

# DESINFESTAÇÃO SUPERFICIAL DE ESPOROS DE FUNGOS MICORRÍZICOS VESICULAR-ARBUSCULARES

## I. EFEITOS DA CONCENTRAÇÃO E TEMPO DE EXPOSIÇÃO DE AGENTES DESINFESTANTES E ANTIBIÓTICOS<sup>1</sup>

ARNALDO COLOZZI-FILHO<sup>2</sup>, JOSÉ OSWALDO SIQUEIRA<sup>3</sup> e ELIZABETH DE OLIVEIRA<sup>4</sup>

**RESUMO** - Foi avaliado o efeito do uso dos agentes desinfestantes hipoclorito de sódio, cloramina-T, cloreto de mercúrio, formaldeído, e dos antibióticos estreptomicina, gentamicina, pimaricina e cloranfenicol, sobre a incidência de contaminantes fúngicos e bacterianos nos esporos de fungos endomicorrízicos e sobre a sua germinação. Hipoclorito de sódio, nas concentrações de 0,5 e 1% e tempo de exposição de doze minutos eliminou a maioria dos microrganismos contaminantes dos esporos de *Gigaspora margarita*, causando poucos danos à sua germinação. Formaldeído e cloreto de mercúrio também eliminaram os contaminantes, mas reduziram em 100% a germinação dos esporos dos fungos MVA. Os antibióticos tiveram efeito negativo sobre a germinação dos esporos. O uso de solução de estreptomicina a 50 ou 100 ppm e gentamicina 25 ou 50 ppm mostraram-se promissores para a desinfestação de esporos de fungos MVA.

Termos para indexação: fungos endomicorrízicos, desinfestação superficial, germinação de esporos.

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

#### I. EFFECTS OF CONCENTRATION AND EXPOSITION TIME OF DISINFECTING AGENTS AND ANTIBIOTICS

**ABSTRACT** - The effects of disinfecting agents (sodium hypochlorite, chloramine-T, mercurium chloride and phormaldehyde) and antibiotics (streptomycin, gentamycin, pimaricin and chloranphenicol) were studied on germination of *Gigaspora margarita* spores and on incidence of fungal and bacterial contaminants. The use of sodium hypochlorite either 0.5 or 1% for twelve minutes eliminated spore contaminant microorganisms, causing little damage to its germination. The use phormaldehyde and mercurium chloride was very effective on disinfection, but reduced drastically spore viability. The use of antibiotics also reduced VAM fungal spore germination. Streptomycin at 50 and 100 ppm and gentamicin 25 and 50 ppm showed to be effective for VAM fungal spore disinfection.

Index terms: endomycorrhizal fungi, surface sterilization, spore germination.

## INTRODUÇÃO

Os fungos micorrízicos vesículo-arbusculares (FMVA) apresentam grande potencial para utili-

zação prática na agricultura, dada a sua capacidade de promoverem o crescimento das plantas. Entretanto, a condição de "biotrófico obrigatório" tem impossibilitado seu cultivo *in vitro*, dificultando a produção em massa de inoculante de boa qualidade e estudos relacionados com a taxonomia, ecologia, fisiologia e relação fungo-hospedeiro (Siqueira, 1987).

A multiplicação destes fungos só é conseguida através do uso de planta hospedeira em solo ou substratos de crescimento vegetal, o que possibilita o desenvolvimento simultâneo de microrganismos contaminantes, comumente associados aos esporos (Schenk & Nicolson, 1977; Secilia & Bagyaraj, 1987, Sylvia & Schenck, 1983).

<sup>1</sup> Aceito para publicação em 9 de fevereiro de 1994.

Extraído da Dissertação apresentada pelo primeiro autor à Esc. Sup. de Agric. de Lavras, MG, para obtenção do grau de Mestre.

Financiado pelo PADCT e FAPEMIG.

