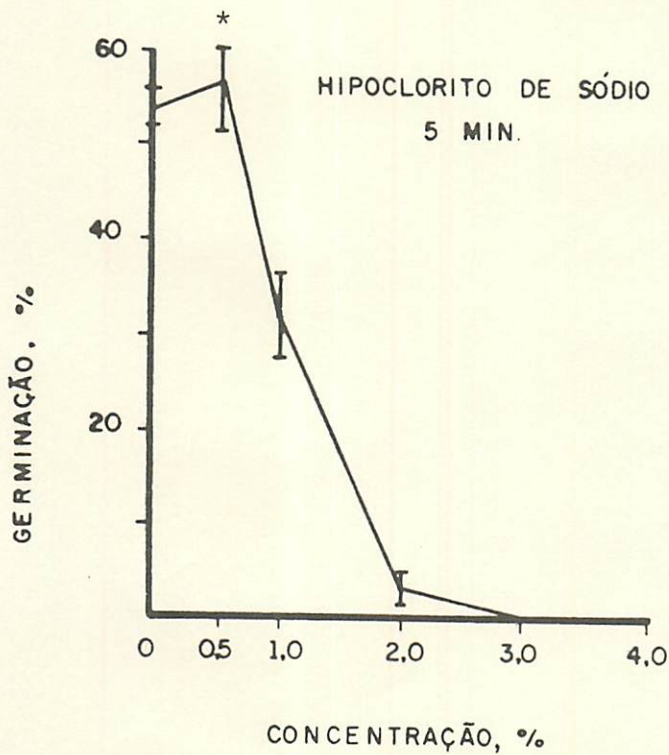
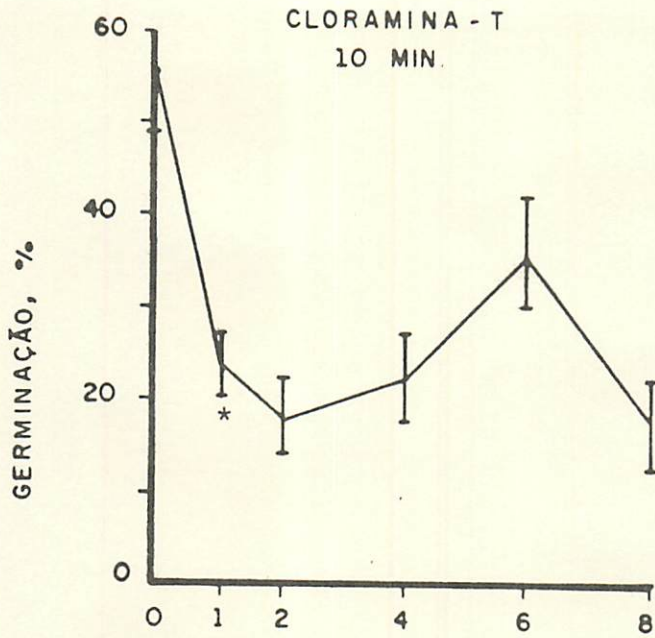


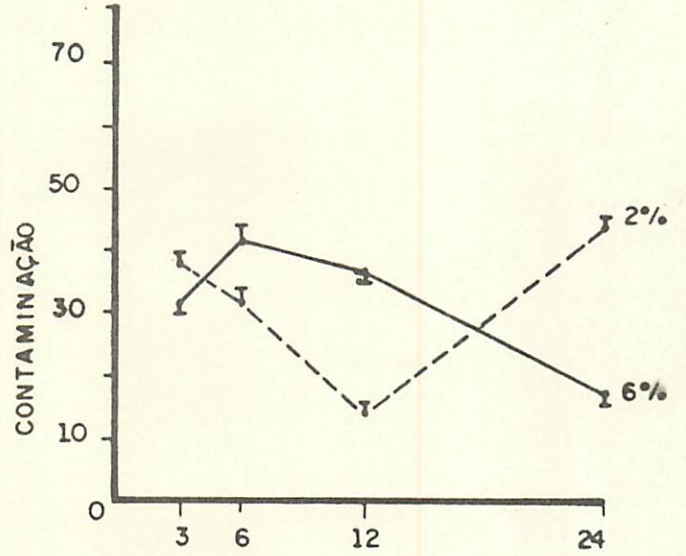
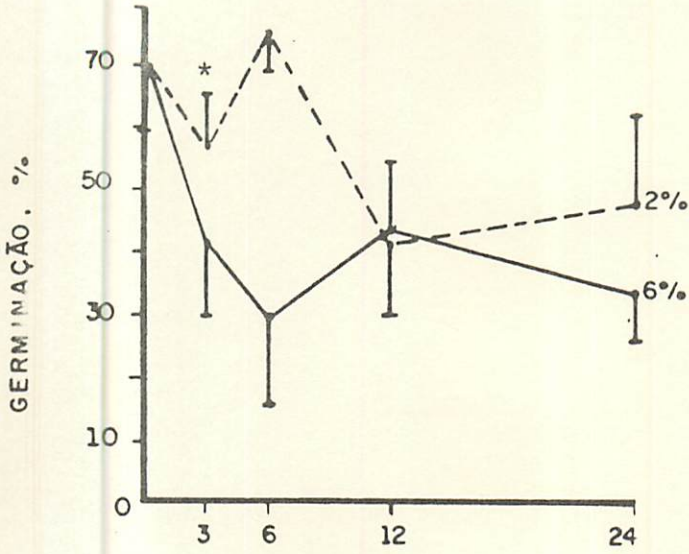
FIGURA 1 - Efeitos da lavagem com cloramina-T e hipoclorito de só dio, em diferentes concentrações, sobre a germinação dos esporos de G. margarita. \*Erro padrão da média.

festante com a melanina dos esporos.

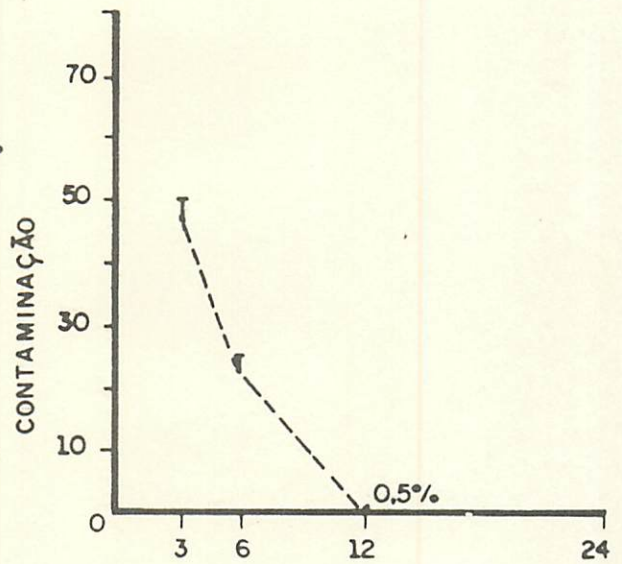
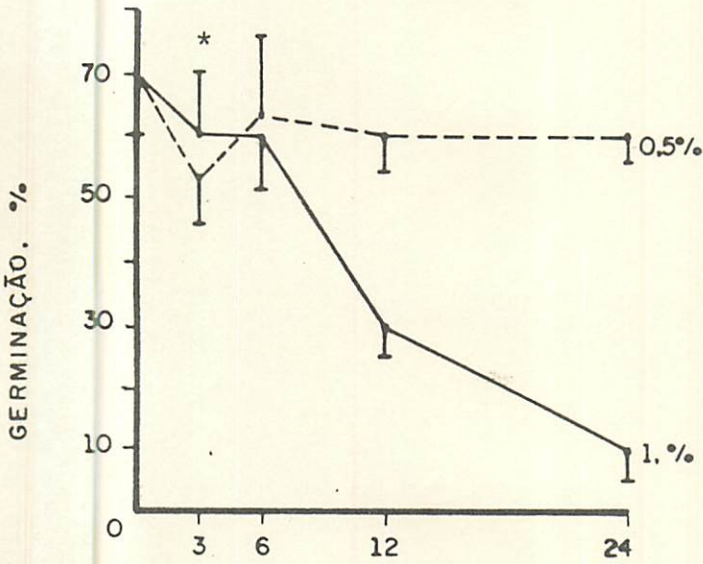
Os efeitos do tempo de exposição durante a lavagem dos esporos com cloramina-T ou hipoclorito de sódio, em duas concentrações, sobre a germinação e contaminação de esporos de G. margarita, são apresentados na Figura 2. Aumentos no tempo de exposição dos esporos ou na concentração dos agentes desinfestantes provocaram reduções na taxa de germinação, podendo as concentrações menores ser aplicadas aos esporos por mais tempo. Cloramina-T a 6% aplicada por 6 minutos reduziu a taxa de germinação em 57%. O uso de hipoclorito de sódio 1% por 24 minutos também reduziu a germinação. Entretanto, esta concentração foi capaz de promover a descontaminação dos esporos quando expostos a este desinfestante por pelo menos 3 minutos (Figura 2). Para cloramina-T, aumentos na concentração e no tempo de exposição reduziram a contaminação por fungos e bactérias. Segundo COLLINS (9) cloramina-T é um produto mais estável que hipoclorito de sódio, sendo a liberação do cloro feita de forma gradual e lenta. Como a exposição dos esporos ao desinfestante não se prolongou por muito tempo, é provável que não tenha ocorrido a liberação total do oxidante cloro, para uma ação eficaz na descontaminação. A liberação do cloro do hipoclorito de sódio é instantânea, COLLINS (9), e embora atue mais que a cloramina-T sobre a germinação dos esporos (Figuras 1 e 2), quando na concentração e tempo de exposição adequados poderia eliminar os contaminantes sem inviabilizar os esporos.

