

EFEITO DO EXTRATO DE SERAPILHEIRA DE *EUCALYPTUS* SOBRE O CRESCIMENTO MICROBIANO¹

EMÍLIO DELLA BRUNA², BAIRON FERNANDES³, ARNALDO CHAER BORGES⁴
JOSÉ DE ALMEIDA FILHO⁵ e NAISAU FELIX DE BARROS⁶

RESUMO - Estudou-se o efeito antimicrobiano de extratos aquosos de serapilheira de *Eucalyptus* em meio de cultura e o número de componentes antimicrobianos existentes nos extratos obtidos através de vários solventes orgânicos. Os extratos aquosos adicionados a meio de cultura e inoculados com uma suspensão de solo, sob mata nativa, apresentaram forte inibição sobre o crescimento bacteriano. Maiores concentrações de extrato proporcionaram maior inibição sobre o crescimento bacteriano. Por outro lado, o número de colônias fúngicas não foi alterado pela adição de extratos ao meio da cultura. Para o isolamento dos componentes da serapilheira com atividade antibacteriana, fizeram-se extrações utilizando-se o método de extração simples e seqüencial com vários solventes orgânicos. Os extratos obtidos foram aplicados em placas de cromatografia em camada fina, as quais foram desenvolvidas com vários sistemas de solventes e reveladas por bioautografia. Com a utilização do sistema de solvente n-hexano/éter etílico, foi possível separar de três a seis componentes com atividade antimicrobiana.

Termos para indexação: antimicrobiano, serapilheira, solventes orgânicos, fungos.

EFFECTS OF THE *EUCALYPTUS* LITTER EXTRACTS ON MICROBIAL GROWTH

ABSTRACT - Aqueous extracts of *Eucalyptus* sp. litter showed antimicrobial activities when mixed with culture medium and inoculated with soil suspension. The bacterial growth was strongly inhibited by the aqueous extracts, however the number of fungal colony did not change by the addition of extracts in the culture medium. The inhibitory principles were isolated by extraction with organic solvents and thin layer chromatography. The extracts obtained by the simple and sequential method were applied in the thin layer chromatography plates and the inhibitory components separated by various chromatographic solvent systems. After the plates to be bioautographed with bacterial suspension it was possible to isolate from three to six antibacterial components.

Index terms: antimicrobial, "serapilheira", organic solvents, fungal colony.

INTRODUÇÃO

A cultura de eucalipto tem sido largamente usada nos programas de reflorestamento em razão de sua adaptação às mais variadas condições de clima e de solo, associado ao seu rápido crescimento e múltiplas possibilidades de uso. Apesar desses aspectos favoráveis, a possibilidade de prejuízos causados ao solo e à sua microbiota, tem sido levantada. Estes prejuízos são visualizados pela inibição do crescimento de espécies nativas e acúmulo de material orgânico não decomposto sobre o solo, o qual, atribuído por Florenzano (1957), à baixa atividade microbiana, causada pela presença de substâncias inibitórias do crescimento e da atividade da microbiota do material em decomposição.

Segundo Singh & Gupta (1977), a taxa de decomposição varia com a quantidade de substâncias solúveis em água e lixiviáveis com o teor de polifenóis presentes na serapilheira nova. Os componentes da serapilheira, solúveis em água, constituem fonte de energia prontamente disponíveis para os decompositores, as quais influenciam os estágios iniciais de decomposição. Apesar do efeito benéfico das substâncias hidrossolúveis sobre a microbiota do solo, vários autores constataram efeitos inibitórios de extratos aquosos de várias espécies vegetais sobre diversos microorganismos telúricos. Rice, citado por Dommergues & Mangenot (1970), estudando a toxicidade de extratos aquosos de *Euphorbia corolata*, *Helianthus annuus* e *Ambrosiana elatior* sobre *Rhizobium*, *Nitrosomonas*, *Azotobacter*, e *Nitrobacter*, atribui o efeito tóxico à presença de galotaninos, capazes de precipitar proteínas e ácidos clorogênicos, que inibem certos sistemas enzimáticos. Entretanto, Buktach e Säuring, citados por Dommergues & Mangenot (1970), atribuem ao ácido gálico e ao fluro glucitol a inibição da fixação do nitrogênio e da respiração de *Azobacter*. Olsen et al. (1971), estudando a inibição de fungos micorrízicos por extrato aquoso de *Papulus tremula*, identificaram os inibi-

¹ Aceito para publicação em 29 de março de 1989.