<sup>2</sup> Eng.-Agr., M.Sc., Fundação Inst. Agron. do Paraná (IAPAR)/Área Técnica de Solos, Caixa Postal 1331, CEP 86001-970 Londrina, PR.

<sup>3</sup> Eng.-Agr., Ph.D., Prof.-Adjunto, Dep. de Ciências do Solo, ESAL, Caixa Postal 37, CEP 37200-000 Lavras, MG.

<sup>4</sup> Bióloga, M.Sc., Dep. de Fitos. ESAL, Caixa Postal 37, CEP 37200-000 Lavras, MG.

Dado o grande tamanho e ornamentação da parede externa, os esporos apresentam-se frequentemente parasitados ou associados a microrganismos que podem atuar na germinação, no crescimento micelial e na sobrevivência dos FMVA. Por isso, tanto para a multiplicação *in vivo* quanto para estudos fisiológicos *in vitro*, a desinfestação dos esporos torna-se de grande importância.

Diversos agentes oxidantes e antibióticos têm sido utilizados para descontaminação destes esporos (Mosse, 1962; Tommerup & Kidby, 1980). Entretanto, informações sobre os danos causados aos esporos por estes produtos são escassas. Estudos de viabilidade dos esporos após descontaminação com produtos químicos podem fornecer informações sobre sua habilidade em sobreviver às operações de laboratório, e ao mesmo tempo, esclarecer certos aspectos do desenvolvimento e sobrevivência dos FMVA em seu habitat natural.

No presente trabalho, estudou-se o efeito de concentração e o tempo de exposição de diversos agentes oxidantes e antibióticos sobre a germinação de esporos de FMVA e sobre os microrganismos contaminantes.

## MATERIAL E MÉTODOS

Os esporos de *Gigaspora margarita* (Becker & Hall) e *Scutellospora heterogama* (Nicol & Gerd) Walker &

Sanders, foram multiplicados em vasos de cultivo com *Brachiaria decumbens* em solo misturado com vermiculita, na proporção de 3:1, fumigado com bromex (260 cc/m<sup>3</sup> de substrato), e mantidos em casa de vegetação durante pelo menos quatro meses. Após a multiplicação, solo e raízes foram secos ao ar e armazenados em câmara fria com temperatura entre 4 e 6°C. Os esporos foram extraídos do solo-inóculo por peneiramento via úmida, em peneiras com malha de 0,720 mm e 0,105 mm de abertura, centrifugados em água a 3.000 rpm durante três minutos, e em sacarose 45% a 2.000 rpm por dois minutos, seguindo-se lavagens com forte jato de água.

Os agentes desinfestantes e os antibióticos, nas concentrações e tempo de exposição aplicados, são apresentados na Tabela 1. Cloranfenicol, estreptomomicina e gentamicina foram também estudados combinados, em lavagem dos esporos por dez minutos, incorporados ou não ao meio de germinação, nas concentrações de 25 e 50 ppm.

Para auxiliar a seleção de antibióticos mais eficazes na desinfestação, foram feitos antibiogramas, utilizando-se suspensões de bactérias previamente isoladas dos esporos de *G. margarita*. Discos de papel estéril contendo os antibióticos estreptomomicina, gentamicina, cloranfenicol (25, 50, 100 e 200 ppm) e pimaracina (2,5; 5; 10; e 20 ppm) foram colocados em placas contendo meio MB1 (Tuite, 1969) contaminado com as bactérias, e incubados por 72 horas, na ausência de luz e com temperatura de 25 a 28°C. O efeito antibiótico foi avaliado pela formação de halo de inibição do crescimento bacteriano, sendo considerado ausente (sem inibição),

TABELA 1. Agentes desinfestantes e antibióticos nas concentrações e tempo de exposição estudados.