Dentro do grupo dos metais pesados e dos gasosos, o cloreto de mercúrio e o formaldeído, respectivamente, têm sido utilizados como desinfestantes, devido a seu poderoso efeito na e-

CLORAMINA - T



HIPOCLORITO DE SÓDIO



TEMPO DE EXPOSIÇÃO, min

FIGURA 2 - Efeitos do tempo de exposição durante a lavagem com agentes desinfestantes, em duas concentrações, na germinação e contaminação com fungos e bactérias em esporos de G. margarita. \*Erro padrão da média.

liminação de microrganismos. Neste trabalho, estes produtos foram pela primeira vez utilizados como desinfestantes de esporos de FMVA (Figura 3). Não houve crescimento de fungos contaminantes quando os esporos de G. margarita foram desinfestados com formaldeído ou cloreto de mercúrio, em todas as concentrações testadas. No tratamento controle a contaminação fúngica foi de 80%. Cloreto de mercúrio eliminou totalmente as bactérias, que foram apenas parcialmente eliminadas quando se usou formaldeído. Como ambos os desinfestantes reduziram drasticamente a taxa de germinação dos esporos, as possibilidades de sua utilização são pequenas. O cloreto de mercúrio, segundo PELCZAR et alii (43) age ligando-se às proteínas celulares e promovendo sua desnaturação. Segundo este autor, em concentrações menores que 0,1%, ele tem ação microbiosa-tática inibindo a germinação de esporos. Embora a germinação de G. margarita tenha sido reduzida (Figura 3) em até 87% na concentração de 0,1% de cloreto de mercúrio, sua inibição total somente foi observada em concentrações mais elevadas. Os microrganismos associados aos esporos parecem ser bem mais sensíveis aos efeitos do cloreto de mercúrio, uma vez que, independente da concentração utilizada (0,025 a 0,2%), nenhum microrganismo cresceu. Para o formaldeído, embora o efeito na germinação dos esporos tenha sido drástico (Figura 3) com redução de 100%, alguma contaminação bacteriana ocorreu, e foi tanto menor quanto maior a concentração aplicada. Algumas formas de bactérias esporuladas são bastante resistentes aos agentes desinfestantes, conforme COLLINS (9). O uso de formaldeído em concentrações menores que aquelas testadas na Figura 3 mostrou que, o tempo de exposição e elevação na concen -

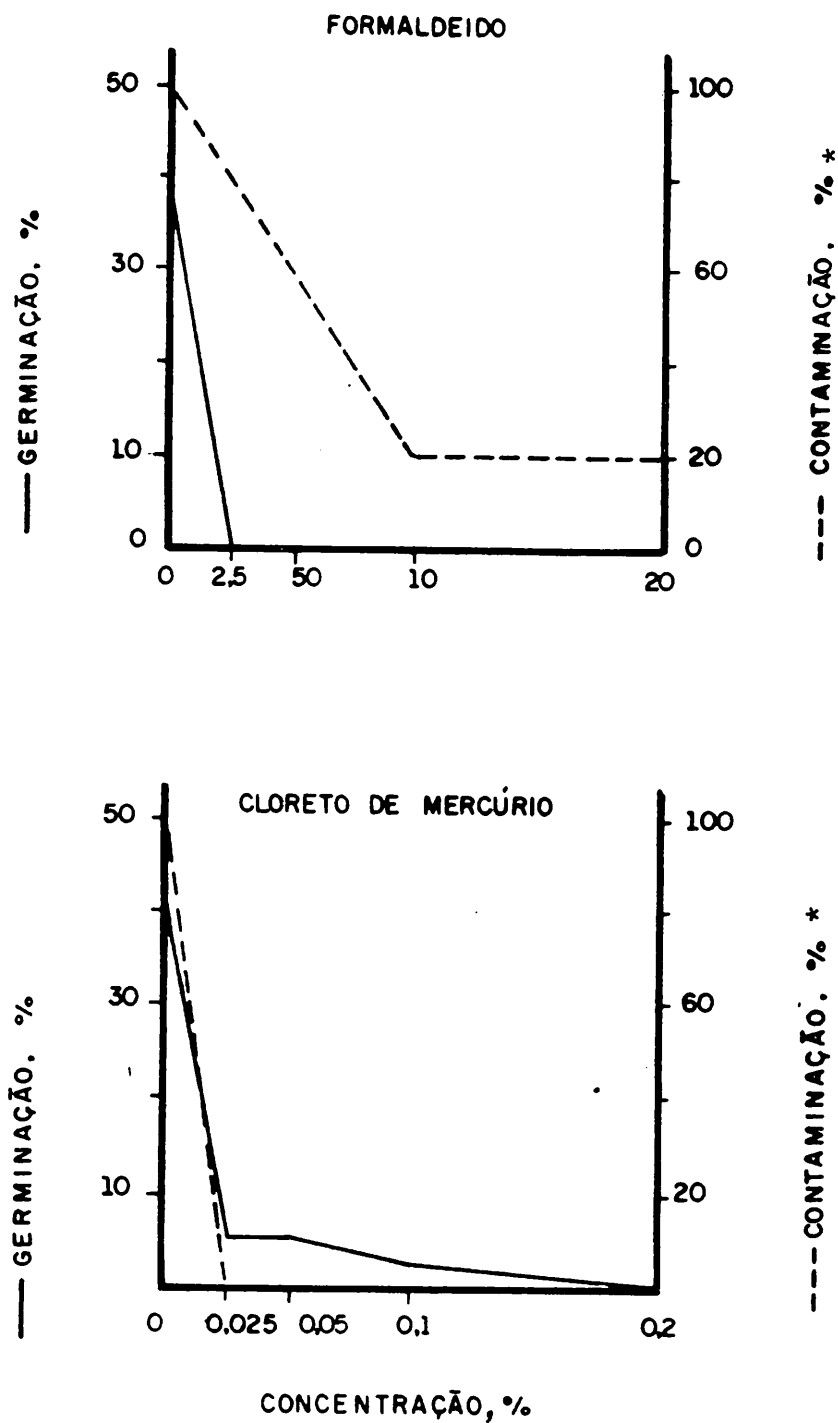


FIGURA 3 - Efeitos da lavagem com formaldeido e cloreto de mercúrio por 20 min., em diferentes concentrações, na germinação e contaminação de esporos de G. margarita. \*Placas contaminadas.

tração diminuíram a germinação de esporos de G. margarita sem efeitos sobre a contaminação bacteriana e aumentaram a contaminação com fungos (Figura 4). Estes dados confirmam os resultados do experimento anterior e mostram que a diluição da solução de formaldeído causou menor efeito sobre a germinação dos esporos e contaminação por bactérias. O aumento na contaminação com fungos (Figura 4) pode ser devido a sua ação diferenciada sobre os fungos e bactérias. Em uma população de microrganismos heterogênea como a que compõe a microbiota associada aos esporos de FMVA (3, 30, 55), a eliminação de microrganismos sensíveis poderia favorecer a proliferação daqueles menos sensíveis, por diminuir a competição ou mesmo atuar em relações de antagonismo que possam estar ocorrendo na esporosfera.

Portanto, dentre os agentes desinfestantes estudados para a eliminação dos microrganismos presentes na superfície dos esporos de G. margarita, o hipoclorito de sódio se mostrou o mais efetivo. Mesmo sendo um biocida potente, quando usado em concentrações entre 0,5 e 1% e tempo de exposição em torno de 20min. pode eliminar a microbiota associada aos esporos de fungos MVA, causando pouco dano aos esporos.

#### 4.2. Antibióticos

O uso de antibióticos para a desinfestação de esporos de FMVA é bastante difundido (19, 23, 38) e eles podem ser em

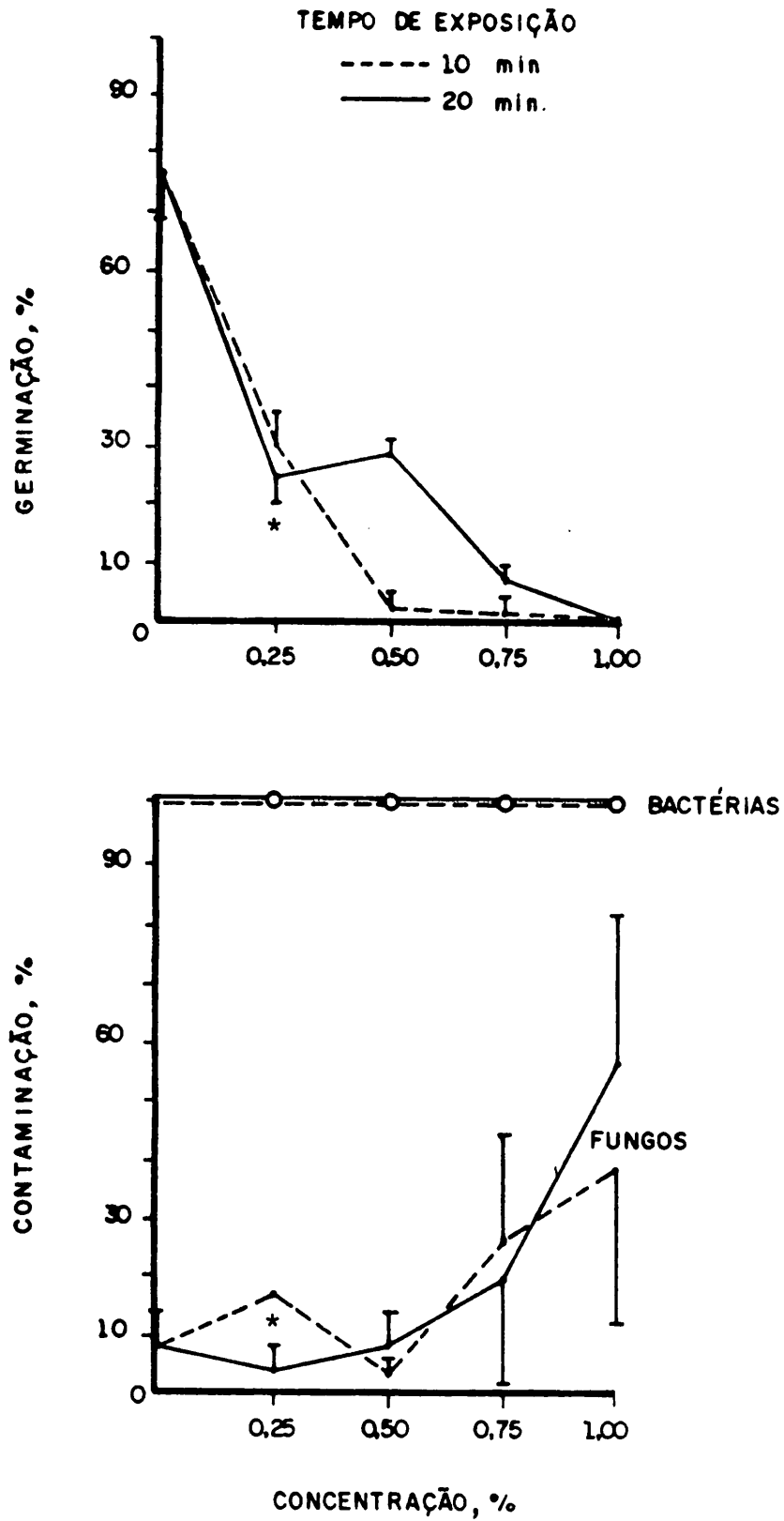


FIGURA 4 - Germinação e contaminação de esporos de G. margarita sob o efeito de formaldeído em diferentes concentrações e tempo de exposição. \*Erro padrão da média.