² Eng. - Agr., Microbiol. Agríc., Empresa Catarinense de Pesquisa Agropecuária S.A. (EMPASC), Caixa Postal 49, CEP 88840 Urussanga, SC.

³ Eng. - Agr., Física do Solo, Universidade Federal de Viçosa (UFV), CEP 36570 Viçosa, MG.

⁴ Eng. - Agr., Microbiologia de Solo - UFV.

⁵ Bioquímico. Biofísica - UFV.

⁶ Eng. - Agr., Solos Florestais UFV.

dores como sendo ácido gálico, mono e diformil triidroxibenzeno.

Calle & Velasco (1972) relataram que os restos de coníferas são ricos em polifenóis e taninos caté- quicos condensados, não hidrolisáveis. Tais substân- cias complexam proteínas e impregnam as membra- nas, retardando sua decomposição (Ellis 1971).

A toxicidade das substâncias solúveis em água aos microorganismos acontece em função da sua con- centração. Knosel, citado por Dommergues & Man- genot (1970), verificou que os ácidos fenólicos libe- rados pela decomposição das plantas são inibitórios em altas doses de estimulantes em pequenas doses. Calle & Velasco (1971), utilizando várias concentra- ções de extratos aquosos, em placas, observaram o mesmo comportamento.

As plantas contêm uma variedade de polihidro- xifenóis que podem compreender de 5% a 15% da massa seca. Algumas dessas substâncias podem ser extraídas com água, como os taninos, que são lixi- viados da serapilheira para o solo. Estudos realizados por Handley (1961), Basaraba & Starkey (1966), Benoit & Starkey (1968a e 1968b), Benoit et al. (1968) e Lewis & Starkey (1968), demonstraram a habilidade dos taninos em tornar complexas várias substâncias, tornando-as resistentes à degradação. Segundo Benoit & Starkey (1968a e 1968b), essa resistência é conferida, provavelmente, pela inibição da ação das enzimas microbianas e aumento da recal- citrância do complexo.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta de amostras

As amostras de serapilheira das camadas L, superior não decomposta, e F, inferior em decomposição, foram coleta- das, ao acaso em um maciço de eucalipto, localizado no mu- nicípio de Viçosa-MG, em um Latossolo Vermelho Amarelo Distrófico de Textura argilosa. As vinte amostras coletadas em cada uma das camadas, foram misturadas e divididas em três partes para extração de substâncias solúveis em água.

Atividade antimicrobiana no extrato aquoso

Para o preparo dos extratos, misturam-se em um liquidi- ficador, separadamente, 100 g de cada uma das três amostras de serapilheira e 300 ml de água destilada. As suspensões fo- ram autoclavadas a 121°C por 40 minutos e filtradas em pa- pel Whatman nº 1. Os extratos foram diluídos em três con- centrações para o estudo da presença de componentes inibi- tórios do crescimento microbiano. Foi usado meio Martin (Drozdowicz & Kulinska 1982) para a contagem de fungos e o meio agar-extrato de solo (Bunt & Rovira 1955) para a contagem de bactérias. O inóculo usado foi proveniente do mesmo tipo de solo, porém coberto por floresta nativa, loca- lizada ao lado do maciço de eucalipto. Foram feitas cinco re-

petições para cada diluição de inóculo. As placas foram incu- badas à temperatura de 25°C, para a contagem do número de colônia de bactérias e fungos crescidas no meio com e sem adição do extrato.