Produtos	Concentração	Tempo de exposição (min)
<b>Agentes desinfestantes:</b>		
- Hipoclorito de sódio solução P.A. 5% cloro livre, Reagen	0,5 a 1,0% V/V	3, 6, 12, 24
- Cloramina-T P.A., Riedel de Haen	2,0, 6,0% P/V	3, 6, 12, 24
- Formaldeído em solução 35% P.A., Merck	2,5, 5,0, 10, 20% V/V	20
- Cloreto de mercúrio P.A., Merck	0,025, 0,05, 0,1, 0,2 P/V	20
<b>Antibióticos</b>		
- Estreptomomicina (Sulfato de estreptomomicina) Fontoura-Wyeth	50, 100, 200, 400 ppm	10
- Gentamicina (Garamicina injetável 30 mg) Schering	50 ppm	2,5, 5,0, 10, 20
- Pimaracina (Pimaracin) suspensão 1,5%, Sigma	25, 50, 100, 200 ppm	10
- Pimaracina (Pimaracin) suspensão 1,5%, Sigma	25 ppm	2,5, 5,0, 10, 20
- Cloranfenicol (Quemicetina injetável) Schering	2,5, 5,0, 10, 20 ppm	10
- Cloranfenicol (Quemicetina injetável) Schering	25, 50, 100, 200 ppm	2,5, 5,0, 10, 20

pequeno, médio ou grande, em função do diâmetro do halo de crescimento bacteriano formado.

As soluções desinfestantes foram preparadas a partir da diluição dos produtos em água destilada esterilizada, e aplicadas aos esporos com auxílio de seringas de vidro com capacidade de 20 ml, acopladas a unidades de filtração por membrana. Como tratamento-controle, utilizou-se a lavagem dos esporos em água destilada estéril, pelo maior tempo de exposição aplicado em cada ensaio.

Após a aplicação dos tratamentos, os esporos foram lavados com água destilada estéril e plaqueados em meio ágar-água (1%), num total de dez esporos por placa. Em todos os ensaios, a incubação foi feita, na ausência de luz, à temperatura de 25 a 28°C, por quatorze dias. A taxa de germinação foi avaliada considerando-se germinados os esporos que emitiram pelo menos um tubo germinativo. A incidência de contaminantes (fungos ou bactérias) foi avaliada considerando-se contaminados os esporos que apresentaram quaisquer sinais de crescimento de fungos ou de bactérias. Para a contaminação bacteriana, considerou-se o número de placas que apresentou esporos contaminados. Todos os ensaios foram conduzidos com cinco repetições e repetidos uma vez.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Aumentos no tempo de exposição dos esporos ou na concentração dos agentes desinfestantes, hipoclorito de sódio ou cloramina-T, provocaram reduções na taxa de germinação, podendo as concentrações menores ser aplicadas aos esporos por mais tempo (Fig. 1). O uso de hipoclorito de sódio 1% por 24 minutos reduziu a germinação. Entretanto, esta mesma concentração promoveu a descontaminação dos esporos quando expostos por pelo menos três minutos. Hipoclorito de sódio em concentrações acima de 2% por cinco minutos inviabilizou os esporos.

Segundo Pelczar et al. (1980), os desinfestantes do grupo dos halogênios são agentes oxidantes energéticos que atuam sobre os constituintes celulares provocando a morte dos microrganismos. É possível que a inviabilização dos esporos pelo cloro se deva à sua combinação com proteínas da membrana citoplasmática e enzimas. Daniels & Menge (1980) observaram diminuição na pigmentação de esporos de *Glomus epigaeum* após a exposição ao hipoclorito de sódio. Este efeito foi

atribuído a processos de oxidação do agente desinfestante com a melanina componente da parede dos esporos.

Cloramina-T a 6% aplicada por seis minutos reduziu a taxa de germinação dos esporos em 57% (Fig. 1). Aumentos na concentração deste desinfestante e no tempo de exposição dos esporos reduziram a contaminação por fungos e bactérias. Segundo Collins (1969), cloramina-T é 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, é possível que não tenha ocorrido a liberação total do oxidante cloro para uma ação eficaz de descontaminação. A liberação do cloro do hipoclorito de sódio é instantânea (Collins, 1969), e, embora atue mais que a cloramina-T sobre a germinação dos FMVA em concentração e tempo de exposição adequados, pode eliminar os contaminantes sem inviabilizar os esporos.