pregados tanto em lavagem dos esporos quanto incorporados ao meio, associados ou não a agentes desinfestantes. Nesta fase deste trabalho procurou-se avaliar os efeitos de diversos antibióticos sobre a germinação e contaminação de esporos. Na Figura 5 são apresentados os efeitos sobre a germinação de G. margarita e S. heterogama após lavagem por 10 minutos com antibióticos em diferentes concentrações. Todos os antibióticos utilizados tiveram efeito acentuado sobre a germinação, sendo este efeito diferenciado em função da espécie e das concentrações utilizadas. Estes resultados demonstram a complexidade das interações antibióticos - FMVA, pois estes fungos podem reagir diferentemente aos antibióticos (23, 33, 63). A germinação de G. margarita é mais sensível à ação dos antibióticos do que a de S. heterogama. O uso de gentamicina ou cloranfenicol reduziu a germinação de esporos G. margarita, sendo este efeito menos acentuado nas concentrações de 25 ppm para gentamicina e 100 ppm para cloranfenicol. Gentamicina a 25 e 50 ppm e cloranfenicol a 25 ppm tiveram pouco ou nenhum efeito sobre a germinação de S. heterogama. Os estudos de KLOPFENSTEIN (23) mostraram que 50 e 100 ppm de gentamicina incorporados ao meio tiveram efeitos inibitórios sobre a germinação de Glomus etunicatum, mas estes efeitos são aparentemente reversíveis. No presente trabalho observou-se inibição na germinação de G. margarita a partir de 25 ppm de gentamicina. O uso de cloranfenicol mesmo em baixas concentrações (25 ppm) inibiu sua germinação (Figura 5). Resultados semelhantes foram relatados por KLOPFENSTEIN (23) para Gigaspora rosea, onde tanto a germinação quanto o crescimento micelial foram inibidos por 35 ppm de cloranfenicol incorporados ao meio. O

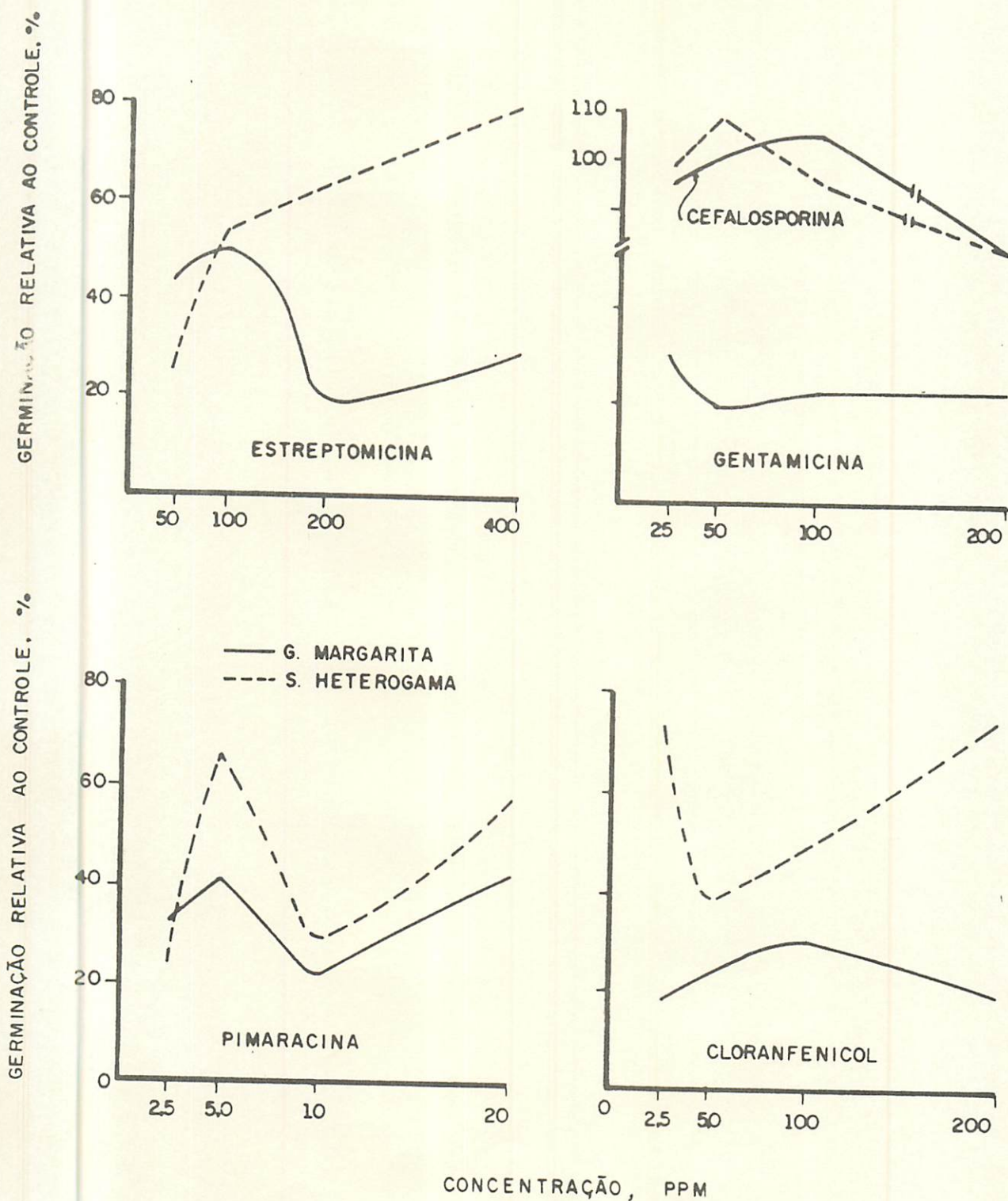


FIGURA 5 - Efeitos de antibióticos aplicados em lavagem por 10 min., em diferentes concentrações, sobre a germinação de esporos de Gigaspora margarita e Scutellospora heterogama.

uso de pimaracina, em concentrações acima de 5 ppm teve efeito mais acentuado sobre a germinação de G. margarita do que de S. heterogama. TOMMERUP & KIDBY (63) também verificaram redução na germinação de G. caledonium, quando os esporos foram incubados em placas contendo pimaracina incorporada ao meio de germinação. Efeitos bem diferentes foram observados quando os esporos foram lavados com solução de estreptomicina. Para G. margarita, aumentos na concentração deste antibiótico diminuíram a taxa de germinação, sendo este efeito menor nas concentrações de 50 e 100 ppm. Para S. heterogama, aumentos na concentração diminuíram os efeitos negativos sobre a germinação. À exceção da cefalosporina, todos os antibióticos utilizados causaram diminuição na germinação, sendo este efeito menor em alguns casos, como quando se utilizou estreptomicina 100 ppm.

Em procedimentos de desinfestação, além da concentração deve-se considerar o tempo de exposição aos produtos aplicados. Estes resultados são apresentados no Quadro 3. Como observado em experimentos anteriores, todos os antibióticos nos tempos de exposição testados diminuíram a germinação de G. margarita, com exceção da cefalosporina que teve pequeno efeito de inibição quando em concentrações elevadas. Seus efeitos sobre a contaminação foram pouco influenciados pelo tempo de exposição (Quadro 3). Estreptomicina 50 ppm exerceu certo controle sobre os fungos contaminantes, sendo este efeito beneficiado por aumentos no tempo de exposição. No entanto, não foi observado controle sobre a população de bactérias. Na concentração utilizada este produto parece necessitar de maior tempo de exposição para eliminar as bactérias.



QUADRO 3 - Efeitos da lavagem com antibióticos em diferentes tempos de exposição, sobre a germinação e contaminação de esporos de Gigaspora margarita.

Antibióticos (concentração)	Tempo de ex- posição, min.	Germinação %	Contaminação, %	
			Fungos	Bactérias**
Streptomomicina (50 ppm)	0,0	70 ± 4*	100 ± 0	100
	2,5	38 ± 6	80 ± 20	100
	5,0	42 ± 11	74 ± 19	100
	10,0	34 ± 8	76 ± 19	100
	20,0	47 ± 8	27 ± 19	100
Gentamicina (25 ppm)	0,0	70 ± 4	100 ± 0	100
	2,5	39 ± 5	100 ± 0	20
	5,0	30 ± 12	75 ± 15	20
	10,0	55 ± 10	30 ± 18	0
	20,0	27 ± 2	88 ± 7	40
Pimaracina (5 ppm)	0,0	70 ± 4	100 ± 0	100
	2,5	56 ± 9	52 ± 22	80
	5,0	64 ± 9	100 ± 0	80
	10,0	56 ± 16	54 ± 23	60
	20,0	52 ± 10	77 ± 14	80
Cloranfenicol (50 ppm)	0,0	70 ± 4	100 ± 0	100
	2,5	41 ± 12	64 ± 22	60
	5,0	52 ± 11	22 ± 20	80
	10,0	57 ± 6	47 ± 18	80
	20,0	47 ± 6	86 ± 14	40
Cefalosporina (100 ppm)	0,0	54 ± 9	78 ± 11	100
	2,5	69 ± 6	50 ± 20	80
	5,0	58 ± 19	68 ± 20	80
	10,0	41 ± 14	51 ± 19	60
	20,0	48 ± 12	68 ± 20	80

\* Erro padrão da média

\*\* Placas contaminadas.