Extração simples e seqüencial

A extração de compostos orgânicos com a atividade anti- bacteriana foi feita utilizando-se os métodos de extração simples e seqüencial com a camada L da serapilheira. Na ex- tração simples, foram utilizados, separadamente, como sol- ventes, a água, o hidróxido de sódio, o acetato de etila e o metanol em cada uma das amostras de serapilheira. Na extra- ção seqüencial utilizou-se os solventes n-hexano, benzeno, acetato de etila e metanol em uma mesma amostra de serapi- lheira.

Cem milímetros de cada solvente permaneceram em contato com 10 g de serapilheira por 24 h, sendo em seguida centrifugada a 4000 g por 10 minutos e o sobrenadante filtra- do em papel Whatman nº 1.

Os extratos obtidos por extração simples, foram então adicionados a 10 ml de acetato de etila, por cinco vezes su- cessivas para a extração de compostos solúveis neste solvente. O acetato foi evaporado em evaporador rotatório Küche a 40°C até atingir a concentração de 10 µl por grama de sera- pilheira e conservado em tubos com vedação hermética para uso posterior.

Os extratos obtidos por extração seqüencial foram eva- porados em evaporador rotatório Küche a 40°C diretamente nos solventes de extração até atingir a concentração de 100 µl de extrato por grama de serapilheira e conservados em geladeira para uso posterior.

Separação de componentes antibacterianos

Para a separação de componentes antibacterianos dos ex- tratos, foram aplicados dois microlitros de cada um dos ex- tratos em pontos sobre placas cromatográficas contendo sílica gel G com suporte.

No desenvolvimento dos cromatogramas foram usados 10 solventes, os quais, combinados entre si, em várias propor- ções, resultam em 18 sistemas de solventes, a saber: cloro- fórmio; benzeno; acetato de etila; clorofórmio: metanol, 1:1; 3:1; 95:5; 97,5; 2,5 (v/v); benzeno: acetato de etila, 3:1; 1:1; 1:3; 1:4; 1:5 (v/v); benzeno: n-hexano, 1:5 (v/v); n-hexano: éter. 1:1 (v/v); clorofórmio: acetona: hidróxido de amônia, 50:50:1 (v/v/v); n-hexano: acetato de etila: metanol, 60:40:1 (v/v/v); acetona: acetato de etila: hidróxido de amônio, 50:50:1 (v/v/v); tolueno: acetona: ácido fórmico, 6:6:1 (v/v/v).

Os cromatogramas foram revelados pelo método de bioautografia com bactérias (Lund & Lyon 1975).

Isolamento e seleção da bactéria usada na bioautografia

A bactéria usada para bioautografia foi selecionada após o isolamento de bactérias dos materiais do solo coberto com floresta natural, localizado ao lado de um maciço de euca- lípto, em que foram coletadas as amostras de serapilheira. Foram isoladas 100 colônias de bactérias, sendo que oito dessas colônias mostram alta sensibilidade ao extrato em meio de cultura agar-extrato de solo. A bactéria usada para bioautografia, foi a que apresentou maior crescimento e sen- sibilidade aos extratos nos meios de cultura MB 1 (Romero 1976) a agar-extrato do solo.

As células usadas para a revelação dos cromatogramas cresceram em meio MB 1 sólido e foram suspensas em água estéril, para serem adicionadas ao mesmo meio semi-sólido, fundido à temperatura de 45°C. A suspensão bacteriana foi aplicada uniformemente sobre toda a placa cromatográfica, utilizando-se atomizador Devilbis.

As placas foram incubadas por 20 horas, em uma câmara úmida, a 27°C. Após a incubação, observou-se a presença de manchas sem crescimento bacteriano, revelando a presença de componentes inibitórios. Para a melhor visualização das manchas, foi aplicado, sobre as placas, aesculina, conforme Weinstein et al. (1981). As placas foram incubadas por mais 20 minutos, secas à temperatura ambiente e determinaram-se os valores Rf (distância percorrida pela mancha dividido pela distância percorrida pelo solvente).