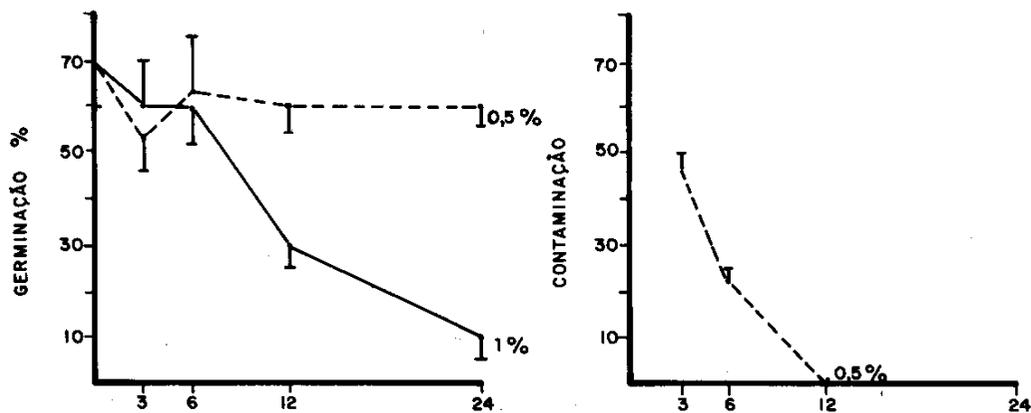
Formaldeído aplicado aos esporos de *G. margarita* por 20 min, nas concentrações de 2,5; 5; 10; e 20%, inibiu totalmente o crescimento de fungos contaminantes e reduziu a contaminação bacteriana em até 80%, em concentrações maiores que 5% (Fig. 2). Entretanto, não houve germinação dos esporos em nenhuma das concentrações testadas.

Cloreto de mercúrio, nas concentrações de 0,025; 0,05; 0,1 e 0,2%, aplicado aos esporos de *G. margarita* por 20 min, eliminou totalmente a contaminação (Fig. 2). Entretanto, a taxa de germinação foi reduzida em 87% quando foram aplicadas concentrações maiores que 0,05%.

Embora eficientes na eliminação dos contaminantes, o forte efeito depressivo sobre a germinação dos esporos de *G. margarita* tornam pequenas as possibilidades de uso do formaldeído ou do cloreto de mercúrio na descontaminação de esporos de FMVA.

Todos os antibióticos no tempo de exposição utilizado (10 min) tiveram efeito sobre a germinação dos esporos, sendo este diferenciado em função da espécie fúngica, do produto e das concentrações utilizadas (Fig. 3). Aumentos na concentração de estreptomicina diminuíram a germinação de *G. margarita*, sendo este efeito menor nas concentrações de 50 e 100 ppm. Para *S. heterogama*,