Tanto pimaracina quanto cloranfenicol atuaram na eliminação das bactérias, sendo este efeito independente do tempo de exposição. O uso de gentamicina 25 ppm por 10 minutos eliminou as bactérias dos esporos de G. margarita.

A possibilidade de utilização dos antibióticos em lavagem ou incorporação ao meio de germinação foi investigada utilizando-se cloranfenicol em lavagem associado ou não a estreptomicina ou gentamicina, como também o uso destes últimos incorporados ao meio, conforme apresentado no Quadro 4. Nenhum dos tratamentos exerceu efeito acentuado na germinação dos esporos de G. margarita. Por outro lado, sempre que se incorporou antibiótico ao meio a contaminação com bactérias foi reduzida, sendo o melhor controle de bactérias obtido quando os esporos foram lavados com cloranfenicol 50 ppm por 10 minutos e plaqueados em meio contendo estreptomicina ou gentamicina 50 ppm. Mesmo assim, 20% das placas apresentaram contaminação. O uso combinado de cloranfenicol e estreptomicina em lavagem dos esporos não se mostrou promissor, uma vez que não controlou as bactérias contaminantes. Segundo COLLINS (9), a incorporação de antibióticos ao meio é um método eficiente para controlar o crescimento de microrganismos que sobrevivem ao tratamento de desinfestação. Considerando o efeito dos antibióticos sobre a germinação de esporos de FMVA, a incorporação destes ao meio como passo seguinte a um pré-tratamento de desinfestação parece promissora.

Na tentativa de esclarecer melhor os efeitos dos antibióticos sobre os esporos dos FMVA, foram realizados antibiogramas utilizando-se estes produtos e bactérias isoladas dos pró-

QUADRO 4 - Efeitos do uso combinado de antibióticos na germinação e contaminação de esporos de Gigaspora margarita.

Uso em lavagem por 10 min.	Uso incorporado ao meio	Germinação %	Contaminação %	
			Fungos	Bactérias**
Cloranfenicol 50 ppm (CL)	Estreptomicina 50 ppm(ES)	46 ± 5*	43 ± 25	20
CL 50 + ES 50	Nenhum	50 ± 5	0	100
CL 25 + ES 25	Nenhum	51 ± 7	0	100
CL 50 + ES 25	Estreptomicina 25 ppm	46 ± 6	19 ± 20	40
Cloranfenicol 25 ppm	ES 50	62 ± 8	27 ± 20	40
CL 50	ES 25	50 ± 8	62 ± 20	40
CL 50	Gentamicina 50 ppm (GE)	49 ± 9	80 ± 20	20
CL 50 + GE 50	Nenhum	73 ± 4	100 ± 0	60
CL 25 + GE 25	Nenhum	80 ± 5	30 ± 19	80
CL 50 + GE 25	Gentamicina 25 ppm	61 ± 7	88 ± 16	60
CL 25	GE 50	54 ± 13	17 ± 14	60
CL 50	GE 25	46 ± 2	45 ± 10	80
	Controle - sem antibiótico	58 ± 5	24 ± 9	100

\* Erro padrão da média

\*\* Placas contaminadas.

prios esporos conforme apresentado no Quadro 5. Cloranfenicol, pimaracina e cefalosporina não tiveram efeito sobre as bactérias. Estreptomomicina e gentamicina inibiram o crescimento das bactérias isoladas dos esporos, e este efeito foi tanto maior quanto maior a concentração utilizada no antibiograma.

Baseando-se nos efeitos sobre a germinação e contaminação de esporos de G. margarita, e a capacidade de inibir o crescimento de bactérias isoladas destes esporos, o uso de estreptomomicina (50 e 100 ppm) ou gentamicina (25 e 50 ppm) se mostrou promissor para uso combinado com o desinfestante selecionado nos experimentos anteriores.

#### 4.3. Uso combinado de desinfestante e antibióticos

Os efeitos do uso combinado de agente desinfestante e antibióticos sobre a germinação e contaminação dos esporos de G. margarita são apresentados no Quadro 6. O uso de hipoclorito de sódio a 0,5 ou 1% em pré-lavagem dos esporos por 10 min., associado ao uso de estreptomomicina 25 ou 50 ppm em lavagem ou incorporada ao meio de germinação, não tiveram efeito sobre a germinação dos esporos. O mesmo tratamento em pré-lavagem porém com gentamicina 25 e 50 ppm em pré-lavagem ou incorporada ao meio diminuiu a germinação dos esporos, fato também verificado por KLOPFENSTEIN (23) trabalhando com Glomus etunicatum. Verificou-se em todos os tratamentos diminuições na contaminação com bactérias, e este e-

QUADRO 5 - Ação inibitória de antibióticos sobre o crescimento de bactérias isoladas de esporos de G. margarita. Antibiograma.

Antibiótico	Concentração ppm	Halo de inibição
Estreptomicina	25	pequeno
	50	médio
	100	médio
	200	grande
Gentamicina	25	pequeno
	50	médio
	100	grande
	200	grande
Cloranfenicol	25	ausente
	50	ausente
	100	ausente
	200	ausente
Pimaracina	2,5	ausente
	5,0	ausente
	10,0	ausente
	20,0	ausente
Cefalosporina	25	ausente
	50	ausente
	100	ausente
	200	ausente

QUADRO 6 - Efeitos do uso combinado de agente desinfestante e antibióticos sobre a germinação e contaminação de esporos de Gigaspora margarita.

Uso em lavagem por 10 min.	Uso incorporado ao meio	Germinação	Contaminação, %	
		%	Fungos	Bactérias**
	Sem desinfestação	63 ± 6*	74 ± 9	100
Hipoclorito de sódio 1% (HS)	Estreptomicina 50 ppm(ES)	67 ± 8	0	20
HS1 + ES 50	Nenhum	61 ± 7	74 ± 17	40
HS 0,5 + ES 25	Nenhum	59 ± 6	79 ± 18	80
HS1 + ES 25	Estreptomicina 25 ppm	51 ± 10	80 ± 20	0
Hipoclorito de sódio 0,5%	ES 50	68 ± 5	42 ± 23	0
HS1	ES 25	61 ± 5	23 ± 20	0
HS1	Gentamicina 50 ppm (GE)	34 ± 1	22 ± 20	60
HS1 + GE 50	Nenhum	39 ± 8	75 ± 18	40
HS 0,5 + GE 25	Nenhum	40 ± 3	75 ± 19	100
HS1 + GE 25	Gentamicina 25 ppm	43 ± 8	43 ± 26	60
HS 0,5	GE 50	48 ± 4	0	20
HS1	GE 25	46 ± 5	34 ± 18	20

\* Erro padrão da média

\*\* Placas contaminadas.

feito foi menor naqueles onde utilizou-se combinação nas concentrações mais baixas e aplicados aos esporos em lavagem (Quadro 6). O uso simultâneo de desinfestantes e antibióticos em lavagem também não se mostrou efetivo na eliminação dos contaminantes fúngicos, a menos que 25 ppm de gentamicina fosse incorporado ao meio. O mesmo tratamento porém utilizando-se 25 ppm de estreptomina não foi efetivo. O uso combinado de agentes desinfestantes e antibióticos simultaneamente nem sempre traz resultados satisfatórios, pois um componente na mistura pode interferir na atividade do outro, conforme discutido por LACAZ (25). Estas afirmações concordam com os resultados obtidos (Quadro 6), quando se misturou hipoclorito de sódio e antibióticos em solução única destinada à lavagem dos esporos. Assim, a lavagem dos esporos com agente desinfestante seguido da incorporação de gentamicina ou estreptomina ao meio são mais eficientes para reduzir ou eliminar a contaminação dos esporos com fungos ou bactérias, do que o uso destes produtos em lavagem (Quadro 7). Em todos os tratamentos onde foi utilizada a lavagem dos esporos com hipoclorito de sódio 1% por 20 min., e o plaqueamento destes em meio contendo estreptomina 50 e 100 ppm ou gentamicina 50 ppm, nenhuma contaminação ocorreu. Esporos de G. margarita expostos à gentamicina germinaram menos que aqueles expostos à estreptomina, confirmando os dados iniciais (Figura 5). O aparente estímulo na germinação dos esporos quando tratados com estreptomina, pode ser resultado da eliminação de microrganismos antagonistas presentes na superfície do esporo. SYLVIA & SCHENCK (59) e SIQUEIRA et alii (55) estudando o efeito da contaminação sobre a germinação encontraram

QUADRO 7 - Efeitos do uso combinado de agente desinfestante e antibióticos sobre a germinação e contaminação de esporos de FMVA.