Teste com ácidos orgânicos

Também foi testado em placas de petri e em cromatografia de camada fina o poder inibitório dos ácidos orgânicos vanílico, isovanílico, p-cumárico, p-hidroxibenzóico, 3,4 dihidroxibenzóico, felúrico, cafeico, gentísico, clorogênico, síringico, DL-pipecólico e gálico. Para a realização destes testes foi empregada a mesma metodologia usada nos testes com extrato de serapilheira.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Verificação da presença de compostos com atividade inibitória do crescimento microbiano em serapilheira de eucalipto

Foi observado um comportamento diferencial entre o crescimento de fungos e o de bactérias, em meio de cultura adicionado de extrato aquoso de serapilheira. O crescimento das bactérias foi consideravelmente inibido por concentrações crescentes do extrato aquoso (Fig. 1), enquanto o número total de colônias fúngicas crescidas nas placas, com diferentes concentrações do extrato, não apresentou diferenças significativas (Tabela 1). A presença de componentes inibitórios de crescimento microbiano em extratos aquosos de serapilheira, também foi observada por Olsen et al. (1971) em *Papulus tremula*, e em várias espécies vegetais por Whitehead et al. (1981) e Rose et al. (1983).

Os extratos aquosos das camadas L e F, adicionados nas mesmas proporções aos meios de cultura, resultaram em distintas reduções percentuais do número de colônias de bactérias (Fig. 1). A menor inibição observada nas placas adicionadas ao extrato aquoso da camada F pode ser atribuída à maior exposição desta camada à lixiviação das substâncias solúveis em água e à ação decompositora da microbiota do solo. Singh & Gupta (1977) descrevem que as substâncias solúveis em água são facilmente lixiviadas da serapilheira para o solo, e, segundo Ellis

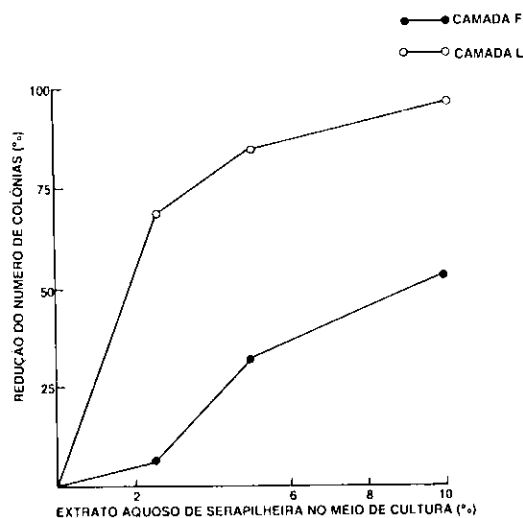


FIG. 1. Redução percentual do número de colônias bacterianas em placas contendo meio-extrato de solo com diferentes concentrações de extrato aquoso de serapilheira de eucalipto, das camadas F (inferior) e L (superior). (—) desvio padrão das médias.

TABELA 1. Número de propágulos fúngicos, por grama de materiais de um Latossolo Vermelho-Amarelo distrófico, em placas com meio Martin contendo diferentes concentrações de extrato aquoso das camadas L e F de serapilheira de eucalipto.

Camada de Serapilheira	Concentração de extrato aquoso de Serapilheira no meio de cultura (%)			
	0	2,5	5,0	10,0
	Número de propágulos x 10 ³ .g ⁻¹			
L (superior)	84 ¹	89	89	81
F (inferior)	84	79	85	95

¹ Os valores não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade, para mesma camada.

(1971), essas substâncias, durante a lixiviação do perfil, arrastam elementos como o Fe e Mn.