## HIPOCLORITO DE SÓDIO



## CLORAMINA - T

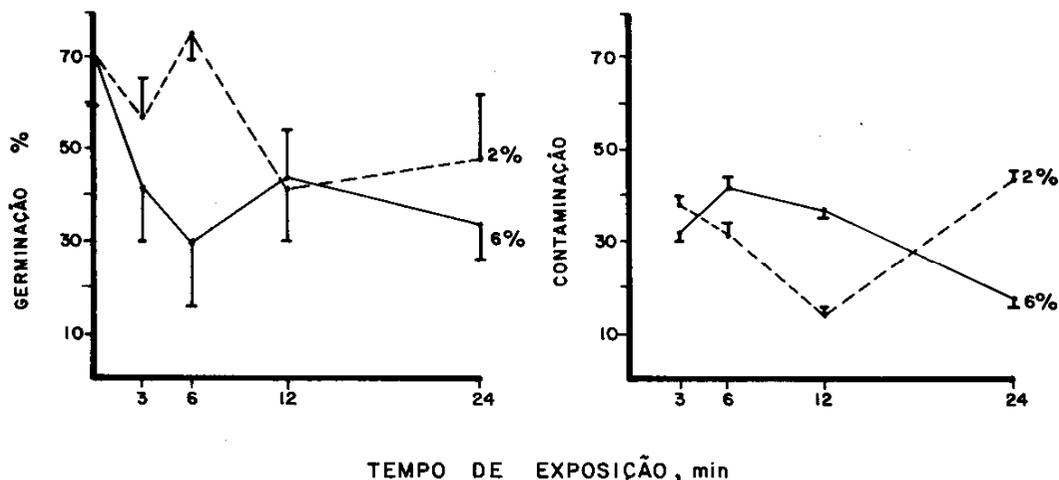


FIG. 1. Efeitos do tempo de exposição durante a lavagem com agentes desinfestantes, em duas concentrações, na germinação e contaminação com fungos e bactérias em esporos de *Gigaspora margarita*. As barras representam erro-padrão da média.

os efeitos negativos sobre a germinação dos esporos foram diminuídos com aumentos na concentração de estreptomomicina. A redução média na taxa de germinação de esporos de *G. margarita* tratados com gentamicina foi de 77%, sendo este efeito

maior na concentração de 50 ppm. Este mesmo antibiótico teve pouco ou nenhum efeito sobre a germinação de *S. heterogama* (Fig. 3). O uso de pimaracina, um antibiótico específico para fungos, em concentrações acima de 2,5 ppm teve efeito