Uso em lavagem por 20 min.	Uso incorporado ao meio	Germinação %	Contaminação,%	
			Fungos	Bactérias
<u>Ensaio A, <i>Gigaspora margarita</i></u>				
	Sem desinfestação	69 ± 6*	44 ± 11	100 ± 0
	Tradicional (Mosse, 1959)	64 ± 9	10 ± 4	10 ± 4
Hipoclorito de sódio, 1%	Estreptomicina, 100 ppm	80 ± 7	0	0
Hipoclorito de sódio, 0,5%	Estreptomicina, 100 ppm	68 ± 6	24 ± 11	0
Hipoclorito de sódio, 1%	Estreptomicina, 50 ppm	80 ± 3	0	0
Hipoclorito de sódio, 1%	Gentamicina, 50 ppm	62 ± 6	0	0
Hipoclorito de sódio, 0,5%	Gentamicina, 50 ppm	58 ± 7	0	0
Hipoclorito de sódio, 1%	Gentamicina, 25 ppm	66 ± 9	6 + 4	0
<u>Ensaio B, <i>Gigaspora margarita</i></u>				
	Sem desinfestação	54 ± 5	54 ± 12	94 ± 11
Hipoclorito de sódio, 1%	Estreptomicina, 100 ppm	58 ± 7	0	0
Hipoclorito de sódio, 1%	Gentamicina, 50 ppm	50 ± 17	0	0
<u><i>Gigaspora gigantea</i></u>				
	Sem desinfestação	98 ± 2	40 ± 4	54 ± 2
Hipoclorito de sódio, 1%	Estreptomicina, 100 ppm	100 ± 0	0	0
Hipoclorito de sódio, 1%	Gentamicina, 50 ppm	100 ± 0	10 ± 4	9 ± 4

\* Erro padrão da média.

correlação negativa entre contaminação por fungos e a germinação dos esporos de FMVA. A presença de fungos somente foi observada quando se usou hipoclorito de sódio ou gentamicina nas menores concentrações (0,5 e 25 ppm respectivamente). Os microrganismos contaminantes foram totalmente eliminados quando se usou a lavagem dos esporos com hipoclorito de sódio 1% seguido do plaqueamento destes em meio contendo 100 ppm de estreptomicina. Esporos de G. gigantea submetidos a este tratamento também não apresentaram contaminações nem inibição na germinação. Resultados semelhantes foram obtidos por KOSKE (24), que não observou inibição na germinação de G. gigantea após tratamento com 100 ppm de estreptomicina ou 50 ppm de gentamicina. Portanto, a lavagem dos esporos com hipoclorito de sódio 1% por vinte minutos seguida do plaqueamento destes em ágar-água 1% contendo 100 ppm de estreptomicina eliminou ou inibiu completamente o crescimento dos contaminantes de G. margarita e G. gigantea, sem afetar sua germinação.

Embora eficaz, a incorporação de antibióticos ao meio apresenta limitações, especialmente quando os estudos com FMVA envolvem aspectos nutricionais, considerando-se que a incorporação de antibióticos ao meio enriquecido pode interferir nos resultados. Assim, um método de desinfestação que não requer a incorporação de antibióticos ao meio seria de maior aplicabilidade.

Utilizando-se hipoclorito de sódio 1% por 20 min. em lavagem e estreptomicina, 100 ppm ou gentamicina, 50 ppm em imersão dos esporos, foi feito um estudo do tempo de exposição destes aos antibióticos, conforme apresentado no Quadro 8. A imersão dos esporos em água ou em solução contendo antibióticos, por períodos

QUADRO 8 - Efeitos do tempo de imersão dos esporos em soluções de antibióticos após pré-lavagem com hipoclorito de sódio 1% por 20 min., sobre a germinação e contaminação de esporos de G. margarita.

Imersão	Germinação	Contaminação, %	
		Fungos	Bactérias
----- 20 min. -----			
Água	48 ± 2*	56 ± 13	100 ± 6
Estreptomicina, 100 ppm	44 ± 7	24 ± 12	32 ± 7
Gentamicina, 50 ppm	42 ± 5	20 ± 7	14 ± 9
Estreptomicina, 100 ppm + Gentamicina, 50 ppm	48 ± 5	40 ± 7	36 ± 4
----- 24 horas -----			
Água	6 ± 4	32 ± 6	78 ± 4
Estreptomicina, 100 ppm	0	0	0
Gentamicina, 50 ppm	0	0	0
Estreptomicina, 100 ppm + Gentamicina, 50 ppm	4 ± 2	0	0
----- 48 horas -----			
Água	4 ± 2	22 ± 4	100 ± 0
Estreptomicina, 100 ppm	0	0	0
Gentamicina, 50 ppm	0	0	0
Estreptomicina, 100 ppm + Gentamicina, 50 ppm	0	0	0

\* Erro padrão da média.

superiores a 24 horas, teve efeito negativo drástico sobre sua germinação. A imersão destes por 20 min. não teve efeito sobre a germinação. Vários autores, MERTZ et alii (33) e BECARD & FORTIN (4), têm utilizado o armazenamento dos esporos a 4°C por meses em solução contendo antibióticos, sem perder a viabilidade. É possível que o armazenamento em soluções a baixas temperaturas reduza a atividade biológica dos esporos, diminuindo os efeitos sobre o processo germinativo dos FMVA. Como no presente estudo a imersão dos esporos em água ou soluções de antibióticos foi feita à temperatura ambiente, é possível que os esporos nestas condições tenham iniciado o processo de germinação alterando a permeabilidade de paredes, favorecendo a penetração e atuação dos antibióticos. Nenhuma contaminação com fungos ou bactérias ocorreu quando os esporos foram imersos por mais de 24 horas em soluções contendo antibióticos. Comparado com os esporos de FMVA, observa-se que os contaminantes, especialmente as bactérias, sobreviveram melhor à imersão.

Embora o uso de hipoclorito de sódio 1% por 20 min. em pré-lavagem dos esporos seguido da imersão destes por 20 min. em 100 ppm de estreptomicina ou 50 ppm de gentamicina, tenha promovido algum controle dos contaminantes, sua eliminação total não foi alcançada (Quadro 8). O uso de estreptomicina e gentamicina simultaneamente em solução promoveu o menor controle dos contaminantes, efeito também observado (Quadro 6) e discutido anteriormente. O melhor efeito da estreptomicina ou gentamicina sobre a descontaminação dos esporos poderia ser obtido quando o tempo de exposição variasse entre 20 minutos e 12 horas (Quadro 9). Com ex

QUADRO 9 - Efeitos do uso combinado de agente desinfestante e antibióticos, em lavagem ou imersão por diferentes tempos de exposição, sobre a germinação e contaminação de esporos de G. margarita.

Uso em lavagem por 20 min.	Uso por imersão	Germinação	Contaminação, %	
		%	Fungos	Bactérias
	— 3 horas —			
Água	Água	48 ± 7*	54 ± 10	98 ± 2
Nenhum	Hipoclorito de sódio 1% + estreptomicina 100ppm	6 ± 4	0	0
Hipoclorito de sódio, 1%	Estreptomicina 100 ppm	44 ± 5	0	0
Nenhum	Hipoclorito de sódio 1% + gentamicina 50 ppm	0	0	0
Hipoclorito de sódio, 1%	Gentamicina 50 ppm	36 ± 8	0	0
	— 6 horas —			
Água	Água	58 ± 4	28 ± 4	94 ± 1
Nenhum	Hipoclorito de sódio 1% + estreptomicina 100ppm	2 ± 2	0	0
Hipoclorito de sódio, 1%	Estreptomicina 100 ppm	50 ± 11	0	0
Nenhum	Hipoclorito de sódio 1% + gentamicina 50 ppm	0	0	0
Hipoclorito de sódio, 1%	Gentamicina 50 ppm	34 ± 8	0	0
	— 12 horas —			
Água	Água	56 ± 2	52 ± 10	100 ± 0
Nenhum	Hipoclorito de sódio 1% + estreptomicina 100ppm	0	0	0
Hipoclorito de sódio, 1%	Estreptomicina 100 ppm	56 ± 10	0	0
Nenhum	Hipoclorito de sódio 1% + gentamicina 50 ppm	0	0	0
Hipoclorito de sódio, 1%	Gentamicina 50 ppm	42 ± 2	0	0

\* Erro padrão da média.

QUADRO 10 - Efeitos da pré-lavagem em hipoclorito de sódio 1% por 20 min., seguida da imersão em antibióticos por diferentes tempos, sobre a germinação e contaminação de esporos de G. margarita.

Tratamento	Duração da imersão, min.	Germinação	Contaminação, %	
			Fungos	Bactérias
Água		66 ± 8**	64 ± 15	66 ± 12
Tradicional - Mosse, 1959*		74 ± 8	8 ± 4	10 ± 4
Estreptomina 100 ppm	0	56 ± 9	0 ± 0	0 ± 0
	15	56 ± 8	4 ± 4	0 ± 0
	30	74 ± 8	0 ± 0	0 ± 0
	60	74 ± 5	0 ± 0	0 ± 0
	120	58 ± 8	0 ± 0	0 ± 0
	180	56 ± 7	0 ± 0	0 ± 0
Gentamicina 50 ppm	0	46 ± 7	0 ± 0	0 ± 0
	15	38 ± 4	0 ± 0	0 ± 0
	30	46 ± 5	0 ± 0	0 ± 0
	60	46 ± 7	0 ± 0	0 ± 0
	120	40 ± 3	0 ± 0	0 ± 0
	180	42 ± 7	0 ± 0	0 ± 0

\* Lavagem dos esporos por 20 minutos em solução de cloramina-T a 2% + 200 ppm de estreptomina.

\*\* Erro padrão da média.

ção da imersão em soluções contendo antibiótico e hipoclorito de sódio 1%, nenhum efeito sobre a germinação foi observada quando imersos por até 12 horas. Soluções contendo hipoclorito de sódio 1% e 100 ppm de estreptomicina ou 50 ppm de gentamicina tiveram acentuado efeito inibitório sobre a germinação dos esporos, sendo este efeito maior para gentamicina e dependente do tempo de imersão. A aplicação de solução contendo hipoclorito de sódio 1% mais 100 ppm de estreptomicina por 3 horas reduziu a taxa de germinação dos esporos em aproximadamente 87%. Em nenhum dos tratamentos utilizados foram observadas contaminações, evidenciando sua eficácia na descontaminação dos esporos. O efeito da imersão dos esporos por até 3 horas em soluções de antibióticos, após lavagem destes com hipoclorito de sódio 1% por 20 minutos são apresentados no Quadro 10. Com exceção da gentamicina que inibiu a germinação, nenhum efeito sobre a germinação foi observado. Assim, o uso de hipoclorito de sódio 1% em pré-lavagem, seguida da imersão em solução de estreptomicina ou gentamicina por até 180 minutos parece não atuar sobre a germinação. Embora contaminação com fungos tenha ocorrido quando se imergiu os esporos por apenas 15 minutos em solução contendo 100 ppm de estreptomicina, a descontaminação parece ser pouco influenciada por estes intervalos de tempo. O método tradicional não teve efeito sobre a germinação, mas os esporos apresentaram 8 e 10% de contaminação com fungos e bactérias, respectivamente. Portanto, maior eficácia na descontaminação foi obtida através da pré-lavagem dos esporos com hipoclorito de sódio 1% por 20 min. seguida da lavagem com solução de 100 ppm de estreptomicina ou 50 ppm de gentamicina por até 180 minutos. Em

bora não tenha ficado evidente a influência do tempo de imersão dos esporos sobre a descontaminação, os antibióticos agem por contacto, sendo necessário um tempo mínimo para que possam atuar com eficácia, COLLINS (9). A influência do tempo foi novamente estudada sendo os resultados apresentados na Figura 6. Exceto para o método relatado por Mosse, MOSSE (38), que reduziu a germinação de G. clarum, nenhum procedimento afetou a germinação, evidenciando comportamento diferenciado dos FMVA aos diferentes produtos e procedimentos utilizados para desinfestação superficial. Segundo SYLVIA & SCHENCK (59), a germinação in vitro de clamidosporos de Glomus é relativamente baixa. A baixa taxa de germinação observada quando se desinfestou esporos de G. clarum com o método usado por Mosse, MOSSE (38) pode inviabilizar estudos in vitro com esta espécie, porque nestes estudos a desinfestação é fundamental. Portanto, este método não seria aplicável à desinfestação de esporos de G. clarum. Pequenas variações na taxa de germinação podem ser decorrentes da eliminação dos microrganismos associados ao esporo ou efeitos do próprio tratamento sobre o esporo.