A adição de 2,9% do extrato da camada L ao meio cultura - a menor concentração utilizada - resultou em uma redução de 70% do número de colônias bacterianas, enquanto a adição de 10% do extrato aquoso da camada F - a maior concentração dos extratos utilizada - reduziu somente em 56% o número de colônias. Foi constatado por Knosel, citado por Dommergues & Manganot (1970) e por Calle

& Velasco (1971), que a adição de pequenas concentrações de extratos aquosos de serapilheira ao meio de cultura pode estimular o crescimento microbiano. Este estímulo, segundo Melin, citado por Olsen et al. (1971), pode ser atribuído à presença de compostos orgânicos prontamente disponíveis para a utilização microbiana.

A presença de bactérias resistentes aos efeitos de compostos existentes nos extratos aquosos de serapilheira foi observada. Mesmo nas maiores concentrações do extrato não se observou uma redução total do número de colônias (Fig. 1).

A análise do número de propágulos fúngicos encontrados nas placas contendo as diferentes concentrações do extrato aquoso indicou não haver diferença significativa entre eles (Tabela 1). Contudo, o número de colônias com as mesmas características morfológicas aumentou à medida que se aumentava a quantidade de extrato aquoso do meio. Pode-se assim inferir que a adição do extrato aquoso não alterou o número total de propágulos fúngicos, porém alterou a composição de espécies. Também Olsen et al. (1971) não observaram efeito inibitório de extratos aquosos de folhas de diversas espécies vegetais sobre fungos decompositores da serapilheira, observando, porém, este efeito sobre fungos micorrízicos, quando estes cresceram em meio de cultura sintético adicionado de extrato.

Isolamentos de componentes com atividade antibacteriana presentes na serapilheira de eucalipto

Os solventes utilizados na extração de componentes da serapilheira de Eucalipto com atividade antibacteriana, mostraram-se com capacidade de extraí-los, havendo, porém, diferença do número de componentes extraídos (Tabela 2). O metanol e o metanol a 90%, das extrações simples, foram os melhores extratores, uma vez que nos cromatogramas foram observadas duas manchas com atividade antibacteriana. Também na extração seqüencial, o metanol mostrou-se um bom extrator (Tabela 2).

Os resultados obtidos com o método de extração seqüencial sugerem ser este mais adequado que o de extração simples, uma vez que o número de componentes, com atividade antibacteriana, extraído foi maior, como revelado pelos cromatogramas (Tabela 2), Egawa et al. (1977), utilizando a extração seqüencial com os solventes n-hexano, benzeno, acetato de etila e metanol em folhas verdes de diversas espécies de *Eucalyptus*, também obtiveram extratos contendo diferentes componentes antimicrobianos.

Os valores Rf e o número das manchas sem crescimento bacteriano, foram variáveis de acordo com os extratores e sistemas de solvente cromatográficos (Tabela 2). Entretanto, todos os cromatogramas obtidos apresentaram uma mancha com cauda, localizada próximo à origem. O sistema de solvente n-hexano/éter etílico 1:1 (v/v), utilizado na separação dos componentes com atividade antibacteriana dos extratos obtidos pelo método de extração seqüencial, apresentou-se como o mais eficiente, separando de duas a seis manchas com atividade antibacteriana (Tabela 2). Para os extratos obtidos pelo método de extração simples, os sistemas de solventes clorofórmio/metanol 97,5:2,5 (v/v), acetona/acetato de etila/hidróxido de amônia 50:50:1 (v/v/v) e n-hexano/acetato de etila/metanol 60:40:1 (v/v/v) apresentaram os melhores resultados, separando duas manchas com atividade antibacteriana (Tabela 2).

Teste com ácidos orgânicos

Os ácidos vanílico, isovanílico, p-cumárico, p-hidroxibenzoico, 3,4 dihidroxibenzoico, ferúlico, cafeico, gentísico, clorogênico, sirfingico, DL-pipelóico e gálico, não apresentaram efeito inibitório sobre o crescimento da bactéria usada na revelação dos cromatogramas, quando testados pelo método de medição do halo de inibição em placas de Petri e em cromatografia de camada fina, embora não se possa excluir a existência de outros organismos que apresentaram sensibilidade a esses ácidos. Os trabalhos de Dommergues & Manganot (1970) e Olsen et al. (1971) descrevem efeitos inibitórios dos ácidos gálico e benzoico sobre fungos micorrízicos, *Nitrosomonas*, *Nitrobacter*, *Azobacter* e *Rhizobium*. Pelos resultados obtidos, pode-se inferir que as substâncias com atividade antibacteriana existentes nos extratos de serapilheira, possuem características diferentes dos ácidos testados.