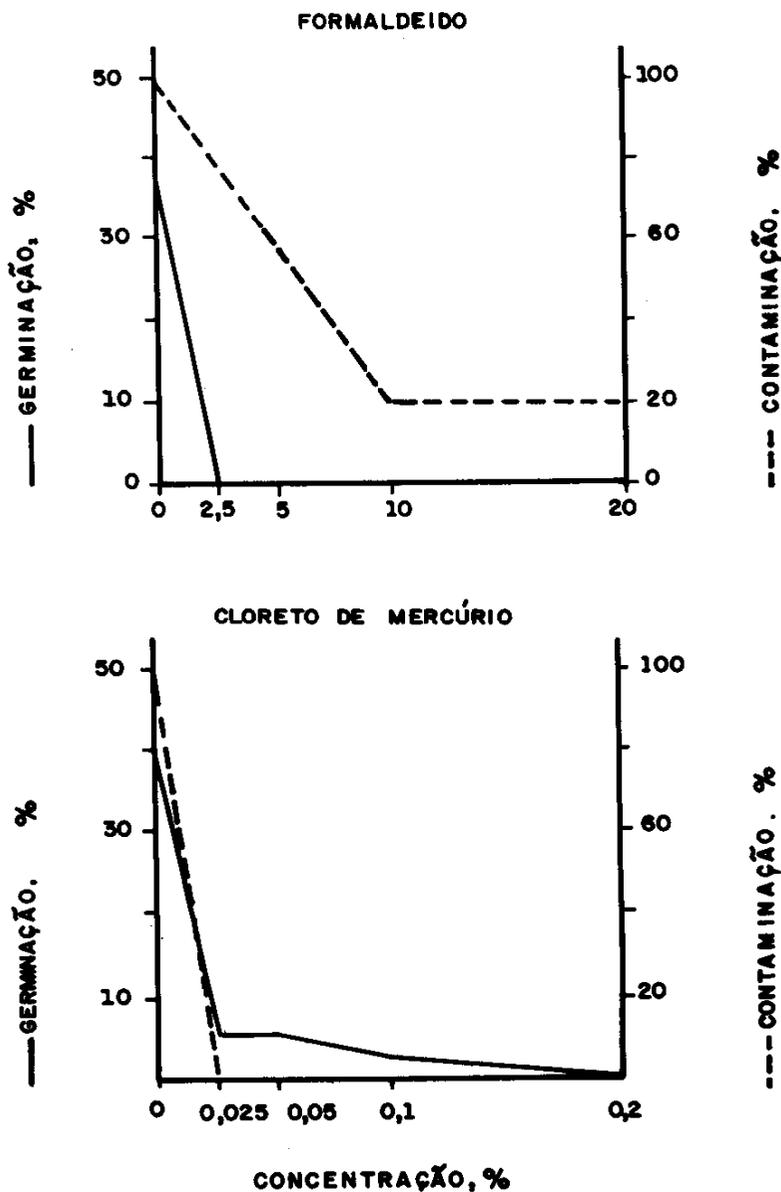


FIG. 2. Efeito da lavagem com formaldeído e cloreto de mercúrio por 20 min, em diferentes concentrações, na germinação e contaminação de esporos de *G. margarita*.

negativo mais acentuado sobre a germinação de *G. margarita*. Cloranfenicol, mesmo em baixa con-

centração (25 ppm), reduziu a germinação de *G. margarita* em 87%.