Assim como os FMVA, os microrganismos associados aos esporos parecem ter susceptibilidade diferenciada aos produtos ou métodos usados para desinfestação. O método Mosse, MOSSE (38) eliminou fungos contaminantes de G. gigantea e G. clarum, mas não foi efetivo na eliminação de fungos associados a G. margarita. Em todas as espécies desinfestadas com este método ocorreram bactérias, ao contrário da desinfestação com procedimentos 1 (pré-lavagem com hipoclorito de sódio 1% por 20 min. seguida da lavagem em 100 ppm de estreptomicina ou 50 ppm de gentamicina) ou pro

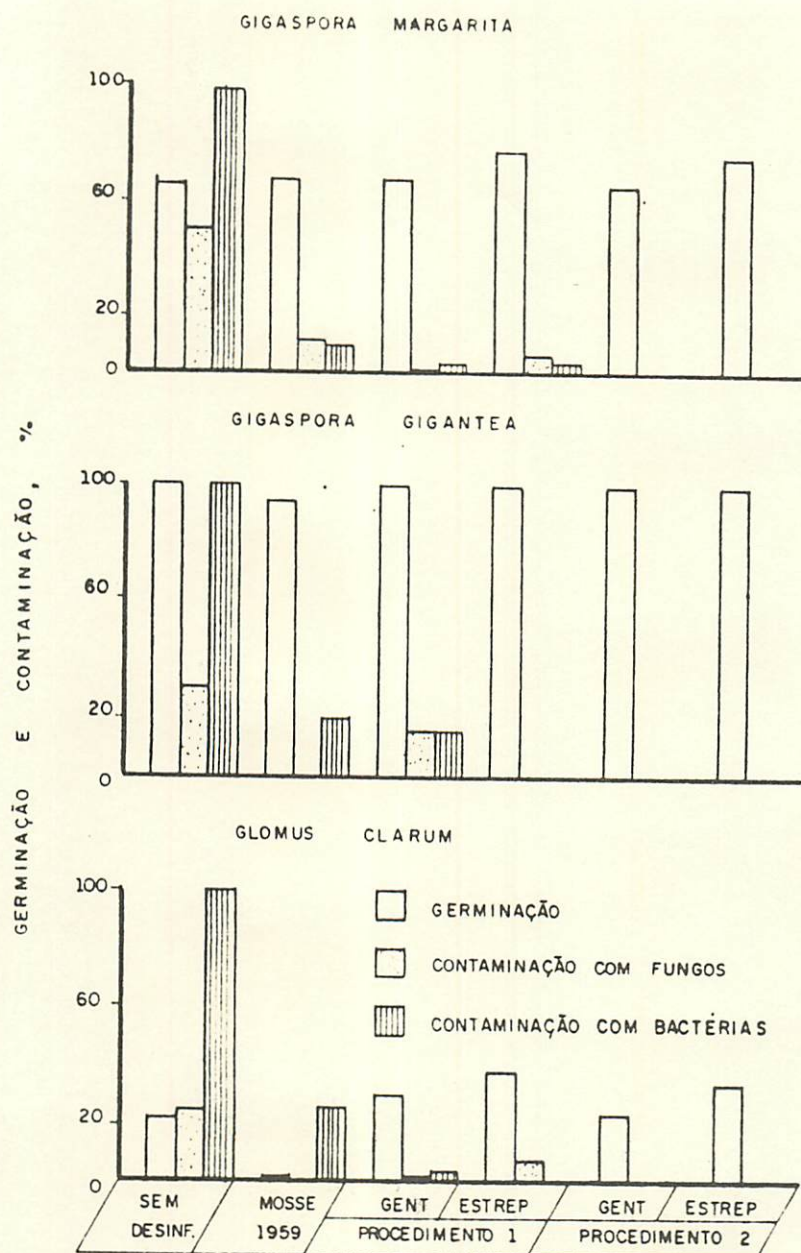


FIGURA 6 - Taxas de germinação e contaminação de esporos, sem desinfestação, desinfestados pelo método de Mosse, MOSSE (38) e outros procedimentos. Procedimentos 1 e 2, correspondem à pré-lavagem em hipoclorito de sódio 1% por 20 min., seguido de imersão por 0 e 30 min. em solução de antibiótico, respectivamente. Gent = gentamicina 50 ppm, Estrep = estreptomicina 100 ppm. Médias de 10 repetições (100 esporos).

cedimento 2 (pré-lavagem com hipoclorito de sódio 1% por 20 minutos seguida da imersão por 30 minutos em solução contendo 100 ppm de estreptomicina ou 50 ppm de gentamicina). Os procedimentos 1 e 2 diferiram entre si somente quanto à capacidade de eliminar os contaminantes, sendo o procedimento 2 superior ao método Mosse, MOSSE (38) e ao procedimento 1. Para o procedimento 1, somente se conseguiu assepsia total quando se lavou esporos de G. gigantea com 100 ppm de estreptomicina. No procedimento 2, nenhuma contaminação com fungos ou bactérias foi observada, independente dos FMVA utilizados, mesmo quando esporos assépticos foram transferidos para meios seletivos específicos para crescimento de fungos e bactérias (Quadro 11). Ao contrário, tanto no método Mosse, MOSSE (38) quanto no procedimento 1 de desinfestação foram observadas contaminações com fungos e/ou bactérias. O método Mosse, MOSSE (38) somente foi eficiente em eliminar a contaminação de esporos de G. clarum, enquanto que no procedimento 1 para todas as espécies testadas, nenhuma contaminação no meio de Martin foi observada quando se usou 50 ppm de gentamicina.

A eliminação dos microrganismos associados aos esporos precisa de um tempo mínimo de contacto entre os antibióticos e a superfície dos esporos, e a imersão no tempo 0 (zero) pode ser suficiente apenas para eliminar alguns microrganismos mais susceptíveis, enquanto outros mais resistentes só seriam eliminados através da exposição dos esporos por mais tempo à solução de antibióticos, como ocorreu com 30 min.

Portanto, para a eliminação de contaminantes superficiais de esporos de FMVA, recomenda-se a lavagem dos esporos

QUADRO 11 - Taxas de contaminação (proporção de placas contaminadas) de esporos de FMVA em meio para crescimento de fungos (Martin) ou bactérias (MB<sub>1</sub>), após desinfestação superficial pelo método tradicional, MOSSE (38), ou conforme procedimentos 1 e 2\*.

Espécie FMVA	Meio			
	Martin	MB <sub>1</sub>	Martin	MB <sub>1</sub>
	————— Mosse, 1959 —————			
<u>G. margarita</u>	0	1/3		
<u>G. gigantea</u>	2/3	2/3		
<u>G. clarum</u>	0	0		
	— Procedimento 1 (imersão, 0 min.) —			
	Gentamicina, 50ppm		Estreptomicina, 100ppm	
<u>G. margarita</u>	0	1/3	2/3	1/3
<u>G. gigantea</u>	0	2/3	2/3	3/3
<u>G. clarum</u>	0	1/3	1/3	3/3
	— Procedimento 2 (imersão por 30 min.) —			
	Gentamicina, 50ppm		Estreptomicina, 100ppm	
<u>G. margarita</u>	0	0	0	0
<u>G. gigantea</u>	0	0	0	0
<u>G. clarum</u>	0	0	0	0

\* Procedimentos 1 e 2 correspondem ao tempo de imersão em soluções contendo 50 ppm de gentamicina ou 100 ppm de estreptomicina por 0 (zero) e 30 minutos respectivamente, após pré-lavagem com hipoclorito de sódio 1% por 20 min.

por 20 min. em hipoclorito de sódio 1%, seguida de imersão em solução contendo 100 ppm de estreptomicina ou 50 ppm de gentamicina durante 30 min. Embora gentamicina atue negativamente sobre a germinação, este antibiótico pode ser usado em casos específicos onde a germinação dos esporos não seja importante (ex.: estudos bioquímicos). Deve-se considerar também que neste trabalho não foram estudados possíveis efeitos da desinfestação superficial sobre o crescimento micelial dos FMVA.

No presente estudo, a origem dos contaminantes não foi estudada, sendo possível que esporos desinfestados e plaqueados em meio para germinação ou crescimento micelial apresentem algum crescimento de microrganismos provenientes da microbiota endospórica como aqueles tipo-bactérias observados por MACDONALD & CHANDLER (29) e espiroplasmas por TZEAN et alii (66) e outros.

## 7. CONCLUSÕES

Considerando-se os efeitos sobre a germinação e contaminação dos esporos de FMVA concluiu-se que:

1. Hipoclorito de sódio nas concentrações de 0,5 ou 1% usado em lavagem dos esporos por 20 min. mostrou-se superior ao uso em lavagem com cloramina-T, cloreto de mercúrio e formaldeído em diversas concentrações e tempo de exposição.