CONCLUSÕES

1. Na serapilheira de eucalipto existem substâncias solúveis em água capazes de inibir o crescimento de bactérias do solo quando essas são cultivadas em meio de cultura sintético.
2. O número de colônias fúngicas crescidas em meio de cultura sintético não foi alterado pela adição de extrato aquoso ao meio de cultura.
3. Os solventes orgânicos usados no preparo dos extratos apresentaram diferentes capacidades de extrair os componentes antibacterianos da serapilheira.

TABELA 2. Número de componentes com atividades antibacteriana e seus valores de Rf (distância percorrida pelo componente/distância percorrida pelo solvente), encontrados nos extratos obtidos por diferentes métodos de extração e separados por cromatografia de camada fina em sílica gel, utilizando-se de vários sistemas de solventes.

Extração	Solventes		Nº de manchas com atividades antibacteriana ⁴	Valores Rf
		Desenvolvimento cromatograma ³		
H ₂ O ¹		C:M (3:1)	1	0,80
NaOH ¹		C:M (3:1)	1	0,83
Acetato de Etila ¹		C:M (97,5:2,5)	1	0,55
Metanol ¹		C:M (97,5:2,5)	2	0,48;0,61
		AC:AE:NH ₂ OH(50:50:1)	2	0,40;0,60
Éter Petróleo ¹		C:M (97,5:2,5)	1	0,45
		H:AE:M(60:40:1)	1	0,75
n-Hexano ²		C:M(98,2)	2	0,46;0,52
		H:E(1:1)	2	0,53;0,61
		B	2	0,46;0,52
		B:H(5:1)	1	0,52
Benzeno ²		C:M(98:2)	3	0,48;0,58;0,73
		H:E(1:1)	3	0,36;0,42;0,82
		B	2	0,24;0,57
		B:H	1	0,52
Acetato de Etila ²		C:M (98:2)	3	0,47;0,60;0,75
		H:AE:M(60:40:1)	1	0,62
		H:E(1:1)	3	0,36;0,44;0,83
		B	1	0,64
		B:AE(3:1)	1	0,59
		B:AE(1:1)	1	0,58
		B:H(5:1)	1	0,52
		C:M(98:2)	2	0,47;0,75
Metanol ²		H:E(1:1)	6	0,27;0,30;0,38 0,45;0,56;0,85
		B	1	0,64
		B:AE(1:1)	1	0,59
		B:H(5:1)	1	0,52

¹ Método de extração simples.

² Método de extração seqüencial.

³ AC-Acetona; AE-Acetato de Etila; B-Benzeno; H-n-hexano; C-Clorofórmio; M-Metanol; E-Éter Etilico; NH₂OH-Hidróxido de Amônia.

As proporções entre parênteses referem-se a v/v.

⁴ A atividade antibacteriana dos componentes dos extratos foi determinada pela bioautografia utilizando-se o isolado EDB-4 e o meio de cultura ME₁.

4. O sistema de solvente n-hexano/éter etílico, 1:1 (v/v), utilizado na separação dos componentes com atividade antibacteriana dos extratos obtidos pelo método de extração seqüencial, apresentou-se como o mais eficiente, separando de duas a seis manchas com atividade antibacteriana.

5. Os componentes com atividade antibacteriana

existentes nos extratos de serapilheira, possuem características diferentes dos ácidos orgânicos testados.

REFERÊNCIAS

- BASABARA, J. & STARKEY, R.L. Effect of plants tannins on decomposition of organic substances. *Soil Sci.*, **101**(1):17-23, 1966.