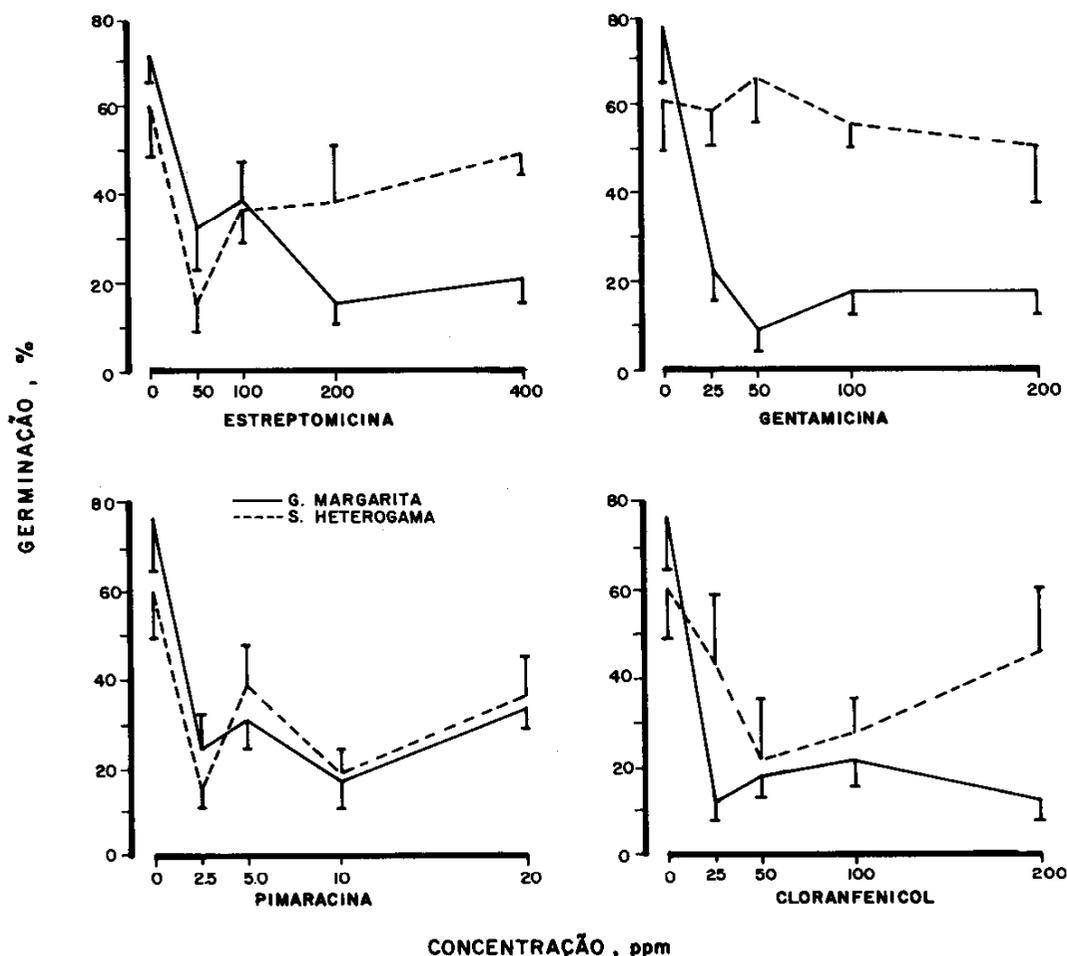


FIG. 3. Efeitos de antibióticos aplicados em lavagem por 10 minutos, em diferentes concentrações, sobre a germinação de esporos de *Gigaspora margarita* e *Scutellospora heterogama*. As barras representam erro-padrão da média.

Estes resultados demonstram a complexidade das interações antibiótico/esporo de fungos MVA, e corroboram as informações de que cada espécie pode reagir diferentemente aos antibióticos, conforme sugerido por Hepper (1983), Menge (1984) e Sylvia & Schenck (1983). A germinação de *G. margarita*, parece ser mais sensível à ação dos antibióticos. Segundo Klopfenstein (1985), 50 e 100 ppm de gentamicina incorporados ao meio tiveram efeitos inibitórios sobre a germinação de *Glomus*

*etunicatum*. O mesmo autor relata também inibição da germinação e crescimento micelial de *Gigaspora rosea* em meio contendo 33 ppm de cloranfenicol.

Todos os antibióticos diminuíram a germinação de *G. margarita* (Tabela 2). Entrepomicina reduziu o crescimento de fungos contaminantes, sendo este efeito maior com aumentos no tempo de exposição. Entretanto, estreptomicina não controlou a população de bactérias. Gentamicina mostrou

**TABELA 2. Efeitos da lavagem com antibióticos em diferentes tempos de exposição, sobre a germinação e contaminação de esporos de *Gigaspora margarita*.**

Antibióticos (concentração)	Tempo de exposição (min)	Germi- nação (%)	Contaminação (%)	
			Fungos	Bactérias
Estreptomicina (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
Piramicina (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

\* Erro padrão da média.

efeitos pouco consistentes no controle de contaminantes fúngicos, mas reduziu a contaminação bacteriana em até 100% quando aplicada aos esporos por 10 min. Pimaracina e cloranfenicol diminuíram o crescimento bacteriano, independentemente do tempo de exposição utilizado. A ação de agentes desinfestantes e antibióticos é função direta da concentração e do tempo de exposição (Collins, 1969). Todos os antibióticos mostraram algum efeito de inibição sobre o crescimento da população de contaminantes fúngicos ou bacterianos, nos tempos de exposição e concentração utilizados.

Cloranfenicol em lavagem, associado ou não à estreptomicina ou gentamicina, incorporados ou não ao meio de germinação, não exerceu efeito negativo acentuado na germinação dos esporos de *G. margarita* (Tabela 3). Sempre que se incorporou antibiótico ao meio, a contaminação com bactérias foi reduzida. O melhor controle da contaminação bacteriana foi obtido quando os esporos foram lavados com cloranfenicol 50 ppm por 10 min, e em seguida plaqueados em meio contendo estreptomicina ou gentamicina 50 ppm. Cloranfenicol e estreptomicina, quando usados em combinação e lavagem dos esporos, não controlou a contaminação bacteriana.

**TABELA 3. Efeitos do uso combinado de antibióticos na germinação e contaminação de esporos de *Gigaspora margarita*.**

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

\* Erro padrão da média.