2. O uso de estreptomicina a 100 ppm ou gentamicina 50 ppm mostrou-se superior ao uso de cloranfenicol, pimaracina e cefalosporina, em diversas concentrações.

3. A pré-lavagem dos esporos com hipoclorito de sódio 1% por 20 min., seguida do uso de estreptomicina 100 ppm ou gentamicina 50 ppm em imersão por 30 min., ou a incorporação de 100 ppm de estreptomicina no meio de germinação, mostrou ser procedimento eficiente para desinfestação de esporos de FMVA.

## . RESUMO

Microrganismos diversos invariavelmente ocorrem associados aos esporos dos fungos micorrízicos vesículo-arbusculares (FMVA), dificultando sua multiplicação in vivo ou cultivo axênico in vitro. Os estudos já realizados sobre a desinfestação superficial de esporos não são conclusivos, e os vários métodos de desinfestação atualmente em uso, têm apresentado baixa eficiência. No presente trabalho avaliou-se o efeito do uso de agentes desinfestantes e antibióticos combinados ou não na lavagem, imersão ou incorporação ao meio de germinação, objetivando a desinfestação dos esporos. Foram testados como agentes desinfestantes hipoclorito de sódio, cloramina-T, cloreto de mercúrio e formaldeído, e como antibióticos estreptomicina, gentamicina, pimaracina, cefalosporina e cloranfenicol, em diferentes concentrações e tempo de exposição dos esporos, sendo os antibióticos também testados em antibiogramas com culturas puras de bactérias isoladas dos esporos de FMVA. Desinfestante e antibióticos nas concentrações e tempo de exposição selecionados foram testados por seus efeitos em uso combinado, sendo aplicados aos esporos em lavagem, em imersão ou

incorporação do antibiótico ao meio de germinação. Em todos os ensaios avaliaram-se a taxa de germinação dos esporos e a percentagem de contaminação dos mesmos, com fungos ou bactérias. Hipoclorito de sódio usado em lavagem, em concentrações de 0,5 ou 1% por 20 min., e os antibióticos estreptomicina a 100 ppm ou gentamicina a 50 ppm usados em imersão dos esporos ou incorporados ao meio de germinação foram os tratamentos mais promissores. A pré-lavagem dos esporos com hipoclorito de sódio a 1% por 20 min., seguido do plaqueamento destes em meio contendo 100 ppm de estreptomicina eliminou a contaminação superficial de esporos de Gigaspora margarita e Gigaspora gigantea. O mesmo tratamento de pré-lavagem com hipoclorito de sódio 1%, seguido da imersão dos esporos por 30 min. em solução contendo 100 ppm de estreptomicina ou 50 ppm de gentamicina, eliminou os contaminantes superficiais dos esporos de G. margarita, G. gigantea e G. clarum, evidenciando sua eficácia na obtenção de esporos assépticos.

[REDACTED]

## 7. SUMMARY

### SURFACE DISINFESTATION OF VESICULAR-ARBUSCULAR MYCORRHIZA FUNGAL SPORES

A variety of microorganisms are always associated with the spores of VAM fungi. These organisms interfere with the esporulation in vivo, and make axênic culture in vitro, more difficult. Disinfestation studies conducted till now, are non-conclusives and; the disinfestation methods in use have given poor results. In the present work procedures for spore disinfestation were studied. Several disinfestant agents (sodium hypochlorite , chloramine-T, mercurium chlorite and phormaldehyde) and antibiotics (streptomycin, gentamicin, pimaracin, cephalosporin and chloranphenicol) were testes in different concentrations and exposure times, either separately or in different combinations by multiple rinsing and incorporation in the germination medium. Spore rinsing by exposure in 1% sodium hypochlorite for 20 minutes, followed by their imersion for 30 minutes, either in a 100 ppm of strepto-

mycin or 50 ppm of gentamicin solution showed a very effective way for surface disinfection of Gigaspora margarita and G. gigantea. Incorporation of either antibiotic into the germination medium, was equally effective to control spore contaminants. This procedure can be used to obtain large number of disinfested(aseptics) spores, with minimal damage to their viability.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALLEN, M.F.; MOORE Jr., T.S. & CHRISTENSEN, M. Growth of vesicular-arbuscular-mycorrhizal and nonmycorrhizal Bouteloua gracilis in a defined medium. Mycologia, New York, 71(3): 666-9, May/June 1979.
2. AZCON, G.C.A. & BAREA, J.M. An improved procedure for the study of axenic growth of the endomycorrhizal fungus Glomus mosseae. Microbios Letters, Cambridge, 9:127-32, 1979.
3. AZCON-AGUILAR, C.; DIAZ-RODRIGUES, R.M. & BAREA, J.M. Effect of soil micro-organisms on spore germination and growth of the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus Glomus mosseae. Transaction of the British Mycological Society, London, 86 (2):337-40, Mar. 1986.
4. BECARD, G. & FORTIN, J.A. Early events of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation on Ri T-DNA transformed roots. The New Phytologist, London, 108(2):211-8, Feb. 1988.
5. BIER, O. Microbiologia e imunologia. 24.ed.rev. e amp. São Paulo, Melhoramentos, 1985. 1234p.

6. CARDOSO, E.J.B.N. & SANHUEZA, R.M.V.S. Problemas fitossanitários na produção de inoculante de fungo micorrízico vesicular-arbuscular. Fitopatologia Brasileira, Brasília, 10(3): 671-5, out. 1985.
7. CARR, G.R.; HINKLEY, M.A.; LE TACOM, F.; HEPPER, C.M.; JONES, M.G.K. & THOMAS, E. Growth responses of Glomus caledonium in the presence of suspension cultured lucerne cells. In: Micorrizae, physiology and genetics - 1<sup>st</sup>. Paris, ESM, INRA, 1986. p.521-5.
8. \_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_ & \_\_\_\_\_. Improved hyphal growth of two species of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in the presence of suspension-cultured plant cells. The New Phytologist, London, 101:417-26, 1985.
9. COLLINS, C.H. Métodos microbiológicos. Zaragoza, Editorial Acribia, 1969. 410p.
10. DANIELS, B.A. & MENGE, J.A. Hiperparasitization of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. Phytopathology, St. Paul, 70(7):584-8, July 1980.
11. FERGUSON, J.J. & WOODHEAD, S.H. Increase and maintenance of vesicular-arbuscular mycorrhizae fungi. In: SCHENCK, N.C., ed. Methods and principles of mycorrhizal research. St. Paul, American Phytopathology Society, 1982. p.47-54.
12. GERDEMANN, J.W. Vesicular-arbuscular mycorrhiza and plant growth. Annual Review of Phytopathology, Palo Alto, 6:397-418, 1968.

13. GERDEMANN, J.W. & TRAPPE, J.M. The endogonaceae in the Pacific Northwest. Mycologia Memoir, New York, 5:33-4, 1974.
14. GODFREY, R.M. Studies on british species of Endogone. III. Germination of spores. Transactions of the British Mycological Society, London, 40:203-10, 1957.
15. GOMES, F.P. A estatística moderna na pesquisa agropecuária. Piracicaba, POTAFÓS, 1984. 160p.
16. HARLEY, J.L. Micorriza: the first 65 years; from the time of Frank till 1950. In: NORTH AMERICAN CONFERENCE ON MYCORRHIZAE, 6, Oregon, 1985. Proceedings... Oregon, Forestry Research Laboratory, 1985. p.26-33.
17. \_\_\_\_\_ & SMITH, S.E. Mycorrhizal symbiosis. London, Academic Press, 1983. 483p.
18. HAYMAN, D.S. The physiology of vesicular-arbuscular endomycorrhizal symbiosis. Canadian Journal of Botany, Ottawa, 61(3):944-63, Mar. 1983.
19. HEPPEL, C.M. Effect of phosphate on germination and growth of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. Transaction of the British Mycological Society, London, 80(3):487-90, June 1983.
20. \_\_\_\_\_. Techniques for studying the infection of plants by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi under axenic conditions. The New Phytologist, London, 88:641-7, 1981.
21. \_\_\_\_\_ & SMITH, G.A. Observations on the germination of Endogone spores. Transaction of the British Mycological Society, London, 66(2):189-94, Apr. 1976.

22. HIRREL, M.C. The effect of sodium and chloride salts on the germination of Gigaspora margarita. Mycologia, New York, 73(4):610-7, July/Aug. 1981.
23. KLOPFENSTEIN, N.B. Developmental aspects of Gigaspora rosea and Glomus etunicatum, alone or in association with Alnus glutinosa. Ames, Iowa State University, 1985. 148p. (Dissertação Ph.D.).
24. KOSKE, R.E. Gigaspora gigantea: observations on spore germination of V.A. mycorrhizal fungus. Mycologia, New York, 73(2):288-300, Mar./Apr. 1981.
25. LACAZ, C. da S. Antibióticos. 2.ed.rev. e amp. São Paulo, USP, 1969. 609p.
26. LETACON, F.F.; SKINNER, A. & MOSSE, B. Spore germination and hyphal growth of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus, Glomus mosseae (GERDEMANN and TRAPPE) under decreased oxygen and increased carbon dioxide concentrations. Canadian Journal of Microbiology, Ottawa, 29:1280-5, 1983.
27. LIEGEL, L.H. Effects of sterilization procedures on biological chemical and physical properties of soils: a review. Turrialba, San Jose, Costa Rica, 36(1):11-9, ene./mar. 1986.
28. MacDONALD, R.M. Routine production of axenic vesicular-arbuscular mycorrhizas. The New Phytologist, London, 89:87-93, 1981.