- BENOIT, R.E. & STARKEY, R.L. Enzyme inactivation as a factor in the inhibition of decomposition of organic matter by tannins. *Soil Sci.*, **105**(4):203-8, 1968a.
- BENOIT, R.E. & STARKEY, R.L. Inhibition of decomposition of cellulose and some other carbohydrates by tannins. *Soil Sci.*, **105**(5):291-6, 1968b.
- BENOIT, R.E.; STARKEY, R.L.; BASARABA, J. Effect of tannin on the decomposition of some organic compounds and plant material. *Soil Sci.*, **105**(3):153-8, 1968.
- BUNT, J.S. & ROVIRA, A.D. Microbiological studies of some subantarctic soil. *J. Soil Sci.*, **6**:119-28, 1955.
- CALLE, J.M.L. & VELASCO, F. Microbial populations and humus types in semiarid soils. *An. Edafol. Agrobiol.*, **30**(3/4):285-92, 1971.
- CALLE, J.M.L. & VELASCO, F. Alteraciones sinecológicas de la población en un antiguo bosque de *Quercus Toza Bash* repoblado con *Pinus pinaster* sol. *An. Edafol. Agrobiol.*, **31**(7/8):615-24, 1972.
- DOMMERMUES, Y. & MANGENOT, F. *Ecologia microbienne du sol*. Paris, Masson et Cia Editeurs, 1970. 79p.
- DROZDOWICZ, A. & KULINSKA, O. *Técnicas de levantamento da microflora telúrica e do isolamento de fungos saprofiticos do solo*. Rio de Janeiro, s.ed., 1982. 76p.
- EGAWA, H.; TSUTSUI, O.; TATSUYAMA, K.; HATTA, T. Antifungal substances found in leaves of *Eucalyptus* sp. *Experientiae*, **33**(7):889-910, 1977.
- ELLIS, R.C. The mobilization of iron by extracts of eucalypt leaf litter. *J. Soil Sci.*, **22**(1):8-22, 1971.
- FLORENZANO, C. Ricerche sui terreni coltivati ad eucalitto (II - Ricerche microbiologiche e biochimiche). *Publ. Centro Sper. Agrfc. For.*, **1**:131-52, 1957.
- HANDLEY, W.R.G. Further evidence for the importance of residual leaf protein complexes litter decomposition and the supply of nitrogen for plant growth. *Plant soil*, **15**(1):37-73, 1961.
- LEWIS, J.A. & STARKEY, R.L. Vegetable tannins, their decomposition and effects on decomposition of some organic compounds. *Soil Sci.*, **106**(4):241-7, 1968.
- LUND, B.M. & LYON, G.D. Detection of inhibitors of *Erwinia carotovora* and *E. herbicola* on thin-layer chromatograms. *J. Chromatogr.*, **110**(1):193-6, 1975.
- OLSEN, R.A.; ODHAM, G.; LINDERBERG, G. Aromatic substances in leaves of *Populus tremula* as inhibitors of micorrhizal fungi. *Physiol. Plant.*, **25**:122-9, 1971.
- ROMEIRO, R. da S. *Identificação de bactérias fitopatogênicas*. Viçosa, UFV, 1976. 9p
- ROSE, S.L.; PERRY, D.A.; PILZ, D.; SCHOENEBERGER, M.M. Allelopathic effect of litter on the growth and colonization of micorrhizal fungi. *J. Chem. Ecol.*, **9**(8):1153-62, 1983.
- SINGH, J.S. & GUPTA, S.R. Plant decomposition and soil respiration in terrestrial ecosystems. *Botanical Rev.*, **43**(4):449-528, 1977.
- WEINSTEIN, L.I.; HANN, M.G.; ALBERSHEIM, P. Host-pathogen interactions. *Plant Physiol.*, **68**:358-63, 1981.
- WHITEHEAD, D.C.; DIBB, H.; HARTLEY, R.D. Extractant pH and the release phenolic compounds from soils, plant root and litter. *Soil Biol. Biochem.*, **13**:343-48, 1981.