Estes mesmos antibióticos, em ação isolada (antibiogramas), tiveram efeitos diferenciados sobre bactérias isoladas de esporos de FMVA e multiplicados em meio de cultivo (Tabela 4). Cloranfenicol e pimaracina não tiveram efeito sobre o crescimento das bactérias. Estreptomicina e gentamicina inibiram o crescimento bacteriano, sendo este efeito maior quanto maior a concentração utilizada.

**TABELA 4.** 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
Pimaracina	2,5	ausente
	5,0	ausente
	10,0	ausente
	20,0	ausente
Cloranfenicol	25	ausente
	50	ausente
	100	ausente
	200	ausente

### CONCLUSÕES

1. Hipoclorito de sódio, nas concentrações de 0,5 e 1% e tempo de exposição de doze minutos, eliminou os microrganismos contaminantes dos esporos de *Gigaspora margarita*, causando pouco dano à sua germinação.

2. Formaldeído e cloreto de mercúrio são descontaminantes eficazes, mas reduziram drasticamente a germinação dos esporos de *G. margarita*.

3. Os antibióticos atuaram sobre a germinação

dos esporos, sendo este efeito dependente da concentração utilizada.

4. Estreptomicina nas concentrações de 50 e 100 ppm, e gentamicina nas concentrações de 25 e 50 ppm, se mostraram promissoras para uso em procedimentos de desinfestação de esporos de FMVA.

### REFERÊNCIAS

- COLLINS, C.H. *Métodos microbiológicos*. Zaragoza: Editorial ACRIBIA, 1969. 410p.
- DANIELS, B.A.; MENGE, J.A. Hiperparasitization of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Phytopathology*, v.70, n.7, p.584-588, 1980.
- HEPPER, C.M. Effect of phosphate on germination and growth of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Transaction of the British Mycological Society*, v.80, p.487-490, 1983.
- KLOPFENSTEIN, N.B. *Developmental aspects of Gigaspora rosea and Glomus etunicatum, alone or in association with Alnus glutinosa*. Ames: Iowa State University, 1985. 148p. Tese de Ph.D.
- MENGE, J.A. Inoculum production. In: POWELL, C.L.; BAGYARAJ, D.J. (Eds.). *V.A. Mycorrhiza*. Boca Raton: CRC Press, 1984. p.187-204.
- MOSSE, B. The establishment of vesicular-arbuscular mycorrhiza under aseptic conditions. *Journal General Microbiology*, v.27, p.509-520, 1962.
- PELCZAR, M.J.; REID, R.; CHAN, E.C.S. *Microbiologia*. São Paulo: McGraw-Hill, 1980. v.1, 433p.
- SCHENCK, N.C.; NICOLSON, T.H. A zoosporic fungus occurring on species of *Gigaspora margarita* and other vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycologia*, v.69, n.5, p.1049-1053, 1977.
- SECILIA, J.; BAGYARAJ, D.J. Bacteria and actinomycetes associated with pot cultures of vesicular-arbuscular mycorrhizas. *Canadian Journal of Microbiology*, v.33, p.1069-1073, 1987.
- SIQUEIRA, J.O. Cultura axênica e monoxênica de fungos micorrízicos vesículo-arbusculares. In: REUNIAO BRASILEIRA SOBRE MICORRIZAS, 2., 1987, São Paulo. *Programas e resumos*. São Paulo: SEMA/SEAG/USP, 1987. p.44-70.

SYLVIA, D.M.; SCHENCK, N.C. Germination of chlamydospores of three *Glomus* species as affected by soil matric potential and fungal contamination. *Mycologia*, v.75, n.1, p.30-35, 1983.

TOMMERUP, I.C.; KIDBY, D.K. Production of aseptic spores of vesicular-arbuscular endophytes and

their viability after chemical and physical stress. *Applied Environmental Microbiology*, v.39, n.6, p.111-119, 1980.

TUITE, J. *Plant pathological methods fungi and bacteria*. Minesota: Burgess Hill, 1979. 235p.