29. MacDONALD, R.M. & CHANDLER, N.R. Bacterium-like organelles in the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus Glomus caledonium. The New Phytologist, London, 89:241-4, 1981.
30. MAYO, K.; DAVIS, R.E.; MOTTA, J. Stimulation of germination of spores of Glomus versiforme by spore-associated bacteria. Mycologia, New York, 78(3):426-3, May/June 1986.
31. MENGE, J.A. Inoculum production. In: POWELL, C.L. & BAGYARAJ, D.J., eds. VA mycorrhiza. Boca Raton, CRC Press, 1984. p.187-204.
32. \_\_\_\_\_; LEMBRIGHT, H. & JOHNSON, E.L.V. Utilization of mycorrhizal fungi in citrus nurseries. Proceedings International Society Citriculture, 1:129-32, 1977.
33. MERTZ, S.M.; HEITHAUS III Jr., J.J. & BUSH, R.L. Mass production of axenic spores of the endomycorrhizal fungus Gigaspora margarita. Transactions of the British Mycological Society, London, 72(1):167-9, Feb. 1979.
34. MOSSE, B. Advances in the study of vesicular-arbuscular mycorrhizae. Annual Review of Phytopathology, Palo Alto, 11:171-96, 1973.
35. \_\_\_\_\_. The establishment of vesicular-arbuscular mycorrhiza under aseptic conditions. Journal of General Microbiology, Colchester, 27:509-20, 1962.
36. \_\_\_\_\_. Frutifications of an Endogone species causing endotrophic mycorrhiza on fruit plants. Annual Botany, 20:349-62, 1956.

37. MOSSE, B. Honey-coloured, sessile Endogone spores. I. Life history. Archives of Microbiology, New York, 70:167-75, 1970.
38. \_\_\_\_\_. The regular germination of resting spore and some observation on the growth requirements of an Endogone sp. causing vesicular-arbuscular mycorrhiza. Transactions of the British Mycology Society, London, 42:273-86, 1959.
39. \_\_\_\_\_. Vesicular-arbuscular mycorrhizal research for tropical agriculture. Hawaii, Institute for tropical Agriculture and Human Resources, 1981. 8lp. (Research Bulletin, 194).
40. \_\_\_\_\_ & THOMPSON, J.P. Vesicular-arbuscular endomycorrhizal inoculum production. I. Exploratory experiments with beans (Phaseolus vulgaris) in nutrient flow culture. Canadian Journal of Botany, Ottawa, 62(1):1523-30, July 1984.
41. MUGNIER, J. & MOSSE, B. Vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in transformed root-inducing T-DNA roots grown axenically. Phytopathology, St. Paul, 77(7):1045-50, July 1987.
42. PAULA, M.A. Germinação e crescimento micelial de esporos de fungos micorrízicos vesículo-arbusculares em cultura com calos e suspensão de células vegetais. Lavras-ESAL, 1988. 147p. (Tese MS).
43. PELCZAR, M.J.; REID, R. & CHAN, E.C.S. Microbiologia. São Paulo, McGraw-Hill, 1980. v.1, 433p.

44. ROSS, J.P. & RUTTENCUTTER, R. Population dynamics of two vesicular-arbuscular endomycorrhizal fungi and the role of hyperparasitic fungi. Phytopathology, St. Paul, 67(4): 490-6, 1977.
45. SANDERS, F.E. & TINKER, P.B.H. Phosphate flow into mycorrhizal roots. Pesticide Science, Oxford, 4:385-95, 1973.
46. SCHENCK, N.C.; GRAHAN, S.O. and GREEN, N.E. Temperature and light effect on contamination and spore germination of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. Mycologia, New York, 57(6):1189-92, Nov./Dec. 1975.
47. \_\_\_\_\_ & NICOLSON, T.H. A zoosporic fungus occurring on species of Gigaspora margarita and other vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. Mycologia, New York, 69(5):1049-53, Sept./Oct. 1977.
48. \_\_\_\_\_ & PEREZ, Y. Manual for the identification of VA mycorrhizal fungi. Gainesville, University of Florida. 1987. 245p.
49. SCHULTZ, R.C.; KORMANIK, P.P.; BRYAN, W. Effects of fertilization and vesicular arbuscular mycorrhizal inoculation on growth of hard woods seedling. Soil Science Society of America Journal, Madison, 45(5):961-5, Sept./Oct. 1981.
50. SECILIA, J. & BAGYARAJ, D.J. Bacteria and actinomycetes associated with pot cultures of vesicular-arbuscular mycorrhizas. Canadian Journal of Microbiology, Ottawa, 33(12): 1069-73, Dec. 1987.

51. SIQUEIRA, J.O. Cultura axênica e monoxênica de fungos micorrízicos vesículo-arbusculares. In: REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE MICORRIZAS, 2, São Paulo, 1987. Programas e resumos... São Paulo, SEMA/SEAG/USP. p.44-70.
52. \_\_\_\_\_. Nutricional and edaphic factors affecting spore germination, germ tube growth and root colonization by the vesicular arbuscular mycorrhizal fungi. Gainesville, University of Florida, 1983. 124p. (Dissertação Ph.D.).
53. \_\_\_\_\_ & COLOZZI-FILHO, A. Micorrizas vesículo-arbusculares em mudas de cafeeiro. II. Efeito do fósforo no estabelecimento e funcionamento da simbiose. Revista Brasileira de Ciência do Solo, Campinas, 10(3):207-11, set./dez. 1986.
54. \_\_\_\_\_ & HUBBELL, D.H. Ontogenia, morfologia, germinação e tubo germinativo dos esporos de fungos formadores de micorrizas vesicular-arbusculares (MVA). Fitopatologia Brasileira, Brasília, 10(2):338-99, jun. 1985.
55. \_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_; KIMBROUGH, J.W. & SCHENCK, N.C. Stachybotrys chartarum antagonistic to azygospores of Gigaspora margarita in vitro. Soil Biology Biochemistry, Oxford, 16(6):679-81, June 1984.
56. \_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_ & SCHENCK, N.C. Spore germination and germ tube growth of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus in vitro. Mycologia, New York, 74(6):952-9, Nov./Dec. 1982.

57. SIQUEIRA, J.O.; SYLVIA, D.M.; GIBSON, J. & HUBBELL, D.H. Spore germination and germ tubes of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. Canadian Journal Microbiology, Ottawa, 31(11):965-72, Nov. 1985.
58. SWARD, R.J. The structure of the spores of Gigaspora margarita. II changes accompanying germination. The New Phytologist, London, 88:661-6, 1981.
59. SYLVIA, D.M. & SCHENCK, N.C. Germination of chlamydospores of three Glomus species as affected by soil matric potential and fungal contamination. Mycologia, New York, 75(1):30-5, Jan./Feb. 1983.
60. TINKER, P.B. Effects of vesicular-arbuscular mycorrhizas on plant nutrition and plant growth. Physiologie Vegetale, Paris, 16:734-51, 1978.
61. TOMMERUP, I.C. Spore dormancy in vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. Transaction of the British Mycological Society, London, 81(1):37-45, Aug. 1983.
62. \_\_\_\_\_. Temperature relations of spore germination and hyphal growth of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in soil. Transaction of the British Mycological Society, London, 81(2):381-7, Oct. 1983.
63. \_\_\_\_\_ & KIDBY, D.K. Production of aseptic spores of vesicular-arbuscular endophytes and their viability after chemical and physical stress. Applied and Environmental Microbiology, Washington, 39(6):111-9, June 1980.

64. TRAPPE, J.M. & SCHENCK, N.C. Taxonomy of the fungi forming endomycorrhizae. In: SCHENCK, N.C. Methods and principles of mycorrhizae research. St. Paul, The American Phytopathological Society, 1982. p.91-101.
65. TUIITE, J. Plant pathological methods fungi and bacteria. Minnessota, Burgus Hill, 1969. 235p.
66. TZEAN, S.S.; CHU, C.L. & SU, H.J. Spiroplasma like organisms in a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus and its mycoparasite. Phytopathology, St. Paul, 73(7):989-91, July 1983.
67. WALKER, C. & SANDERS, F.E. Taxonomic concepts in the Endogonaceae. III. The separation of Scutellospora Gen. Nov. from Gigaspora. GERD & TRAPPE. Mycotaxon, Ithaca, 27:169-82, 1986.
68. WATRUD, L.S. Spore germination and axenic culture of endomycorrhizae. In: N.C. SCHENCK, ed. Methods and principles of mycorrhizal research. St. Paul, American Phytopathology Society, 1982. p.81-3.
69. ZAMBOLIM, L. & SIQUEIRA, J.O. Importância e potencial das asociações micorrízicas para a agricultura. Belo Horizonte, EPAMIG, 1985. 36p. (Documentos, 26).

## ANEXO

## Procedimento para desinfestação superficial de esporos de FMVA

1. Após a extração e lavagens com jatos fortes de água, selecionar os esporos quanto ao aspecto morfológico e descartar aqueles velhos, com fragmentos de solo ou de material orgânico aderidos ou com sinais de hiperparasitismo.

2. Recolher os esporos selecionados em seringas de vidro com capacidade para 20 ml, transferindo-os para unidades de filtração constituídas de papel de filtro comum colocado em suporte de filtração tipo "Swinnex" da Millipore.

3. A unidade de filtração com os esporos é acoplada a outra seringa contendo 20 ml de hipoclorito de sódio na concentração de 1%, através da qual aplica-se vagarosamente o desinfestante na unidade, durante 20 minutos.

4. Após a aplicação do hipoclorito de sódio, os esporos são lavados rapidamente, três vezes, com 20 ml de água destilada autoclavada, utilizando-se seringas acopladas as unidades de filtração.

5. Em seguida, lavar vagarosamente os esporos com 20 ml de estreptomicina 100 ppm ou gentamicina 50 ppm durante 30 min., seguindo-se três lavagens com água destilada e autoclavada, como anteriormente.

6. Em condições assépticas, desmontar a unidade de

filtração e com o auxílio de pinça retirar o papel de filtro contendo os esporos, sendo estes recolhidos em placas de Petri com água estéril, através da imersão do papel na água onde os esporos ficarão em suspensão.

Alternativamente ao uso dos antibióticos em lavagem, pode-se incorporar 100 ppm de estreptomicina ao meio de germinação. Neste caso o antibiótico é misturado ao meio após sua autoclavagem, quando este ainda se encontra liquefeito, antes de sua distribuição nas placas.

Toda vidraria e instrumentos utilizados devem ser devidamente esterilizados, e o procedimento executado em condições de completa assepsia.